



Inhibitory proteaz z grzybów jako potencjalne farmaceutyki

Krzysztof Grzywnowicz

Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Protease inhibitors from fungi as potential pharmaceuticals

Summary

For last several years, proteases have been firmly established as main regulatory components in a number of cellular, tissue and physiological processes. The most important factors influencing the proteases are natural protease inhibitors which form complexes with target proteases to inactivate and/or to regulate their activity. They have been investigated from the points of view of physiological functions, tools for analysing protease enzymology, models for protein-protein and protease-protein interactions, and on medical applications. There is growing interest in new inhibitors of proteases not only synthetic, but also naturally occurring (mushroom ones among them), due to their role in various human diseases.

Key words:

protease inhibitors, medicinal mushrooms, natural proteinase inhibitors.

1. Wstęp

Prawdopodobnie pierwsze znane przedstawienie grzybów przez człowieka, datowane na jakieś 3000 lat wstecz, to tak zwane „grzybowe kamienie” z Gwatemali, gdzie grzyby używano w dawno zapomnianych mistycznych i medycznych rytuałach (1). Część z tych rytów i zastosowań grzybów udaje się badaczom stopniowo odtwarzać (2-4). Stosowanie grzybów leczniczych było powszechne, w niektórych epokach, na Dalekim Wschodzie (Chiny, Japonia, Korea), w krajach słowiańskich (głównie Rosja) oraz w obu Amerykach (Ameryka Południowa i Centralna, Stany Zjednoczone, Kanada) (5). Grzyby były także wymieniane przez

Adres do korespondencji

Krzysztof Grzywnowicz,
Zakład Biochemii,
Uniwersytet Marii
Curie-Skłodowskiej,
pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3,
20-031 Lublin.

biotechnologia

3 (66) 69-77 2004

wielkich pisarzy greckich i rzymskich pod indywidualnymi nazwami, a niektórzy z nich podawali pewne medyczne ich zastosowania.

Wraz z rozwojem etnonauk przede wszystkim etnobotaniki i etnofarmakologii okazało się, że lecznicze właściwości grzybów zasługują na wydzielenie w formie etnomykologii, a co najmniej grzybolecznictwa lub mykofarmakologii. Grupy zastosowań grzybów jako medykamentów są trzy, grzyby stosowane w medycynie ludowej (jest to prawdopodobnie właściwa etnomykologia) – o nie zawsze przebadanych substancjach aktywnych; grzyby stosowane w homeopatii – w większości przejęte z medycyny ludowej, i o częściowo przeanalizowanych czynnikach aktywnych; oraz grzyby stosowane w alopatii, (czyli tak zwanej farmacji „oficjalnej”) – dla których dokonano wyizolowania i przebadania związków farmakologicznie czynnych (6,7). Grzyby stosowane w medycynie ludowej w ciągu ostatniego dziesięciolecia „przewędrowały” częściowo do „medycyny oficjalnej” (choć na przykład w Polsce raczej o nich się nie mówi, gdyż wg „czynników opiniotwórczych” – „nie należy robić ludziom nieuzasadnionej nadziei”). Grzyby w medycynie stosowano głównie jako świeże (zewnątrznie, rzadziej wewnątrznie) i w formie wyciągów wodnych (okłady zewnętrzne lub napary do picia) oraz wyciągów alkoholowych, jak również w postaci suszonej. Homeopatia przejęła w zasadzie większość gatunków grzybów z medycyny ludowej, jedynie dokładniej opisując ich działanie na organizm ludzki.

2. Grzyby jako pożywienie i leki

Większość grzybów „uznanych” przez alopatię produkuje albo antybiotyki, albo cytostatyki. Substancje antybiotyczne są wytwarzane zarówno przez grzyby mikroskopijne, jak i przez workowce (*Ascomycota*) i podstawczaki (*Basidiomycota*). Najważniejsze aktualnie w tej grupie są jadalne grzyby wyższe z klasy *Basidiomycetes*. Są one cenione, nie tylko jako źródło nowych antybiotyków, ale także ze względu na wartości odżywcze (powoli odchodzi się od mitu o ich ciężkostrawności, o wartościach li tylko smakowych i aromatycznych) i akceptowane są coraz bardziej ze względu na ich właściwości lecznicze. Żywnościowo należy je traktować jako pożywienie funkcjonalne (ilości witamin w nich zawarte, oprócz witaminy C, są zbliżone do jarzyn i warzyw – wysoka jest szczególnie zawartość witamin z grupy B; zawierają łatwo przyswajalne białko, o składzie aminokwasowym zbliżonym do białka zwierzęcego, choć w małej ilości; są niskotłuszczowe i niskocholesterolowe; zawierają niestrawialne polisacharydy balastowe) oraz źródło substancji leczniczych, fizjologicznie korzystnych i nieagresywnych (6,8,9). Grzyby mogą wpływać na różne właściwości fizjologiczne (efekty farmakologiczne), takie jak bioregulacja, wzmocnienie immunologiczne, podtrzymanie homeostazy, regulacja biorytmów oraz wspomagać leczenie schorzeń, mogą zapobiegać i łagodzić takie choroby jak rak, udar mózgu czy choroby serca. Potwierdzono, że substancje biologicznie aktywne

z tych grzybów wykazują działania takie, jak: przeciwgrzybowe, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe (w tym anty-HIV), przeciwbakteryjne, przeciw pasożytnicze, regulujące ciśnienie krwi, zapobiegające chorobom serca i układu krwionośnego, obniżające poziom cholesterolu i lipidów, antydiabetyczne, immunomodulujące, tonizujące dla nerek, chroniące wątrobę, tonizujące dla układu nerwowego, przeciwastmatyczne oraz afrodyzyjne. Opracowano testy na zwierzętach laboratoryjnych dla weryfikacji aktywności farmakologicznej tych związków, czy pełnych ekstraktów z grzybów, a niektóre z nich przeszły nawet badania kliniczne i są stosowane jako leki lub substancje aktywne biologicznie (10).

Substancje aktywne farmakologicznie, obecne w grzybach należą głównie do polisacharydów (homopolisacharydów i heteropolisacharydów), terpenoidów (głównie triterpenów i ich pochodnych), glikoprotein, lektyn, oraz najslabiej przebadanych, białkowych i niebiałkowych inhibitorów proteaz. Polisacharydy i glikoproteiny z grzybów wykazują głównie właściwości przeciwnowotworowe (zapobiegają karcynogenezie i indukują karcynostazę), a wielocukry są dodatkowo włóknem dietetycznym. Najbardziej znane z tej grupy to japoński Lentinan i Krestin, czy rosyjski Befungin. Lektyny są intensywnie badane pod kątem terapii przeciwnowotworowej, a japoński GFL jest już w fazie prób klinicznych. Natomiast terpenoidy oprócz właściwości przeciwnowotworowych, wykazują korzystne, wspomniane wcześniej, działanie na większość organów (10). Na tym tle, najslabiej przebadane, inhibitory proteaz z grzybów są najbardziej wielofunkcyjne, a ich efekt działania pleiotropowy. Na tle doniesień o inhibitorach proteaz z innych źródeł oraz inhibitorach syntetycznych proteainaz ich badania, jak się wydaje, są bardzo obiecujące (11,12).

3. Proteazy i ich inhibitory

Tylko niektóre proteazy są związane z trawienną proteolizą zewnątrz- i wewnątrzkomórkową. Coraz większe zainteresowanie wzbudzają, zatem enzymy z tej grupy funkcjonujące w wyspecjalizowanych procesach biologicznych, takich jak aktywacja zymogenów (także w układach kaskadowych, występujących w naturze częściej niż przypuszczano) czy probiałek, uwalnianie hormonów z ich prekursorów, prezentacja antygenów, uwalnianie fizjologicznie aktywnych oligo- i polipeptydów, translokacja białek przez błony i usuwanie ich adresu komórkowego, aktywacja receptorów czy prawidłowa aranżacja białek. Poza funkcją regulacyjną, proteazy mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla białek komórkowych i pozakomórkowych, i dlatego są precyzyjnie kontrolowane przez odpowiednią komórkę, tkankę i/lub organizm. Kontrola taka jest osiągnięta przez regulację ekspresji i/lub sekrecji oraz aktywację proproteaz, przez inhibicję (stałą lub przejściową) aktywności proteolitycznej, przez kontrolowaną degradację dojrzałego enzymu lub kontrolę jego obiegu i/lub funkcjonowania. Badane są proteazy recyркуlujące w obiegu jelitowo-trzustkowym; być może są i inne podobnie funkcjonujące (13). Akumulacja i często dość wy-

sokie stężenie inhibitorów w tkankach czy płynach pozakomórkowych, wskazuje, na to, że główną rolę w wielu procesach komórkowych i wyższego rzędu w organizmie pełni regulacja poprzez naturalną inhibicję. Lokalna równowaga pomiędzy inhibitorem (inhibitorami) proteaz a proteazami docelowymi określa nie tylko lokalną aktywność proteolityczną, ale także homeostazę komórki (kompartmamentacji komórkowej), tkanki czy organizmu.

Charakterystyczne jest, że w zasadzie wszystkie naturalnie obecne w organizmach inhibitory skierowane przeciwko endogennym proteazom, tj. przeciwko enzymom proteolitycznym z tego samego organizmu, jak się wydaje, są białkami. Większość z nich jest na dodatek większa lub dużo większa od samej docelowej proteazy; skrajnym przypadkiem są serpiny – kilka razy większe od docelowych proteinaz serynowych. Tylko parę mikroorganizmów (głównie bakterie) produkuje i wydziela małe inhibitory niebiałkowe, które rozregulowują obronne aktywności proteolityczne gospodarza. Szereg białkowych inhibitorów proteaz wyizolowano i zidentyfikowano, określając równocześnie sfałdowanie ich łańcucha polipeptydowego oraz grupując je w kilku rodzinach białkowych (14). W większości przypadków główna część członków specyficznej rodziny (superrodziny) selektywnych inhibitorów proteaz skierowana jest przeciwko docelowym proteazom tej samej klasy katalityczno-mechanistycznej (serynowym, cysteinowym, asparaginowym czy metaloproteazom). Rodziny w obrębie klasy katalitycznej wydziela się na podstawie podobieństwa sekwencji, podobieństwa topologii (w tym struktury trzeciorzędowej) i mechanizmu wiązania się do proteazy docelowej. Wśród inhibitorów proteaz serynowych wyróżnia się na tej podstawie m.in. rodzinę BPTI (tzw. Kuniny, głównie inhibitory zwierzęce), rodzinę Kazala, rodzinę STI, rodzinę SSI, rodzinę PI-1 i PI-2, rodzinę chelonianin, rodzinę Bowmana-Birka, rodzinę inhibitorów z nasion dyniowatych (tzw. minibiałka), rodzinę serpin (obecnie największa rodzina inhibitorów naturalnych) i rodzinę hirudyn (głównie inhibitory z pijawek) (15). Inhibitory proteaz cysteinowych obejmują takie rodziny jak: cystatyny, stefiny, kininogeny, fetuiny i tyropiny (15-18). Inhibitory metaloproteaz obejmują rodzinę PCI i TIMP (15,19). Inhibitory proteaz asparaginowych są z kolei zbyt młode i nie opracowano jeszcze ich podziału na rodziny. Tylko kilka inhibitorów białkowych wykazuje „dwulicową” aktywność skierowaną równocześnie w stosunku do proteaz z różnych klas katalitycznych; są one nazywane nawet „inhibitorami janusowymi” (20).

Najpowszechniejsze, a zarazem najlepiej przebadane, są inhibitory proteaz serynowych, z których większość reaguje z enzymami według mechanizmu podobnego do substratu i dlatego zwana jest inhibitorami „kanonicznymi” (dawniej „inhibitory standardowe”). Za kanoniczne, choć nie do końca, uchodzą także serpiny, ale ich dwutorowy mechanizm działania, kanoniczny i okazjonalnie niekanoniczny (21), skłania część badaczy do wydzielenia ich jako inhibitorów – substratów samobójczych (22) lub swojego rodzaju „pułapek na myszy” (23). Pozostałe inhibitory, w tym cystatyny, stefiny i inhibitory metaloproteaz działają jako inhibitory niekanoniczne (14).

4. Inhibitory proteaz w procesach chorobowych

Zarówno naturalne, jak i syntetyczne inhibitory proteaz (antyproteazy) mogą być używane jako leki w leczeniu schorzeń i zapobieganiu rozwojowi choroby. W poszczególnych schorzeniach czy grupach schorzeń odgrywają lub mogą odgrywać rolę różne proteazy i odpowiadające im inhibitory. Na przykład, w stanach zapalnych (włącznie z fazą ostrą) istotną rolę pełnią inhibitory proteaz serynowych, np. inhibitor proteiny- α_1 czy elafina (11,12). W obronie organizmu gospodarza przed infekcją – inhibitory proteaz serynowych (w stosunku do proteaz gospodarza i patogenu), np. wydzielany przez leukocyty inhibitor proteaz (SLPI), czy inhibitor specyficzny dla elastazy/SKALP oraz cysteinowych i metaloproteaz, np. MMP1 (w stosunku do proteaz patogenu) (12,24). W kontroli hemostazy – inhibitory proteaz serynowych i metaloproteaz (11,12). W kontroli raka – inhibitory proteaz serynowych (w tym serpiny), cysteinowych (w tym cystatyny) i metaloproteaz (w tym TIMP); w różnych fazach rozwoju raka – proliferacji komórek, angiogenezie guza, efekcie metastazy, czynniki supresji czy związki hamujące promocję guza (19,25). W kontroli apoptozy (w tym apoptozy komórek nowotworowych) – inhibitory kaspaz i metaloproteaz oraz serpiny (26). W chorobach neurodegeneracyjnych – przede wszystkim serpiny, np. neuroserpina, α -synukleina czy białko tau (27). Z kolei serpiny, największa i najlepiej przebadana rodzina inhibitorów proteaz, wymieniane są jako inhibitory przy transporcie hormonów i konwersji prohormonów; koagulacji, fibrynolizie i aktywacji systemu dopełniacza; podtrzymaniu i remodelowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej; regulacji ciśnienia krwi i angiogenezie; rozwoju nerek, nasienia i komórek B; oraz przy wymienionych procesach (28,29); lista cały czas rośnie. Wykazano udział inhibitorów proteaz nawet w takich wyspecjalizowanych procesach, jak wylewy mózgowo (udar mózgu) (30), prawidłowa gospodarka tkanki tłuszczowej (31), czy reakcje roślinożerca-roślina (ważne przy pobieraniu pożywienia roślinnego, zwłaszcza surowego) (32).

5. Inhibitory proteaz z grzybów

Spośród inhibitorów proteaz serynowych z grzybów najlepiej przebadane są, występujące w około 100 gatunkach grzybów wielkoowocnikowych, niskocząsteczkowe inhibitory trombiny, analizowane w Słowenii (33). Najskuteczniejszy okazał się inhibitor z niszczyca pachnącej (*Gleophyllum odoratum*), aktywny zarówno względem trombiny, jak i trypsyny. Japończycy z kolei dokonali izolacji podobnych inhibitorów z twardziaka jadalnego (*Lentinus edodes*) oraz żółciaka siarkowego (*Laetiporus sulphureus*) (34,35). Z tym ostatnim prowadzili fuzje protoplastów z gatunkami grzybów hodowlanych, aby otrzymywać inhibitory w dużej ilości, w warunkach sztucznych. Oprócz tego wyizolowano inhibitory białkowe proteaz serynowych o niskiej masie cząsteczkowej, aktywne względem subtylizyny, z boczniaka ostrygowatego

(*Pleurotus ostreatus*) (36) i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (37). Inhibitory te są dodatkowo interesujące, gdyż ich miejsce aktywne znajduje się na C końcu białka. Praktycznie nie ma doniesień o serpinach z grzybów. Jedynie w pewnych badaniach prowadzonych przez nasz zespół, w tym w znajdujących się w toku, wskazujemy na obecność w grzybach rozkładających drewno inhibitorów proteaz serynowych o różnych masach cząsteczkowych, w tym prawdopodobnie serpin (38-42). Omawiając możliwości zastosowania inhibitorów proteaz serynowych z grzybów wymienia się ich właściwości antytrombinowe (przeciwwzakrzepowe), możliwe przeciwhemofiliowe, skierowane przeciw stanom zapalnym (np. *pancreatitis*), czy przeciw serpinopatiom typu chorób neurodegeneracyjnych (demencji konformacyjnych).

Spośród inhibitorów proteaz cysteinowych z grzybów, ponownie najlepiej przebadane są inhibitory niskocząsteczkowe, skierowane przeciw tiolowym proteazom roślinnym (m. in. papainie) oraz katepsynom B, H i L. Analizowane były w Słowenii, w około 100 gatunkach grzybów wielkoowocnikowych (43), a najskuteczniejszy okazał się inhibitor z zasłonaka fioletowego (*Cortinarius violaceus*) i znowu inhibitory z *G. odoratum*. Japończycy przebadali pod kątem obecności tych inhibitorów pleśnie uczestniczące w fermentacjach typu *koji* i *sake* – głównie podgatunki kropidlaka ryżowego (*Aspergillus oryzae*), oraz drożdże *S. cerevisiae* (44); inhibitory, będące analogami *trans*-epoxy-bursztynylowymi, nazwali kojistatynami. Są także doniesienia o takich inhibitorach z grzybów glebowych – aurantiamidzie z *Aspergillus penicilloides*, katestatynie z *Penicillium citrinum*, dwóch inhibitorach z *Aspergillus terricola*, estatynie z *Myceliophthora thermophila* i inhibitorze z *Glicadium* sp. (45,46). Doniesienia o inhibitorach białkowych dotyczą klitocypiny z owocników gąsówki mglistej (*Clitocybe nebularis*) – analogu lektyn z *P. ostreatus*, lakownicy lśniącej (*Ganoderma lucidum*) czy pieczarki dwuzarodnikowej (*Agaricus bisporus*) (47). W prowadzonych przez nas badaniach wskazujemy na obecność zarówno w owocnikach, jak i w grzybnich grzybów nadrzewnych inhibitorów proteaz cysteinowych (38-41,48). Przy możliwościach zastosowania inhibitorów proteaz cysteinowych z grzybów wymienia się ich właściwości blokowania inwazji i metastazy nowotworów, hamowania resorpcji kości (działanie przeciwoosteoporotyczne), czy blokowaniu periodontozy oraz artretyzmu reumatoidalnego. Z tego powodu Japończycy od dawna reklamują zdrowotne walory *sake* i fermentowanych produktów z *soi*, zwłaszcza dla ludzi starszych.

Na tle omówionych do tej pory dwóch grup inhibitorów proteaz serynowych i cysteinowych z grzybów, inhibitory proteaz asparaginowych i metaloproteaz są wyraźnie gorzej przebadane, ale mogą być bardzo cenne jako potencjalne leki. Przebadany jest do tej pory inhibitor IA₃ z drożdży *S. cerevisiae*, typowy białkowy inhibitor proteaz asparaginowych (49), hamujący tylko proteinazę A z drożdży. W naszych wstępnych badaniach wskazujemy na ich obecność zewnątrzkomórkową u większości grzybów rozkładających drewno (50). Jest to o tyle logiczne, że grzyby z tej grupy zakwaszają środowisko wzrostu i wydzielają do niego dość aktywne protazy asparaginowe, nie hamowane przez znane inhibitory diagnostyczne. Wyizolowanie i przebadanie tych inhibitorów byłoby o tyle cenne, że można by ich użyć jako le-

ków przeciwko: zmianom neurodegeneracyjnym o charakterze lizosomalnym, wrzodom żołądka, pierwotniakom pasożytniczym (np. blokowanie plazmepsyny w rozwoju zarodźca malarii), przeciwwirusowych (blokowanie proteiny własnej wirusa HIV), przeciw infekcjom drożdżowym (np. infekcjom typu pleśniawek przez *Candida albicans*) czy też przeciw nadciśnieniu.

W przypadku inhibitorów metaloproteaz znane są one tylko z grzybów wyższych. Jeden inhibitor niskocząsteczkowy – hydrochinon został wyizolowany z poroka brzoźowego (*Piptoporus betulinus*) (51), chyba najstarszego europejskiego grzyba leczniczego (znaleziono go w rzeczach słynnego Oetzi – człowieka z lodowca alpejskiego), a hamuje metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej. Prawdopodobnie białkowe, zewnątrzkomórkowe inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę wykazano z hodowli żagwi okółkowej (*Grifola frondosa*), *L. edodes*, *G. lucidum*, bocznika (*Pleurotus sajorcaju*), pochwiaka (*Volvariella volvacea*) i zimówki aksamitnotrzonowej (*Flammulina velutipes*) (52). Substancje te mogą być cenne przy regulacji ciśnienia krwi przy chorobie nadciśnieniowej, regulacji przeciążeniowych zakłóceń pracy serca oraz regulacji diurezy. Dodatkowo w literaturze pisze się o możliwości supresji bólu, hamowaniu wzrostu nowotworów i metastazy oraz zapobieganiu periodontozie, artretyzmowi i stwardnieniu rozsianemu. W naszym zespole rozpoczęliśmy dopiero prace dotyczące tych inhibitorów, ale ponieważ grzyby wyższe w owocnikach mają struktury pseudotkankowe, wykrycie inhibitorów metaloproteaz jest prawie pewne.

6. Perspektywy

Do wymienionych związków i grzybów, z których je izolowano, trzeba by cały czas dopisywać kolejne, gdyż w przedstawionej liście (i tak podejrzewam niekompletnej) prezentowany jest stan wiedzy na początek wieku. W latach dziewięćdziesiątych przebadano wiele nowych gatunków grzybów, w tym dziesiątki gatunków w ogóle tu nie wymienionych, a mianowicie workowców i podstawczaków morskich, które okazały się prawdziwą kopalnią związków biologicznie aktywnych. Działają obecnie specjalne zespoły badawcze, które przy okazji połowów ryb i glonów morskich, zbierają nowe gatunki grzybów z tej grupy środowiskowej oraz badają ich właściwości i identyfikują odpowiedzialne za to związki chemiczne. Z grzybów tu omówionych wyizolowano dodatkowe i często zupełnie nowe, o ciekawych właściwościach, substancje. Wiele aktywności, do tej pory tylko „nazywanych”, zidentyfikowano chemicznie, a wiedza na temat alopatycznego grzybolecznictwa powoli staje się coraz bardziej usystematyzowana. Część związków wycofano z dalszych badań, gdyż w badaniach klinicznych okazały się zbyt toksyczne. Właściwości wielu innych nie potwierdziły się do końca; niewykluczone, że nie są aktywne samodzielnie, a w ekstraktach mieszanych na zasadzie synergizmu. W tym miejscu należy wzmiankować, że obficie syntetyzowane i badane sztuczne inhibitory proteaz by-

wają czasami skuteczniejsze i bardziej selektywne, ale wykazują więcej efektów ubocznych niż omówione tu inhibitory naturalne. Pod koniec XX w. ukazało się kilka książek poświęconych grzybolecniectwu (6,7,54), zaczęło ukazywać się czasopismo specjalistyczne „International Journal of Medicinal Mushrooms”, a w latach 2001 (w Kijowie) i 2003 (w Pattaya, w Tajlandii) odbyły się międzynarodowe zjazdy ekspertów grzybów leczniczych z Japonii, Chin, Ukrainy, Rosji, Stanów Zjednoczonych i Izraela. Oprócz wymienionych tu grzybów owocnikowych do badań wprowadzono wiele nowych gatunków (głównie z Dalekiego Wschodu) na przykład trzęsaka (*Tremella fuciformis*), rozszczepkę pospolitą (*Schizophyllum commune*), żagiew okółkową (*Dendropolyporus umbellatus*), wrośniaka wielobarwnego (*Trametes versicolor*), słpówkę jeżowatą (*Hericium erinaceum*), blaszkowca brzozowego (*Lenzites betulina*), lakownicę (*Ganoderma tsugae*), *Wolfiporia cocos*, boczniaki (*Pleurotus citrinopileus*, *P. pulmonarius*, *P. salmistroamineus*), *Dictyophora indusiata*, białokrowiaka olbrzymiego (*Leucopaxillus giganteus*), pieczarkę (*Agaricus blazei*) czy *Hypsizygos marmoreus*. Jeżeli dodamy do tego pojawiające się pierwsze doniesienia o naturalnych inhibitorach karboksypeptydaz (53) i aminopeptydaz, na razie z drożdży, ta dziedzina enzymologii stosowanej robi się naprawdę ciekawa. Można chyba uważać, że w dziedzinie grzybolecniectwa, włączając farmaceutyczne zastosowania inhibitorów proteaz, obserwujemy dopiero początki jego „złotego wieku”.

Literatura

1. Piedras-Hongo, (1994), Eds. Ohi K., Torres M. F., Museo de Tabaco e Sal, Tokyo.
2. Hudler G. W., (1998), *Magical Mushrooms, Mischievous Moulds*, Princeton University Press, Princeton.
3. Schaechter E., (1997), *In the Company of Mushrooms. The Biologist's Tale*, Harvard University Press, Cambridge.
4. Wasson R. G., Kramrisch S., Ott J., Ruck C. A. P., (1986), *Persephone's Quest. Entheogens and the Origin of Religion*, Yale University Press, New Haven.
5. Molitoris H. P., (1994), *Folia Microbiol.*, 39 (2), 91-98.
6. Benjamin D. R., (1995), *Mushrooms: Poisons and Panaceas*, Freeman and Company, New York.
7. Škubla P., (1989), *Tajomne Huby*, Pririda, Bratislava.
8. Gray W.D., (1970), *The Use of Fungi as Food and in Food Processing*, Butterworths, London.
9. Wainwright M., *An Introduction to Fungal Biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester.
10. Wasser S. P., Weis A. L., (1999), *Crit. Rev. Immunol.*, 19, 65-96.
11. Hugli T. E., (1996), *TIBTECH*, 14, 409-412.
12. *Proteases and Anti-proteases: Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Targets*, (2002), *Biochem. Soc. Trans.*, 30 (2).
13. Rothman S., Liebow C., Isenman L., (2002), *Physiol. Rev.*, 82, 1-18.
14. Bode W., Fernandez-Catalan C., Nagase H., Maskos K., (1999), *APMIS*, 107, 3-10.
15. Bode W., Huber R., (1992), *Eur. J. Biochem.*, 204, 433-451.
16. Cornwall G. A., Hsia N., (2003), *Mol. Cellul. Endocrinol.*, 200, 1-8.
17. Brown W. M., Dziegielewska K. M., (1997), *Protein Sci.*, 6, 5-12.
18. Lenarčič B., Bevec T., (1998), *Biol. Chem.*, 379, 105-111.
19. Baker A. H., Edwards D. R., Murphy G., (2002), *J. Cell Sci.*, 115 (19), 3719-3727.
20. Luke C., Schick, C., Tsu C., Whisstock J. C., Irving J. A., Brömme D., Juliano L., Shi G., Chapman H. A., Silverman G. A., (2000), *Biochem.*, 39, 7081-7091.

21. Wright H. T., Scarsdale J. N., (1995), *Prot. Struct. Func. Genet.*, 22, 210-225.
22. Engh R., Huber R., Bode W., Schulze J. A., (1995), *TIBTECH*, 13, 503-510.
23. Huntington J. A., Carrell R. W., (2001), *Sci. Progress*, 84 (2), 125-136.
24. Supuran C. T., Scozzafava A., Clare B. W., (2002), *Med. Res. Rev.*, 22 (4), 329-372.
25. Greenwald P., (2001), *Toxicol.*, 166, 37-45.
26. LeBlanc A. C., (2003), *Progress Neuro-Psychopharm. & Biol. Psychiatry*, 27, 215-229.
27. Lomas D. A., Carrell R. W., (2002), *Nature Rev.*, 3, 759-768.
28. Potempa J., Korzus E., Travis J., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269 (23), 15957-15960.
29. Silverman G. A., Bird P. I., Carrell R. W., Church F. C., Coughlin P. B., Gettings P. G. W., Irving J. A., Lomas D. A., Luke C. J., Moyer R. W., Pemberton P. A., Remold-O'Donnell E., Salvesen G. S., Travis J., Whisstock J. C., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276 (36), 33293-33296.
30. Grubb A. O., (2001), *Adv. Clin. Chem.*, 35, 63-99.
31. Lijnen H. R., Maquoi E., Hansen L. B., van Hoef B., Frederix L., Collen D., (2002), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22, 374-379.
32. Koiwa H., Bressan R. A., Hasegawa P. M., (1997), *TIPS*, 2 (10), 379-384.
33. Doljak B., Stegnar M., Urleb U., Kreft S., Umek A., Ciglaric M., Štrukelj B., Popović T., (2001), *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 12, 123-128.
34. Odani S., Tominaga K., Kondou S., Hori H., Koide T., Hara S., Isemura M., Tsunasawa S., (1999), *Eur. J. Biochem.*, 262, 915-923.
35. Okamura T., Takeno Y., Dohi M., Yasumasa I., Hayashi T., Toyoda M., Noda H., Fukuda S., Horie N., Ohsugi M., (2000), *J. Biosci. Bioengin.*, 89 (5), 474-478.
36. Dohmae N., Takio K., Tsumuraya Y., Hashimoto Y., (1995), *Arch. Biochem. Biophys.*, 316 (1), 498-506.
37. Kojima S., Deguchi M., Miura K., (1999), *J. Mol. Biol.*, 286, 775-785.
38. Grzywnowicz K., (2001), *Int. J. Med. Mushrooms*, 3, 155.
39. Grzywnowicz K., Lemieszek D., Domanski G., (1999), I Krajowy Kongres Biotechnologii (komunikat), Wrocław.
40. Grzywnowicz K., Wyka A., Lemieszek D., (2000), *Biotechnology 2000 – the World Congress on Biotechnology (komunikat)*, Berlin.
41. Grzywnowicz K., Sobczyk K., (2002), *The 7th International Mycological Congress (komunikat)*, Oslo.
42. Żuchowski J., Grzywnowicz K., Lemieszek D., (2003), II Krajowy Kongres Biotechnologii (komunikat), Łódź.
43. Mlinarič A., Kreft S., Umek A., Štrukelj B., Popović T., (2000), *Acta Pharm.*, 50, 39-48.
44. Yamada T., Hiratake J., Aikawa M., Suizu T., Saito Y., Kawato A., Suginami K., Oda J., (1998), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 (5), 907-914.
45. Isshiki K., Asai Y., Tanaka S., Nishio M., Uchida T., Okuda T., Komatsubara S., Sakurai N., (2001), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (5), 1195-1197.
46. Isshiki K., Nishio M., Sakurai N., Okuda T., Komatsubara S., *J. Antibiot.*, 51 (7), 629-634.
47. Brzin J., Rogel B., Popović T., Štrukelj B., Ritonja A., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275 (26), 20104-20109.
48. Grzywnowicz K., Deresz J., Żuchowski J., (2003), II Krajowy Kongres Biotechnologii (komunikat), Łódź.
49. Dreyer T., Valler M. J., Kay J., Charlton P., Dunn B. M., (1985), *Biochem. J.*, 231, 777-779.
50. Grzywnowicz K., Sobczyk K., Żuchowski J., (2003), II Krajowy Kongres Biotechnologii (komunikat), Łódź.
51. Kawagashi H., Hamajima K., Inoue Y., (2002), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (12), 2748-2750.
52. Kim J. M., Ra K. S., Noh D. O., Suh H. J., (2002), *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 292-295.
53. Mima J., Kondo T., Hayashi R., (2002), *FEBS Lett.*, 532, 207-210.
54. Semerdžieva M., Veselský J., (1986), *Léčivé houby dříve a nyní*, Academia, Praha.