

# Antioxidační, anti-proliferační a imunomodulační účinky ovoce, zeleniny a hub *in vitro*

Autoreferát doktorské disertační práce

Ing. Ivo Doskočil

Praha 2016

Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů

Česká zemědělská univerzita  
v Praze  
Kamýcká 129  
165 21, Praha 6 - Suchbátka

[www.af.czu.cz](http://www.af.czu.cz)



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Ing. Ivo Doskočil**

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

**Antioxidační, anti-proliferační a imunomodulační účinky ovoce, zeleniny  
a hub *in vitro***

**Antioxidant, anti-proliferative and immunomodulatory effect of fruits,  
vegetables and mushrooms *in vitro***

**autoreferát doktorské disertační práce**

Studijní program: P4103 Zootechnika

Studijní obor: 4103V002 Obecná zootechnika

Školitel: **doc., Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**  
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Oponenti: **doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D. (MBÚ, AV ČR)**  
**Ing. Matyáš Orsák, Ph.D. (FAPPZ, ČZU v Praze)**  
**Ing. Přemysl Landa, Ph.D. (ÚEB, AV ČR)**

Obhajoba doktorské disertační práce se koná dne: 25. 11. 2016 v 11:30 hod.  
na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze.

S doktorskou disertační prací je možno se seznámit na děkanátě FAPPZ ČZU  
v Praze.

**P r a h a 2 0 1 6**

## Summary

Recently there has been an increasing interest in discovering of new species of plants and mushrooms which have antioxidant or anti-proliferative activity. The interest is caused by the fact that these species have medicinal and food utilization. These properties of plants and mushrooms can be used when dealing with many diseases which may be connected with oxidative stress (inflammatory bowel disease, cardiovascular disease, hypertension, and tumour disease, etc.).

The thesis propounds characteristics of *in vitro* antioxidant and anti-proliferative activity of 19 types of juices and 28 methanol extracts of fruits and vegetables, which are common parts of a diet. In the thesis there are also characteristics of 13 ethanol extracts of edible mushrooms of the order of Polypore (Polyporales). Antioxidant activity was quantified by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), and inhibition of nitric oxide (NO) production. Cytotoxicity was measured by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Immunomodulatory activity was determined by an assay of phagocytic activity of human neutrophil granulocytes. Further a total phenolic content (TPC) and total beta-glucan content were investigated; these are considered to be the potentially active constituents participating in mentioned activities.

From the obtained results it is evident that juices (TPC = 1603.2 mg GAE/L; ORAC = 438.5  $\mu$ mol TE/g) and a bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fruit extract (ORAC 836.6  $\mu$ mol TE/g; DPPH = 404.6  $\mu$ mol TE/g) showed the highest antioxidant activity of all tested samples of fruits and vegetables. Capsicum (*Capsicum* L.) juices (TPC = 642.1 mg GAE/L; ORAC = 127.9  $\mu$ mol TE/g) and a radish (*Raphanus sativus* L.) extract (ORAC 724.5  $\mu$ mol TE/g; DPPH = 52.2  $\mu$ mol TE/g) also proved to have the high values of antioxidant activity. From the tested fruits and vegetables the following inhibited to produce a nitric oxide: onion (*Allium cepa* L.) juices (lowered the NO production by 57%), tangerine juices (*Citrus reticulata* Blanco) (by 52%), broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italic*) extract (by 21%), and orange (*Citrus sinensis* Pers.) extract (by 10%). Concerning edible mushrooms, *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. (TPC = 216.2  $\mu$ mol GAE/g of extract), *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Kras (TPC = 257.9  $\mu$ mol GAE/g of extract), and *Royoporus badius* (Pers.) A.B. De (TPC = 257.8  $\mu$ mol GAE/g of extract) presented the highest phenolic content. *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr. (117.4 mg/g of extract) had the highest content of beta-glucan. Substantial effect on phagocytic activity of granulocytes was noticed in connection with *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns, *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr., and *S. crispa*. In connection with the latter of mentioned mushrooms, a moderate inhibitory effect towards HT-29 human colorectal adenocarcinoma cell line (IC<sub>50</sub> = 107  $\mu$ g/ml of extract) was noticed.

The results indicate that the tested plants and mushrooms can be beneficial when reducing the negative effects of oxidative stress. The oxidative stress has been recognized as a contributing factor to a whole range of diseases and the reduction of the oxidative stress may lead to the decrease in the possibility of the diseases' progression. The results show the possible favourable effects on the human health. When evaluating the results, the following fact should be taken into consideration; the *in vitro* tests and screenings are considered to be the first phase of systematic research of the effects and serve for the choice of respondents for further detailed studies.

**Key words:** antioxidants, anti-proliferation effects, fruits, vegetables, Polyporales, cell line

## Obsah

1.	Literární přehled .....	2
2.	Hypotéza a cíl práce.....	3
3.	Materiál a metodika .....	3
3.1.	Materiál .....	3
3.2.	Metodika .....	4
3.2.1.	Obsah celkový fenolových sloučenin .....	5
3.2.2.	Stanovení obsahu $\beta$ -glukanů.....	5
3.2.3.	Stanovení antioxidační aktivity.....	6
3.2.4.	Kultivace buněčných tkání.....	6
3.2.5.	Inhibice oxidu dusnatého .....	7
3.2.6.	Test cytotoxicity (MTT) .....	7
3.2.7.	Imunomodulační aktivita granulocytů .....	8
3.3.	Statistické vyhodnocení .....	8
4.	Výsledky.....	9
4.1.	Ovoce a zelenina .....	9
4.1.1.	Antioxidační aktivita džusů .....	9
4.1.2.	Antioxidační aktivita extraktu.....	11
4.1.3.	Antiproliferační aktivita.....	12
4.2.	Houby.....	13
4.2.1.	Chemická charakterizace .....	13
4.2.2.	Imunomodulační aktivita .....	14
4.2.3.	Antiproliferační aktivita.....	15
5.	Diskuze .....	15
5.1.	Ovoce a zelenina .....	15
5.2.	Jedlé houby .....	19
6.	Závěr.....	21
7.	Použitá literatura.....	23
8.	Seznam publikací autora k řešené problematice .....	30

## 1. Literární přehled

Volné radikály svým působením vyvolávají oxidační stres, který má vliv na celou řadu chorob, jako jsou chronická onemocnění, ateroskleróza, nádorová onemocnění, diabetes mellitus, stárnutí nebo chronické záněty. Tyto volné radikály rovněž vyvolávají neurodegenerativní poškození, v podobě Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby nebo Huntingtonovy nemoci (Niki, 1997, Lin and Beal, 2006). Existují vědecké poznatky o tom, že ve stravě přijímáme antioxidantní a anti-proliferativní sloučeniny, které by mohly mít pozitivní efekt při léčbě celé řady onemocnění (Cohen et al., 2000, Kay and Holub, 2002, Thimm et al., 2002, Katsube et al., 2003, McDougall et al., 2008, González-Vallinas et al., 2013, Riso et al., 2013, Luo et al., 2016). Vedle základních potravin stoupá mezi veřejností zájem o doplňky stravy, které obsahují antioxidantní a anti-proliferativní sloučeniny. Jde především o polysacharidy, vitamíny, a hlavně rostlinné fenolové sloučeniny, obsažené v rostlinné složce potravy (Cheynier, 2005, Dubost et al., 2007, Pandey and Rizvi, 2009, Shi et al., 2013). Jejich použití má oporu v tradiční čínské medicíně. Podrobným zkoumáním léčivých rostlin a hub byl zjištěn velmi komplexní vliv na celou řadu fyziologických a metabolických funkcí člověka. Příkladem hub s výše popsanou aktivitou jsou *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (houževnatec jedlý), *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Krast (lesklokorka lesklá) a podobné (You and Lin, 2002, Lu et al., 2004, Zhu et al., 2007, Zhao et al., 2010, Kozarski et al., 2011, De Silva et al., 2012, Rincão et al., 2012, Vetvicka and Vetvickova, 2014, Ruan and Popovich, 2012, Boh, 2013, Dosekocil et al., 2016). Přesto, že zkoumané houby pocházejí z Číny, rostou přirozeně i v lesích České republiky. Na rozdíl od jejich protějšků z Číny však nemají tradiční využití v medicíně a léčitelství. Jejich účinky prozkoumány nejsou nebo jsou známy výrazně méně. Přesto mohou být zdrojem spektra sloučenin s účinky proti onemocněním souvisejícím s oxidačním stresem a nádorovým onemocněním (Macakova et al., 2010).

V ovoci a zelenině jsou účinky, antioxidantní a antiproliferativní sloučeniny, zdokumentovány u mnoha druhů, jakými jsou například borůvky (*Vaccinium* spp.), jablka (*Pyrus Malus* L.), celer (*Apium graveolens* L.) a cibule (*Allium cepa* L.) (Hertog et al., 1993, Pearson et al., 1999, Thimm et al., 2002, Katsube et al., 2003, Galeone et al., 2006, Haidari et al., 2008, Denis et al., 2013). V současné době je věnována pozornost různým druhům ovoce, zeleniny a hub, které jsou běžně konzumovány a mohou mít preventivní účinek před vznikem oxidačního stresu (Carvalho-Silva et al., 2014, Liang et al., 2014, Diaconeasa et al., 2015, Tamrakar et al., 2016).

Předložená disertační práce poskytuje informace o *in vitro* antioxidantních a antiproliferativních aktivitách jedlých rostlinných částí a do současnosti málo využívaných druhů jedlých hub. Jedná se o extrakty a džusy z ovoce či zeleniny, běžně přítomné ve středoevropské stravě a extrakty jedlých hub, z řádu Polyporales (chorošotvaré), které taktéž rostou ve střední Evropě. Výsledky práce a ucelený screening tak poskytují prvotní informace pro návazný výzkum jejich zdravotních účinků, přehled o jejich chemismu, obsahu fenolových sloučenin, případně polysacharidů, antioxidantní, antiproliferativní a imunomodulační aktivitě. U rostlin jsme se zaměřili na vztah mezi obsahem

fenolových sloučenin a cytotoxicitou, inhibicí produkce oxidu dusnatého (NO) u makrofágů a antioxidační aktivitou. U hub pak na vztah mezi složením vlákniny, imunomodulační a antiproliferační aktivitou.

## 2. Hypotéza a cíl práce

### Hypotéza

Byly stanoveny hypotézy, že

- a) Bioaktivní sloučeniny běžně konzumované v ovoci a zelenině mají antioxidační a antiproliferační aktivitu.
- b) Jedlé druhy hub řádu *Polyporales* mohou mít pozitivní efekt na antioxidační, imunomodulační a anti-proliferační aktivitu obdobnou, jako houby již využívané v tradiční medicíně.

### Cíl práce

Cílem práce je zhodnocení antioxidační, imunomodulační a anti-proliferační aktivity u ovoce, zeleniny a u jedlých hub, z řádu *Polyporales*. Tedy řádu, do kterého spadají nejvýznamnější léčivé houby čínské medicíny.

## 3. Materiál a metodika

### 3.1. Materiál

Buněčné kultury Caco-2, HT-29, RAW 264.7 byly zakoupeny z European Collection of Cell Culture. Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM), dusitan sodný, glukóza, Griessovo činidlo, fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS), neesenciální aminokyseliny, HISTOPAQUE 1077, hydrogen uhličitán sodný, penicilin, pyruvát sodný, streptomycin, trypsin, 3-(4,5-Dimetyltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), lipopolisacharid (LPS) izolovaný z *Escherichia coli* 0111:B4, RPMI1640 medium, trolox, DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl), AAPH (2,2-azobis 2-amidopropan dihydrochlorid), fluorescein (FL) a gallová kyselina, dimetylsulfoxid (DMSO), metanol (MeOH), etanol (EtOH), Buffy coat, frakce krve od lidských dárců po centrifugaci plazmy, pocházela od neznámých dárců a byla pořízena z Tomayerovy nemocnice v Praze (CZ). Dárci podepsali informovaný souhlas a odběr vzorku byl podřízen v souladu s etickými zásadami instituce. Kultivační láhve, serologické pipety, 96-jamkové destičky byly pořízeny od Termo Fisher (UK).

Ovocné a zeleninové vzorky byly připraveny na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky. Vzorky jedlých částí ovoce a zeleniny: kiwi [*Actinidia sinensis* L.], angrešt [*Ribes uva-crispa* L.], avokádo [*Persea americana* Mill.], banán [*Musa acuminata* Colla], borůvky [*Vaccinium myrtillus* L.], brambor [*Symphytum tuberosum* L.], brokolice [*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*], broskev [*Prunus persica* L. Batsch], celer [*Apium graveolens* L.], cibule [*Allium cepa* L.], citron [*Citrus limon*

L.), cuketa [*Cucurbita pepo* var. *giromontiin*], červená řepa [*Beta vulgaris* var. *vulgaris* L.], čínské zelí [*Brassica chinensis*], hruška [*Pyrus communis* L.], jablko [*Pyrus Malus* L.], karambola [*Averrhoa carambola* L.], kedlubna [*Brassica oleracea* var. *gongylodes*], khaki [*Diospyros kaki* Thunb.], kiwi [*Actinida deliciosa* C. F. Liang & A. R. Ferguson.], maliny [*Rubus idaeus* L.], mandarinka [*Citrus reticulata* Blanco], mango [*Mangifera* L.], mrkev [*Daucus carota* L.], nashi [*Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai], okurka [*Cucumis sativus* L.], papája [*Carica papaya* L.], paprika [*Capsicum* L.], petržel [*Petroselinum* Hill], pithája [*Hylocereus undatus* [Haw.] Britton & Rose], pomeranč [*Citrus sinensis* Pers.], rajče [*Solanum lycopersicum* L.], červený rybíz [*Ribes rubrum* L.], ředkev [*Raphanus sativus* L.], třešeň [*Prunus avium* L.] a vodnice [*Brassica rapa* var. *Rapa* L.] byly pořízeny ze sítě maloobchodních řetězců.

Etanolové extrakty hub z řádu Polyporales byly získány od výzkumné skupiny ADINACO, Farmaceutické fakulty, Univerzity Karlovy: *Abortiporus biennis* (Bull.) Singer (různopórka pleťová), *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (sírovec žlutooranžový), *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. (houževnatec tygrovaný), *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr. (choroš šupinatý), *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. (choroš oříš / trůdník kloubočkatý), *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr. (kotrč kadeřavá), *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns (houževnatec šupinatý), *Panus conchatus* (Bull.) Fr. (hlíva fialová), *Royoporus badius* (Pers.) A.B. De (choroš smolonohý), *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (outkovka pestrá).

### 3.2. Metodika

Při přípravě ovocných a zeleninových džusů došlo nejprve k odstranění vnitřních a vnějších nepoživatelných částí (kůry, slupek, pecek). Ovoce a zelenina byli odšťavněny na komerčním centrifugovém odšťavňovači Catler JE 8010. Čerstvě získaná šťáva byla zfiltrována vakuovou filtrací. Filtrát byl následně odpařen ve vakuovém centrifugačním koncentrátoru ScanVac, při 40°C. Část vzorku byla použita pro stanovení sušiny na váhách s infračerveným zářičem při 105 °C. Zbylé množství bylo naředěno v DMSO na standardní koncentraci 100 mg/ml, pro následné testy.

U metanolových extraktů byla, po zbavení nepoživatelných částí, ovoce a zelenina nakrájena na menší kousky do zkumavek a byly lyofilizovány. Získaný suchý zbytek byl nejmenno rozmělněn na laboratorním mlýnku a zvážen. Poté byl suchý zbytek vložen do celulózových extrakčních patron a extrahován 80% metanolem na Soxhletově extraktoru SER 148, při teplotě 210 °C, po dobu 45 minut. Extrakt byl částečně odpařen na vakuové odparce Laborata 4000-efficient. Po odebrání malého množství, pro stanovení sušiny na vahách s infračerveným zářičem při teplotě 105 °C, byl zbylý suchý podíl naředěn v DMSO na koncentraci 100 mg/ml.

Etanolové extrakty z hub byly připraveny dle Macakova et al. (2010). Plodnice vybraných druhů hub byly vyčištěny, zamrazeny v kapalném dusíku a uchovány v uzavřených nádobách v mrazničce při teplotě -23 °C. Před extrakcí byly rozmrazeny a rozemlety v laboratorním mlýnku, společně se

70% etanolem. Směs byla ponořena do ultrazvukové lázně po dobu 30 minut, při laboratorní teplotě. Takto ošetřená směs byla následně filtrována a vzniklý filtrát byl lyofilizován. Práškový extrakt byl uchován při teplotě -80 °C, do doby testování vzorků v atmosféře obsahující argon. Vzorky pocházející z *L. edodes* a *G. lucidum* byly připraveny obdobným způsobem. Vzorky byly naředěny v DMSO, na koncentraci 50 mg/ml.

### 3.2.1. Obsah celkový fenolových sloučenin

Obsah celkových fenolových sloučenin (total phenolic content – TPC) byl stanoven za použití modifikované metody, kterou dříve popsal Sharma and Bhat (2009). Použita byla 96-jamková destička, kde bylo 100  $\mu$ l vzorku zředěno 100  $\mu$ l redestilované vody. Poté bylo přidáno 25  $\mu$ l čistého Folin-Ciocalteu činidla. Destička byla vložena na orbitální třepačku, při 40 otáčkách za minutu, na dobu 10 minut. Reakce byla zahájena přidáním 75  $\mu$ l 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Směs byla udržována v temnu, při teplotě 37 °C, po dobu 2 hodin. Absorbance byla měřena při 765 nm, za použití TECAN M200 Infinite reader (Tecan, CH). Výsledky jsou vyjádřeny jako ekvivalent gallové kyseliny (Gallic acid ekvivalent – GAE) mg/l džusu.

### 3.2.2 Stanovení obsahu $\beta$ -glukanů

Obsah  $\beta$ -glukanu byl stanoven pomocí Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan Assay kit K-YBGL (Megazyme). Enzymová sada obsahuje exo-1,3- $\beta$ -glukanázu,  $\beta$ -glukosidázu, amyloglukosidázu, invertasu, činidlo určující glukózu (GOPOD-glukózooxidáza, peroxidáza, 4-aminoantipyrin) a standardní roztok glukózy. Pro stanovení celkových glukanů bylo naváženo 10 mg rozemletého vzorku a přidáno 150  $\mu$ l koncentrované HCl s následujícím promísením na vortexu. Dále byly vzorky zahřáty ve vodní lázni o teplotě 30 °C po dobu 45 minut, přičemž se každých 15 minut promíchaly na vortexu. Po uplynutí stanovené doby bylo ke vzorkům přidáno 1 ml destilované vody a znovu promícháno na vortexu. S uvolněným víčkem se na 5 minut vzorky vložily do vroucí vodní lázně o teplotě 100 °C. Po uplynutí této doby se víčko utáhlo a vzorek jsme nechali inkubovat další 2 hodiny. Dále se zkumavka ochladila na pokojovou teplotu a bylo přidáno 1 ml 2M KOH. Doplní se 750  $\mu$ l 200 mM pufrům octanu sodného s následnou vortexací. Vzorky jsme nakonec odstředili na centrifuze při 1500  $\times$  g, po dobu 10 minut. Měření vzorků pro určení celkových glukanů proběhlo tak, že z připraveného vzorku pro glukany se odpipetovalo 100  $\mu$ l do zkumavky, dále se přidala směs exo-1,3- $\beta$ -glukanázy (20 U/ml) a  $\beta$ -glukosidázy (4 U/ml) ve 200 mM pufru octanu sodného. Následovala inkubace trvající 60 minut při 40 °C. Po uplynutí této doby se přidaly 3 ml roztoku GOPOD a naposledy byly inkubovány po dobu 20 minut a 40 °C. Absorbance se měřila při 510 nm, oproti slepému vzorku glukózy, v 200  $\mu$ l jamkových mikrotitračních destičkách za použití TECAN M200 Infinite reader.



Obsah  $\alpha$ -glukanů byl stanoven enzymatickou hydrolýzou s pomocí amyloglukosidázy a invertázy. Pro určení měření  $\alpha$ -glukanů se navázilo 10 mg vzorku, přidalo se 200  $\mu$ l 2M KOH a směsi jsme nechali stát 20 minut v ledové vodní lázni. Následovalo přidání 800  $\mu$ l 1,2 M pufru octanu sodného (pH 3,8) a 20  $\mu$ l směsi amyloglukosidázy (1630 U/ml) s invertázou (500 U/ml). Po promísení na vortexu se roztok vložil do teplé vodní lázně 40 °C, na dobu 30 minut, s občasným promícháním. Následovalo odstředění na centrifuze při 1500  $\times$  g, po dobu 10 minut. Objem supernatantu se přenesl v množství 1 ml do 15 ml zkumavky za přidání 0,1 ml octanového pufru (200mM) a 2 ml roztoku GOPOD. Zkumavka byla inkubována při teplotě 40 °C po dobu 20 minut. Následně byl obsah napipetován v objemu 200  $\mu$ l do 96-jamkové destičky a měřen společně se slepým vzorkem při absorbanci 510 nm v 200  $\mu$ l jamkových mikrotitračních destičkách za použití TECAN M200 Infinite reader.

Obsah  $\beta$ -glukanů se vypočetl odečtením  $\alpha$ -glukanů z celkového množství glukanů. Všechny složky glukanů byly vyjádřeny poměrem glukózy v mg, na 100 mg sušiny. Následně byly výsledky přepočteny na mg  $\beta$ -glukanů/g sušiny.

### 3.2.3 Stanovení antioxidační aktivity

K stanovení antioxidační aktivity byla použita s modifikacemi metoda ORAC, popsaná Ou et al. (2001). Před pokusem byl připraven zásobní roztok AAPH (2,2-azobis 2-amidopropan dihydrochlorid) a FL v 75 mmol fosfátovém pufru (pH 7,0). 25  $\mu$ l každého vzorku se zředilo 150  $\mu$ l FL (48 mmol) a inkubovalo se při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Reakce byla zahájena přidáním 25  $\mu$ l AAPH (153 mmol), čímž byl získán konečný objem 200  $\mu$ l do každé jamky. Změny fluorescence byly měřeny v jednominutových intervalech po dobu 120 minut s použitím TECAN M200 Infinite reader, s emisní a absorpční vlnovou délkou stanovenou na 494 nm a 518 nm. Kvantifikace antioxidační kapacity byla stanovena podle plochy pod kalibrační křivkou, jak navrhl (Cao and Prior, 1999) a byly vyjádřeny jako  $\mu$ mol TE (ekvivalent troloxu)/g extraktu.

Druhou metodou byla metoda DPPH, provedena dle Sharma and Bhat (2009). Do řádku mikrotitrační destičky bylo připraveno sedm dvojnásobných ředění, přičemž vzorky byly připraveny na 80% MeOH (175  $\mu$ l), v 96-jamkových destičkách. Následně bylo přidáno 25  $\mu$ l čerstvě připraveného 4 mmol DPPH v MeOH, do každé jamky (konečný objem 200  $\mu$ l). Směs byla udržována v temnu, při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Absorbance byla měřena při 517 nm, za použití TECAN M200 Infinite reader. Výsledky byly vyjádřeny jako  $\mu$ mol TE/g extraktu.

### 3.2.4 Kultivace buněčných tkání

Buněčné linie myších makrofágů RAW264.7 byly kultivovány v mediu RPMI 1640, které obsahovalo 10 % FBS, 1 % roztok penicilínu a streptomycinu (100 000 jednotek penicilinu; 10 mg/ml

streptomycinu), 1 % neesenciálních aminokyselin, 2 mmol glutaminu a 2% roztoku glukózy. Buňky kolorektálního karcinomu zastoupené liniemi Caco-2 a HT-29 byly kultivovány v mediu DMEM, které obsahovalo 10 % FBS, 1 % roztoku penicilinu a streptomycinu (100 000 jednotek penicilinu; 10 mg/ml streptomycinu), 1% hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného a 1 % roztoku neesenciálních aminokyselin. Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm<sup>2</sup>) s 10 ml RPMI respektive 15 ml DMEM media, které byly uloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 5% CO<sub>2</sub> a teplotu 37 °C.

Buněčná linie RAW264.7 byly kultivována 2 dny a buňky byly mechanicky uvolňovány. Buněčné linie Caco-2 a HT-29 byly kultivovány 7-8 dní (každé dva dny krmeny novým médiem) a uvolňovány pomocí tripsinu. Buněčné linie byly centrifugovány při 700 × g (RAW264.7) a 200 × g (Caco-2 a HT-29). Supernatant byl odstraněn a buňky byly naředěny v novém mediu a přeneseny do nové kultivační láhvy na další kultivovány.

### **3.2.5. Inhibice oxidu dusnatého**

Inhibice NO byla provedena dle Wang a Mazze (2002), která byla modifikována. Suspenze buněk naředěných na koncentraci  $1 \times 10^5$  buněk/ml, byly pipetovány do 96-jamkové destičky v množství 100 µl. Destička byla vložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru na dobu 2 hodiny. Po dvou hodinách byly přidány testované vzorky společně s LPS, obsažené ve 100 µl media tak, aby byla dosažena požadovaná koncentrace extraktu (500–0,24 µl/ml), a LPS (1 µg/ml) ve 200 µl. Destička byla vložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru na dobu 24 hodin. Poté došlo k odebrání 50 µl supernatantu, který byl v nové 96-jamkové destičce smíchan s 50 µl Griessova činidla. Absorbance byla měřena při 540 nm, za použití TECAN M200 Infinite reader. Obsah NO byla změřena pomocí kalibrační křivky dusitanu sodného.

### **3.2.6. Test cytotoxicity (MTT)**

Cytotoxicita byla měřena pomocí metody MTT dle Mosman (1983). Test toxicity na buněčnou linii RAW264.7 probíhal po testu inhibice NO. Z 96-jamkové destičky bylo odstraněno medium, přidáno nové medium s MTT (1 µg/ml) a vloženo do CO<sub>2</sub> inkubátoru na dobu dvou hodin.

U buněk kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29 byl postup následující. Buňky byly naředěny na koncentraci  $2,5 \times 10^3$  buněk/ml a pipetovány do 96-jamkové destičky v množství 200 µl. Po 24 hodinách bylo odstraněno staré medium a přidáno 100 µl nového media spolu s testovanými vzorky v daných koncentracích (500–0,24 µl/ml). Testované vzorky s buňkami byly inkubovány po dobu 72 hodin. Dále bylo postupováno stejně jako u buněčné linie RAW264.7. Teby bylo odstraněno staré medium a nahrazeno novým s MTT (1 µg/ml). Po 2 hodinách v CO<sub>2</sub> inkubátoru bylo medium s MTT opět odstraněno a nahrazeno 100 µl DMSO. Absorbance byla měřena při 555 nm a 720 nm, jako

referenční hodnoty, za použití TECAN M200 Infinite reader. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno, v porovnání s kontrolou, kde byly buňky bez přidání testovaných látek.

### 3.2.7. Imunomodulační aktivita granulocytů

Izolace granulocytů probíhala z lidské krve, kdy množství 30 ml 20% buffy coatu bylo naředěno v PBS a opatrně nanášeno na vrstvu 10 ml alternativě Histopaque 1077 v 50 ml zkumavce s kónickým dnem. Vše bylo odstředěno na centrifuze při  $400 \times g$ , po dobu 30 minut při teplotě 22 °C. Peleta (složená z erytrocytů a granulocytů) byla ponechána ve zkumavce, zatímco supernatant byl odstraněn. Dále bylo přidáno 30 ml lyzačního pufru pro lýzu erytrocytů. Následně došlo k promíchání a odstředění při  $300 \times g$ , po dobu 15 minut. Lyzační krok byl několikrát opakován. Již bílá peleta byla dále propláchnuta v PBS a opatrně resuspendována, ve 3 ml PBS. Buněčná suspenze byla poté zředěna v PBS, na konečnou koncentraci  $3 \times 10^6$  buněk/ml.

Při chemiluminiscenčním testu byly vzorky Polyporales sériově ředěny ve třech opakováních v koncentračním rozmezí od 31 do 250  $\mu\text{g/ml}$  byly připraveny v 96-jamkové bílé mikrotitrační destičce tak, aby každá jamka obsahovala 100  $\mu\text{l}$  extraktu. Následně bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  suspenze izolovaných granulocytů ( $3 \times 10^6$  buněk/ml), dále bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  luminolu (0,5 mg/ml) a nakonec bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  standardizovaného roztoku zymosanu. Konečný objem v jamce tak činil 250  $\mu\text{l}$ . Vodný extrakt z *G. lucidum* byl použit jako vnitřní standard na každé destičce z důvodu opakovatelnosti pokusu. Nakonec byla zařazena pozitivní kontrola, která obsahovala LPS a negativní kontrola, bez LPS. Připravená destička byla měřena v TECAN M200 Infinite reader, při teplotě 37 °C, ve dvouminutových intervalech po dobu 3 hodin. Schopnost extraktů zvýšit fagocytózu neutrofilů byla vypočtena na základě sklonu křivky ve fázi růstu ve srovnání s neostřenou kontrolou, která byla považována za 100 %. Tato hodnota je označena jako fagocytární index (FI). Koncentrace, při níž extrakty vykazovaly nejvyšší FI je uvedena jako  $\text{Konc}_{\text{max}}$  (koncentrace max).

### 3.3. Statistické vyhodnocení

Získané výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Zjištěné hodnoty byly dále testovány metodou ANOVA, s následným t-testem pro vícenásobná porovnání s Bonferoniho korekcí, na hladině významnosti  $p < 0,01$  a  $p < 0,05$ . Lineární korelační koeficient ( $r$ ) byl stanoven u džusů mezi TPC a ORAC; ORAC a produkce NO; TPC a produkce NO. U metanolových extraktů z ovoce a zeleniny mezi ORAC a DPPH. U hub byl stanoven mezi  $\beta$ -glukany a FI<sub>max</sub>; TPC a FI<sub>max</sub>. Statistické vyhodnocování bylo provedeno v Excelu a IBM SPSS ver. 20.

## 4. Výsledky

### 4.1. Ovoce a zelenina

Výsledky testů antioxidační aktivity prokázaly, že metanolové extrakty mají vyšší antioxidační aktivitu při použitých metodách, než džusy. Naopak u džusů byla výraznější schopnost snižovat produkci oxidu dusnatého než u metanolových extraktů. Tato schopnost byla zjištěna i u vzorků džusů, u kterých byla prokázána nejnižší koncentrace fenolových látek.

#### 4.1.1 Antioxidační aktivita džusů

Při porovnání výsledků získaných pomocí metody ORAC u vzorků džusů, byla nejvyšší antioxidační aktivita zjištěna u borůvek  $438,5 \pm 12,3$   $\mu\text{mol TE/g}$  extraktu (tab. 1). Druhým nejvíce aktivním vzorkem byl citron, jehož aktivita dosahovala  $164,6 \pm 36,7$   $\mu\text{mol TE/g}$  extraktu, třetí nejvíce aktivním vzorkem se ukázala ředkev bílá s hodnotou  $146,0 \pm 5,5$   $\mu\text{mol TE/g}$  extraktu. Dále následovaly vzorky z jablka, malin, papriky, mandarinky, brokolice, cibule a celeru, jejichž aktivita se pohybovala v rozmezí 142 až 107  $\mu\text{mol TE/g}$  extraktu. V pořadí další hodnoty antioxidační aktivity byly zjištěny u vzorků pomeranče, mrkve, černého rybízu, kiwi, broskve, vodnice a petržele. Antioxidační aktivita těchto vzorků se pohybovala v rozmezí 92 až 30  $\mu\text{mol TE/g}$  extraktu. Nejnižší antioxidační aktivity byly zaznamenány u rajčete ( $7,7 \pm 0,4$   $\mu\text{mol TE/g}$  extraktu) a okurky ( $3,8 \pm 0,2$   $\mu\text{mol TE/g}$  extraktu).

V rámci práce byla zjišťována i schopnost testovaných džusů inhibovat produkci oxidu dusnatého, který byl produkován LPS stimulovanými makrofágy buněčné linie RAW264.7 (tab. 1). Z celkového počtu 16 vzorků, které byly použity pro stanovení inhibice produkce NO, vykazovalo 11 vzorků schopnost snižovat produkci NO při koncentraci 1 000  $\mu\text{g/ml}$ . Významnost rozdílů mezi jednotlivými vzorky byla stanovena pomocí vícenásobného *t*-testu, s Bonferroniho korekcí při  $p < 0,05$ , vzhledem ke kontrole s přídatkem LPS, která představovala 100 % produkce NO. Vzorky citronu, petržele a okurky nebyly do statistického zpracování zahrnuty, vzhledem k jejich toxickému účinku na buněčnou linii RAW264.7 (viz podkapitola 4.1.3. antiproliferační aktivita).

Nejvýraznější schopnost snižovat produkci NO na buněčné linii RAW264.7 měl džus z cibule, která produkci NO snížila o 57 %, následována mandarinkou (52 %). U broskve, mrkve, malin, ředkve bílé, celeru, kiwi, rajčete, papriky, pomeranče, okurky, brokolice a jablka došlo k poklesu produkce NO o 48 až 24 %. Snížení produkce NO bylo zaznamenáno u borůvek o 23 %, a červeného rybízu, který snižoval produkci o 13 %.

Po stanovení antioxidační aktivity nás zajímalo, zda za tuto aktivitu nejsou zodpovědné fenolové sloučeniny přítomné v ovoci a zelenině (tab.1). Pokud porovnáme získané výsledky z testovaných vzorků džusů ovoce a zeleniny, byl nejvyšší obsah fenolových látek zjištěn u borůvek. Fenolové látky byly u tohoto vzorku džusu v koncentraci  $1603,2 \pm 73$   $\text{mg GAE/l}$ . Poloviční koncentrace, proti výše

uvedené, byla zaznamenána u papriky (642,1±33,1 mg/l džusu) a černého rybízu (636,9±12,1 mg GAE/l džusu).

**Tabulka 1:** Ovocné a zeleninové džusy - obsah fenolových sloučenin, antioxidační a antiproliferční aktivita

Vzorek džusu	TPC	ORAC	Produkce NO	Toxicita
	mg GAE/l džusu (průměr±SD)	μmol TE/g sušiny (průměr±SD)	%	
Borůvky	1603,2±73,0	438,5±12,2	77*	N
Paprika	642,1±33,1	127,9±0,7	67*	N
Červený rybíz	636,9±12,1	82,4±2,6	87	N
Maliny	598,2±3,3	139,0±23,0	54*	N
Kiwi	530,8±22,5	30,1±1,6	60*	N
Cibule	407,3±17,1	107,1±17,7	43*	N
Brokolice	405,6±8,4	111,2±22,3	74	N
Pomeranč	392,2±14,3	91,6±5,6	69*	N
Ředkev bílá	368,2±7,7	146,0±5,5	55*	N
Vodnice	295,1±36,6	45,2±2,4	71	N
Petržel	288,6±6,7	34,3±1,9	56	T
Celer	281,7±3,4	107,5±1,9	56*	N
Mandarinka	250,0±13,8	121,8±1,2	48*	N
Mrkev	241,9±14,9	91,1±0,6	52*	N
Broskev	240,3±13,6	59,4±1,9	86	N
Jablko	160,1±7,4	147,9±8,9	76	N
Citron	152,2±1,5	164,6±36,7	45	T
Okurka	71,0±3,1	3,8±0,2	70	T
Rajče	45,2±1,4	7,7±0,4	61*	N
LPS	-	-	100	N

GAE – ekvivalent kyseliny gallové; TE – ekvivalent troloxu; SD – směrodatná odchylka; \* statistická významnost  $p < 0,05$ ; N- ne cytotoxická, T - cytotoxická koncentrace snižující životaschopnost makrofágů  $< 90$  %

Dále je následovaly vzorky malin, kiwi, cibule, brokolice, pomeranče, ředkve bílé, vodnice, petržele, celeru, mandarinky, mrkve, broskve a jablka, kdy se koncentrace pohybovala v rozmezí 598 až 160 mg GAE/l džusu. Nejnižší obsah fenolových sloučenin byl zjištěn u citronu (152,2±1,5 mg GAE/l džusu), ještě nižší než poloviční koncentrace, proti džusu z citronu, byla zjištěna u okurky (71,0±3,1 mg GAE/l džusu) a vůbec nejnižší hodnota byla zjištěna u rajčete (45,2±1,4 mg GAE/l džusu).

Porovnáním výsledků obsahu fenolových sloučenin stanovených metodou TPC a antioxidační aktivity stanovené metodou ORAC je patrné, že mezi hodnotami stanovenými metodou TPC a ORAC je středně silná korelační závislost ( $r = 0,6539$ ). Naopak při porovnání obsahu fenolových sloučenin se schopností inhibovat produkci NO je patrné, že hodnoty nekorelují ( $r = 0,0774$ ). Lze tedy předpokládat, že schopnost inhibovat produkci NO není ovlivněna obsahem celkových fenolových

sloučenin. Může se jednat o jiný typ sloučenin nebo může významnou roli hrát také specifita účinku daného ligandu.

#### 4.1.2. Antioxidační aktivita extraktu

Celkem bylo testováno 27 metanolových extraktů pomocí metody ORAC (tab. 2). Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u extraktů z borůvek ( $836,6 \pm 24,1$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny), ředkve bílé ( $724,5 \pm 17,1$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny) a malin ( $592,7 \pm 19,3$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny). Následovaly je extrakty z brokolice, papriky, mandarinky, karamboly, citronu, třešně a pomeranče, kdy antioxidační aktivita se pohybovala v rozmezí 535 až 294  $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny. U angreštu byla antioxidační aktivita  $291,5 \pm 5,3$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny, u mrkve ( $263,2 \pm 8,3$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny) a u jablka s hodnotou  $165,0 \pm 6,7$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny. Dále následovaly vzorky s antioxidační aktivitou menší než 150  $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny. Tato hodnota byla stanovena jako hraniční ( $\geq 150$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny – významná antioxidační aktivita) pro další testování antioxidační aktivity. Vyšší hodnota než hraniční nebyla zjištěna u extraktů avokáda, čínského zelí, rajčete, nashi, petržele, celeru, broskve, vodnice, cibule, banánu, okurky, khaki, kiwi a papáji. Antioxidační aktivita u těchto extraktů byla v rozpětí 138 až 16  $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny.

Dále byly, za pomoci metody DPPH testovány vzorky (tab.2), u kterých byla hodnota ORAC vyšší než 150  $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny. Nejvyšší hodnoty dosahovaly vzorky, borůvky ( $404,6 \pm 15,4$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny), karamboly ( $325,4 \pm 15,3$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny) a angreštu ( $189,0 \pm 3,8$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny) a papriky ( $154,1 \pm 0,1$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny). Následovaly je extrakty z brokolice, třešně, citronu, mrkve a ředkve bílé s hodnotou 87 až 52  $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny. Nejnižších hodnot antioxidační aktivity bylo dosaženo u extraktů z malin ( $48,2 \pm 0,1$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny), jablka ( $26,2 \pm 2,7$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny) a mandarinky  $18,7 \pm 0,1$   $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny.

Po stanovení antioxidační aktivity vyšší než 150  $\mu\text{mol TE/g}$  sušiny, měřené pomocí metody ORAC, byly vzorky následně testovány pomocí metody DPPH na schopnost inhibice produkce NO stejně, jako v případě ovocných a zeleninových džusů (tab.2). Celkem tedy bylo pomocí metody DPPH testováno 13 metanolových extraktů na schopnost snižovat produkci NO. Významnost rozdílů mezi jednotlivými vzorky byla stanovena pomocí t-testu  $p < 0,05$ , vzhledem ke kontrole s přidavkem LPS, která představovala 100 % produkce NO.

Z výsledků bylo patrné, že statisticky významné hodnoty byly u 3 vzorků extraktu, které měly schopnost snižovat produkci NO, na buněčné linii myších makrofágu RAW264.7 při koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Nejvýraznější schopnost snižovat produkci NO na buněčné linii RAW264.7 byla u extraktu z jablka, který byl schopný snížit produkci NO o 34 % a dokonce jako jediný extrakt při koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  inhiboval produkci o 13 %. Dalším extraktem schopným inhibovat produkci NO byla brokolice, která snižovala produkci o 21 %. Třetím účinným extraktem byl vzorek z pomeranče, který inhiboval produkci o 10 %.

Porovnáním výsledků metod ORAC a DPPH je mezi hodnotami střední vzájemná korelace ( $r = 0,444$ ).

**Tabulka 2:** Antioxidační a antiproliferační aktivita metanolových extraktů ovoce a zeleniny

Jedlý plod	ORAC	DPPH	Produkce NO	Toxicita
	( $\mu\text{mol TE/g sušiny}$ ) $\pm\text{SD}$	( $\mu\text{mol TE/g sušiny}$ ) $\pm\text{SD}$	(%)	
Borůvky	836,6 $\pm$ 24,1	404,6 $\pm$ 15,4	77	T
Ředkev bílá	724,5 $\pm$ 17,1	52,2 $\pm$ 3,3	86	N
Maliny	592,7 $\pm$ 19,3	48,2 $\pm$ 0,1	74	T
Brokolice	532,3 $\pm$ 18,7	87,4 $\pm$ 5,6	79*	N
Paprika	530,0 $\pm$ 18,6	154,1 $\pm$ 0,1	91	N
Mandarinky	483,3 $\pm$ 13,6	18,7 $\pm$ 0,1	82	N
Karambola	439,3 $\pm$ 10,8	325,4 $\pm$ 15,3	81	N
Citron	422,0 $\pm$ 14,1	70,0 $\pm$ 0,8	79	T
Třešně	404,7 $\pm$ 2,0	77,7 $\pm$ 1,2	68	N
Pomeranč	293,6 $\pm$ 5,7	16,81 $\pm$ 0,3	90*	N
Angrešt	291,5 $\pm$ 5,3	189,0 $\pm$ 3,8	91	N
Mrkev	263,2 $\pm$ 8,3	64,3 $\pm$ 6,4	84	N
Jablko	165,0 $\pm$ 6,7	26,2 $\pm$ 2,7	66*	N
Avokádo	137,5 $\pm$ 0,3	-	-	-
Čínské zelí	131,3 $\pm$ 4,3	-	-	-
Rajče	120,9 $\pm$ 3,9	-	-	-
Nashi	113,3 $\pm$ 2,8	-	-	-
Petržel	106,5 $\pm$ 0,5	-	-	-
Celer	102,1 $\pm$ 2,4	-	-	-
Broskev	86,9 $\pm$ 5,5	-	-	-
Vodnice	86,1 $\pm$ 4,6	-	-	-
Cibule	66,9 $\pm$ 2,3	-	-	-
Banán	65,3 $\pm$ 1,5	-	-	-
Okurka	44,8 $\pm$ 2,2	-	-	-
Khaki	42,5 $\pm$ 3,4	-	-	-
Kiwi	36,8 $\pm$ 2,2	-	-	-
Papája	16,1 $\pm$ 0,4	-	-	-
LPS	-	-	100	N

\* statistická významnost  $p < 0,05$ ; GAE – ekvivalent kyseliny gallové; TE – ekvivalent troloxu; N- necytotoxická, T - cytotoxická koncentrace snižovala životaschopnost makrofágů  $< 90 \%$

#### 4.1.3. Antiproliferační aktivita

V rámci testu stanovení produkce oxidu dusnatého byla zjišťována cytotoxicita džusů a extraktů. Hlavním kritériem byla hranice 90% životaschopnosti buněčné linie RAW264.7. U džusu byla z celkového počtu 19 vzorků životaschopnost buněk při koncentraci 1 000  $\mu\text{g/ml}$  menší než 90 % pouze u 3 vzorků (tab. 1). Jednalo se o vzorky z petržele, citronu a okurky. Výsledky stanovení

cytotoxicity u metanolvých extraktů byly obdobné. Cytotoxicita (< 90 %) byla taktéž zjištěna pouze u 3 vzorků a to u borůvky, maliny a citronu (tab. 2). Výsledky těchto vzorků nebyly dále využity při hodnocení schopnosti vzorků snižovat produkci NO. U ostatních vzorků byla životaschopnost > 90 % a byly dále použity při stanovení inhibice produkce NO.

## 4.2. Houby

### 4.2.1. Chemická charakterizace

Výsledky ukazují (tab. 3), že nejvyšší obsah  $\beta$ -glukanů byl zjištěn u *S. crispa* a to ve výši 117,4 $\pm$ 3,2 mg/g extraktu. Ostatní vzorky obsahovaly méně než 100 mg/g extraktu. Druhou v pořadí byla *N. lepideus*, s koncentrací 69 $\pm$ 0,4 mg/g extraktu a *A. biennis*, s 67,5 $\pm$ 0,2 mg/g extraktu. Následovaly *L. tigrinus*, *P. squamosus*, *P. conchatus*, s koncentrací  $\beta$ -glukanů 54,5 až 21,5 mg/g extraktu. Nejnižší koncentrace byla zaznamenána u *L. sulphureus* (17,0 $\pm$ 0,0 mg/g extraktu) a *P. umbellatus*, kdy koncentrace  $\beta$ -glukanů dosahovala 13,4 $\pm$ 0,8 mg/g extraktu. Ke stanovení  $\beta$ -glukanů u extraktu *R. badius* nedošlo z důvodu nedostatku vzorku.

**Tabulka 3:** Obsah  $\beta$ -glukanů a celkových fenolových látek, v testovaných etanolvých extraktech hub z řádu Polyporales.

Název	$\beta$ -Glukany	TPC
	mg/g extrakt (průměr $\pm$ SD)	$\mu$ mol GAE/g extrakt (průměr $\pm$ SD)
<i>Abortiporus biennis</i>	67,5 $\pm$ 0,2	149,4 $\pm$ 35,7
<i>Laetiporus sulphureus</i>	17,0 $\pm$ 0,0	135,0 $\pm$ 25,0
<i>Lentinus tigrinus</i>	54,5 $\pm$ 0,3	216,2 $\pm$ 30,1
<i>Neolentinus lepideus</i>	69,6 $\pm$ 0,4	82,3 $\pm$ 17,2
<i>Panus conchatus</i>	21,5 $\pm$ 0,0	67,4 $\pm$ 18,4
<i>Polyporus squamosus</i>	38,4 $\pm$ 0,5	41,6 $\pm$ 4,4
<i>Polyporus umbellatus</i>	13,4 $\pm$ 0,8	80,5 $\pm$ 19,4
<i>Royoporus badius</i>	n.t.	257,8 $\pm$ 41,4
<i>Sparassis crispa</i>	117,4 $\pm$ 3,2	85,4 $\pm$ 22,9
<i>Trametes versicolor</i>	62,5 $\pm$ 0,4	137,9 $\pm$ 28,4
Standard a kontrola		
<i>Lentinula edodes</i> (EtOH extract)	69,4 $\pm$ 1,6	48,0 $\pm$ 9,2
<i>Ganoderma lucidum</i> (EtOH extract)	20,6 $\pm$ 1,3	257,9 $\pm$ 48,1
<i>Ganoderma lucidum</i> (H <sub>2</sub> O extract)	64,3 $\pm$ 1,0	191,1 $\pm$ 37,8

GAE – ekvivalent kyseliny gallové; n.t. - netestováno

Dále byl u vzorků hub stanoven obsah fenolových sloučenin. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u *R. badius* (257,8 $\pm$ 41,4  $\mu$ mol GAE/g extraktu), o 17 % nižší obsah byl zjištěn u *L. tigrinus* (216,2 $\pm$ 30,1  $\mu$ mol GAE/g extraktu). Dále, co do zjištěné hodnoty, následovaly vzorky *A. biennis*, *L. sulphureus*, *S. crispa* a *N. lepideus* s hodnotou TPC 149,4 až 82,3  $\mu$ mol GAE/g extraktu. Nejnižší



obsah fenolových sloučenin byl zjištěn u *P. umbellatus* (80,5±19,4 µmol GAE/g extraktu), *P. conchatus* (67,4±18,4 µmol GAE/g extraktu) a u *P. squamosus*, jejíž hodnota TPC byla 41,6±4,4 µmol GAE/g extraktu.

Porovnáním výsledků imunomodulační aktivity s obsahem β-glukanů a fenolových sloučenin je patrné, že hodnoty imunomodulační aktivity s obsahem β-glukanů korelují jen velmi slabě ( $r = 0,1515$ ). Hodnoty imunomodulační aktivity s obsahem celkových fenolových sloučenin nekorelují korelují ( $r = 0,0018$ ). Schopnost stimulovat imunomodulační aktivitu bude způsobena i jinými vlivy, než jsou β-glukany, případně fenolové sloučeniny.

#### 4.2.2. Imunomodulační aktivita

V rámci stanovení imunomodulační aktivity hub byl zjišťován vliv etanolových extraktů na aktivitu fagocytů (tab. 4). Z 10 testovaných vzorků byla pozorována tato statisticky významná aktivita pomocí Bonferroniho testu s hladinou významnosti  $p < 0,01$ , u vzorků z extraktů hub *N. lepideus* (155±18 %) a *P. squamosus* (141±8 %).

**Tabulka 4:** Cytotoxické vlastnosti extraktu Polyporales a jejich vliv na fagocytární reakci izolovaných neutrofilů.

Název	Cytotoxicity IC <sub>50</sub> (µg/mL)		Neutrofilní fagocytóza	
	HT-29 (průměr±SD)	Caco-2 (průměr±SD)	FI <sub>max</sub> <sup>#</sup> (průměr±SD)	Konc <sub>max</sub> <sup>¥</sup> (µg/ml)
<i>Abortiporus biennis</i>	>500	>500	122±22	125
<i>Laetiporus sulphureus</i>	>500	>500	74±1	31
<i>Lentinus tigrinus</i>	>500	>500	144±19	250
<i>Neolentinus lepideus</i>	>500	>500	<b>155±18**</b>	250
<i>Panus conchatus</i>	>500	>500	141±9	125
<i>Polyporus squamosus</i>	>500	>500	<b>141±8**</b>	125
<i>Polyporus umbellatus</i>	>500	>500	103±9	62
<i>Royoporus badius</i>	>500	>500	113±11	31
<i>Sparassis crispa</i>	107±16	>500	<b>16±9**</b>	31
<i>Trametes versicolor</i>	>500	>500	104±5	125
Standard a kontrola				
<i>Lentinula edodes</i> (EtOH extrakt)	302±54	>500	56±2	62
<i>Ganoderma lucidum</i> (EtOH extrakt)	151±21	>500	108±6	31
<i>Ganoderma lucidum</i> (H <sub>2</sub> O extrakt)	-	-	<b>190±41**</b>	93
LPS	>100	>100	116±9	6 (ng/ml)
Neošetřená kontrola			100±31	-

Cytotoxické účinky referenčních vzorků a kontrolních vzorků na epiteliální buňky kolorektálního karcinomu buněčné linie Caco-2 a HT-29 a jejich vliv na fagocytární aktivitu izolovaných lidských neutrofilních granulocytů; <sup>#</sup>, maximální fagocytární index dosažený při srovnání s kontrolou (100 %); <sup>¥</sup>, koncentrace s nejvyšší hodnotou fagocytárního indexu; hvězdičky ukazují významnost středních hodnot pro tři vzájemná měření ve srovnání s kontrolou \*\* ( $p < 0.01$ ).

Dále, z hlediska naměřených hodnot následovaly etanolové extrakty *L. tigrinus*, *P. conchatus*, *R. badius*, *A. biennis*, *P. umbellatus*, kdy fagocytární index byl v rozpětí 103 až 122 %. Nejnižších hodnot dosahovala *T. versicolor*, s hodnotou  $105 \pm 5$  %, *L. sulphureus* ( $74 \pm 1$  %). Nejnižší hodnoty dosáhla *S. crispa*, u které došlo k 84% snížení fagocytárního indexu na hodnotu  $16 \pm 9$  %.

#### 4.2.3. Antiproliferační aktivita

Vliv etanolových extraktů na antiproliferační aktivitu byl zjišťován na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29 (tab. 2). Z výsledků uvedených v tabulce 8 je patrné, že námi testované extrakty neprokázaly žádný antiproliferační účinek. Výjimkou jsou jen mírné cytotoxické účinky na buněčnou linii HT-29 u extraktu *S. crispa* se zjištěnou hodnotou  $IC_{50}$   $107 \pm 16$   $\mu$ g/ml. U kontrol byla cytotoxicita zjištěna u extraktu *L. edodes* ( $IC_{50}$  =  $302 \pm 54$   $\mu$ g/ml) a *G. lucidum* s hodnotou  $IC_{50}$   $151 \pm 21$   $\mu$ g/ml, na buněčné linii HT-29. U ostatních extraktů nebyla zaznamenána cytotoxicita na buněčné linii HT-29 a ani na buněčné linii Caco-2. U této linie nebyla zaznamenána žádná aktivita.

### 5. Diskuze

Hledání nových rostlin a účinných látek, které mají schopnost snižovat oxidační stres, způsobující celou řadu onemocnění, je současným trendem mnoha výzkumných týmů. Se stoupající popularitou „zdravého“ životního stylu, stoupá na oblibě i ovoce, zelenina a nápoje z nich – džusy. Podobně v populaci vzrůstá popularita konzumace různých hub, které mají proklamovaný účinek na lidské zdraví. Příkladem houby jsou využívány v tradiční čínské medicíně. Jejich příbuzné druhy hub, běžně rostoucí v našich lesích, by mohly mít podobné pozitivní účinky na lidské zdraví. Často je zdůrazňována imunomodulační funkce hub, včetně jejich potenciálu snižovat následky působení volných radikálů a oxidačního stresu. Na tuto problematiku je zaměřena celá řada studií, od nejširších screeningů, po nejužší testování jejich biologických vlastností. V souladu s obecnými výzkumnými trendy, které se věnují této problematice (Wang and Lin, 2000, Sun et al., 2002, Chu et al., 2002, Liu et al., 2002, Meyers et al., 2003, Wolfe et al., 2003, Wu et al., 2006, He and Liu, 2007, Jacob et al., 2008, Boivin et al., 2009, Gorinstein et al., 2009) je i tato práce. Pro přehlednost bude diskuze rozdělena na dvě části. První část je věnována ovoci a zelenině. Druhá část je věnována jedlým houbám a jejich biologické aktivitě.

#### 5.1. Ovoce a zelenina

Ovoce a zelenina jsou již po celá staletí nejdůležitějším zdrojem bioaktivních látek v lidské potravě. Postupem času lidstvo docházelo ke zjištění, že některé druhy ovoce a zeleniny mohou mít pozitivní vliv na lidské zdraví, aniž by se vědělo, co je důvodem tohoto vlivu. Až v posledních desetiletích vědci postupně poznávají, jaké bioaktivní sloučeniny jsou v ovoci a zelenině přítomné a jak fungují v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Mezi tyto sloučeniny patří i fenolové sloučeniny. Stanovení jejich celkového obsahu, například v ovoci a zelenině, řadíme mezi základní metody určení antioxidační aktivity. Aby bylo vytěženo co nejvíce

fenolových sloučenin, s antioxidační, antiproliferační a imunomodulační aktivitou z ovoce a zeleniny, je důležité zvolit vhodné rozpouštědlo, které je schopné pronikat do intracelulárního prostoru extrahovaného materiálu. Mezi taková vhodná rozpouštědla patří metanol, případně etanol, které jsou vhodnějším rozpouštědlem, nežli voda (Sun et al., 2007, Yu et al., 2005). To vysvětluje i rozdíly mezi výsledky antioxidační aktivity u džusů a metanolových extraktů, které byly zaznamenány během výzkumu. U metanolových extraktů byla dosažena, při použití stejné metody ORAC, vyšší antioxidační aktivita, než u džusů. Celkem bylo testováno 19 džusů a 27 metanolových extraktů. U řady testovaných vzorků byla zjištěna antioxidační a antiproliferační aktivita.

V následující části budou podrobněji diskutovány zjištěné výsledky u borůvek a jablka, jako zástupce ovoce a cibule, jako zástupce zeleniny. Důvodem tohoto výběru je skutečnost, že borůvky sice patří mezi lesní ovoce, lze je však úspěšně pěstovat i v domácích podmínkách. Vedle toho jablko je lidmi konzumováno celoročně a patří mezi ovoce, které se v našem jídelníčku vyskytuje nejčastěji. Jako zástupce zeleniny byla do diskuze zařazena cibule. Jedná se o běžně konzumovaný druh zeleniny, její užití je celoroční a může být formě tepelně opracované nebo ve formě syrové. Cibule je součástí velkého množství připravovaných pokrmů a díky tomu můžeme konstatovat, že bioaktivní sloučeniny v ní obsažené člověk konzumuje nejčastěji.

Extrakty z borůvek byly v naší studii mezi vzorky, které obsahovaly nejvíce celkových fenolových sloučenin a zároveň dosáhly vysoké antioxidační aktivity. Tyto výsledky zaznamenaly i další studie, ve kterých borůvky měly obdobnou koncentraci celkových fenolových sloučenin a antioxidační aktivitu (Rupasinghe and Clegg, 2007, Castagnini et al., 2015).

Existuje významný rozdíl, v obsahu celkových fenolových sloučenin, u komerčně pěstovaných borůvek a u divoce rostoucích borůvek. Ve druhém případě byl stanoven vyšší obsah fenolových sloučenin a obsah antokyanů (Giovanelli and Buratti, 2009), které mají antioxidační aktivitu měřitelnou *in vitro* metodami. Některé *in vitro* metody jsou citlivější než jiné. V praxi je tedy vhodné, ke zjištění antioxidační aktivity, využití dvou a více rozdílných *in vitro* metod, aby byl brán v úvahu různý způsob působení antioxidantů (Prior and Cao, 1999, Huang et al., 2005). Podobně tomu bylo i v případě naší studie, kdy jsme použili metody ORAC a DPPH. U metody DPPH jsme obecně zaznamenali nízké hodnoty antioxidační aktivity ve výsledcích.

Na antioxidační aktivitu má mimo jiné značný vliv genotyp, což se odráží ve značné variabilitě mezi dosaženými výsledky (Moyer et al., 2002). Antioxidační aktivita borůvek těsně koreluje s obsahem fenolových sloučenin ( $r = 0,92$ ) a s obsahem antokyanů ( $r = 0,77$ ), jak zjistil Prior et al. (1998), při použití *in vitro* metod. Hlavními antokyaniny borůvek jsou delphinidin a malvidin (Katsube et al., 2003), které představují 37,5 %, resp. 24,2 % všech antokyanů obsažených v borůvkách (Kalt et al., 1999).

Bylo prokázáno, že antokyaniny izolované z borůvek mají antiproliferační aktivitu na buněčné modely *in vitro* (Katsube et al., 2003, McDougall et al., 2008). Extrakty z borůvek snižují aktivitu matrix metaloproteinázy-9 a sekreci aktivátoru plazminogenového typu urikázy. Zároveň zvyšuje tkáňové inhibitory metaloproteinázy-1 a aktivátoru plazminogenu sekrecí inhibitoru-1, v buněčné linii adenokarcinomu lidského prsu MDA-MB-231 (Adams et al., 2010).

Značným problémem u výsledků *in vitro* metod, je jejich využití v *in vivo* studiích. Většina bioaktivních látek u rostlin a hub má cytotoxické účinky v buněčných kulturách i po přidání mikromolárních koncentrací (10–150  $\mu\text{M}$ ). Naproti tomu, farmakokinetické studie ukazují, že bioaktivní látky dosahují pouze nanomolárních koncentrací (1–20 nM), v krvi a tkáních, po jejich konzumaci v potravě (Stoner and Bruce, 2004, Stoner et al.,

2005). Rozdíl může být způsoben pravděpodobně tím, že si nejsme jisti, jak z potravy bohaté na antokyany dochází k jejich absorpci, distribuci, metabolismu a vylučování. Na základě *in vitro* studie zabývající se mikrobiální fermentací (Williamson and Clifford, 2010, Gonzalez-Barrio et al., 2011) je pravděpodobné, že přijaté antokyany se rozdělují (spontánně nebo enzymaticky) na produkty rozkladu fenolových sloučenin, které jsou dále metabolizovány. Obdobný výsledek byl pozorován v *in vivo* studii, sledující příjem extraktu borůvek u člověka. Přesto, že extrakt obsahoval celé spektrum fenolových sloučenin, zůstala velká část metabolitů neznáma. Jako hlavní metabolity byly zjištěny homovanilová a vanilinová kyselina (Nurmi et al., 2009). Homovanilová kyselina byla zjištěna i v novější *in vivo* studii, zabývající se metabolismem izotopově značeného kyanidin-3-glukosidu. Takto upravený antokyan byl podáván 8 mužům, ve věku od 20 do 36 let, kdy každý spotřeboval 500 mg antokyanů. Během experimentů bylo zjištěno 24 metabolitů, v koncentracích 0,1–42,2 pmol/l, z původně předpokládaného počtu 51 domnělých sledovaných metabolitů. Zjištěné metabolity byly kyseliny hydroxybenzeová, metoxybenzeová, fenylpripionová, izomer kyseliny methylhippurová, homovanilová, hydroxybenzylalkohol, kyselina benzo-4-sulfát a hydroxy-benzaldehydy. Tyto metabolity jsou v krvi měřitelné po dobu  $\leq 48$  hodin, po požití (Czank et al., 2013). Vliv konzumace borůvek na lidské zdraví byl ověřen v několika intervenčních studiích a lze předpokládat, že řada těchto účinků může s antioxidační aktivitou souviset. Ve skupině 120 zdravých mužů a žen věku mezi 40 až 74 let, byl příjem extraktu z borůvek (300 mg /den po dobu 3 týdnů) spojen s významným snížením plazmatické hladiny prozánětlivých cytokinů a chemokinů (IL 4, IL-13, IL-8 a IFN- $\alpha$ ) na dráze NF- $\kappa$ B (Karlsen et al., 2007). To může souviset s potlačením zánětlivých drah, možná i prostřednictvím sníženého oxidačního stresu.

U dvojité zaslepené zkřížené studie, provedené na skupině 8 mužů středního věku (38 až 54 let), kteří konzumovali tučná jídla, bylo podáváno 100 g lyofilizovaného prášku z borůvek jeden týden. U mužů došlo ke zvýšení sérové a celkové antioxidační kapacity o 16 %, po 4 hodinách od konzumace (Kay and Holub, 2002). To je do jisté míry potvrzením pozorované antioxidační aktivity v našem *in vitro* testu a důkazem, že screeningové metody mají své opodstatnění, jako nástroj hledání účinných bioaktivních složek stravy.

V jiné zkřížené studii, provedené na 18 mužích (ve věku od 38 do 58 let), byl po dobu 6 týdnů konzumován nápoj obsahující 25 g lyofilizovaných borůvek, představujících 375 mg antokyanů. Došlo ke zjištění, že ve skupině konzumující tento nápoj dochází k významnému snížení hladiny endogenně oxidované DNA (z 12,5 % na 5,6%) a poškozené DNA, indukované prostřednictvím peroxidu vodíku (ze 45,8 % na 37,2 %) (Riso et al., 2013). To podporuje hypotézu, že příjem borůvek zvyšuje odolnost před oxidačně indukovaným poškozením DNA. Tyto výsledky *in vitro* a *in vivo* studií potvrzují, že borůvky jsou vhodnou součástí běžné stravy, s preventivním charakterem u mnoha onemocnění a jejich pozitivní účinky jsou potvrzeny.

Ze zeleninových druhů je velmi zajímavá cibule, kdy byl zjištěn obsah fenolových sloučenin obdobný, jako jiné studie (Marinova et al., 2005, Lin and Tang, 2007). Mezi hlavní fenolové sloučeniny patří kvercetin, který tvoří až 85 % z fenolových sloučenin. Další významnou sloučeninou je kaempferol (Price and Rhodes, 1997, Chu et al., 2000, Nuutila et al., 2002). Tyto sloučeniny se jeví jako účinné inhibitory gram-pozitivních bakterií, na rozdíl od gram-negativních, které jsou odolnější (Santas et al., 2010). Cibule tak může zlepšovat kvalitu přijímaných potravin.

Známé formy kvercetinu v cibuli jsou kvercetin 7,4'-diglukosid (kdy koncentrace dosahuje 1120 mg/100 g sušiny), kvercetin 4'-glukosid (2310 mg/100 g sušiny) a kvercetin 3-glykosid (368 mg/100 g sušiny) (Min et al.,

2015). U posledně jmenovaného dochází k menšímu absorbování buňkami kolorektálního karcinomu na buněčné linii Caco-2 (která je jednoduchým a užitečným systémem pro studium biologické dostupnosti *in vitro*), než je tomu u kvercetin (Boyer et al., 2004). To může být zapříčiněno rozkladem kvercetin během inkubace s Caco-2 buňkami, případně metabolismem buněk. Je však možné, že dochází i k oxidační degradaci, kdy se zdá, že meziproductem reakce je peroxidace, vedoucí k dioxetanu a následuje otevření fenolového kruhu, za vzniku karboxylových kyselin. Tyto degradační účinky a metabolické změny mohou přispívat k biologické aktivitě kvercetin (Boulton et al., 1999). Metabolická přeměna kvercetin pravděpodobně zabraňuje potencionálně škodlivému snížení eNOS (endoteliální NO syntázy), v endoteliálních buňkách (Tribolo et al., 2013), který je zodpovědný za tvorbu NO v cévním endotelu.

Při zjišťování *in vivo* účinků cibule a jejich fenolových sloučenin byla odebrána plazma dobrovolníkům, kteří jednorázově konzumovali 325 mM kvercetin 3-glykosidu a kvercetin 4'-glykosidu. V plazmě nedošlo k detekci změněných glykosidů kvercetin, s minimem zjištěných aglykonu kvercetin, a to vedlo k domněnce, že po požití glykosidů kvercetin se hlavním metabolitem v plazmě stává kvercetin glukuronid (Sesink et al., 2001). Kvercetin 3-glykosid se dále zpracovává v játrech. Na buněčné linii hepatokarcinomu HEP-G2 byly zjištěny dvě metabolické cesty. Buď metylací funkční skupiny katecholu kvercetin glukuronidu nebo hydrolázou glukuronid endogenní  $\beta$ -glukuronidázou a následnou sulfatací na kvercetin 3'-sulfát a kvercetin 3-glukuronid, dále konverzí na konjugát mono-sulfát, umožňující přechodný kontakt volného aglykonu buněčným prostředím. Tím může docházet k intracelulární biologické aktivitě antioxidantních flavonoidů (O'Leary et al., 2003). Obsah fenolových sloučenin v cibuli úzce koreluje s antioxidantní aktivitou a zároveň koreluje s antiproliferační aktivitou na buněčné linii Caco-2 a HEP-G2. Některé druhy cibule mají antiproliferační vlastnosti na těchto buněčných liniích, avšak při vysokých (20–100 mg/ml) koncentracích (Chu et al., 2002, Yang et al., 2004). I přes takto vysoké potřebné koncentrace k vyvolání antiproliferačního účinku, v podmínkách *in vitro*, naznačuje cibule svůj preventivní protinádorový potenciál. To potvrzuje i *in vivo* studie, probíhající mezi lety 1991 až 2004 v Itálii, kdy se zjišťoval vliv konzumace cibule na výskyt nádorových onemocnění. Výsledkem bylo, že u pacientů, kteří konzumovali cibuli, došlo ke snížení výskytu různých druhů nádorových onemocnění (Galeone et al., 2006).

Ze vzorků, které byly testovány v naší studii, je obyvatelstvem nejčastěji konzumováno jablko, které je významnou součástí lidské potravy. Z tohoto důvodu se jeví jako vhodný zdroj bioaktivních látek. Zjištěné hodnoty obsahu celkových fenolových sloučenin a antioxidantní aktivity byly v souladu s publikacemi dalších autorů, kteří navíc dodávají, že existuje vysoká variabilita mezi jednotlivými odrůdami (Khanizadeh et al., 2008, Vrhovsek et al., 2004, Begić-Akagić et al., 2011). Z celkových fenolových sloučenin je u jablka nejvyšší obsah kvercetin a jeho glykosidů, katechinů, gallokatechinů, epikatechinů, floretinů, floridzinů a chlorogenové kyseliny (Lu and Yeap Foo, 2000, Chinnici et al., 2004). Obsah těchto bioaktivních látek je závislý na úpravě jablka. Určitá část populace toto ovoce zbavuje vrchní slupky, která je přitom výrazně bohatší (o 20–50 %), na fenolové sloučeniny jako je katechin, epikatechin, floridzin, kvercetin a kyanidin. Naopak jablečná dužnina obsahuje více chlorogenové kyseliny a kávové kyseliny (Karaman et al., 2013). Ve slupkách byly stanoveny i jiné glykosidy kvercetin, jako například isorhammentin glykosid a hydroxyfloretin glykosid (Alonso-Salces et al., 2004). U jablek, stejně jako u borůvek, nemá skladování vliv na obsah fenolových sloučenin nebo antioxidantní aktivitu (van der Sluis et al., 2001, Goulas et al., 2014). Toto zjištění podporují celoroční

konzumace jablek, nejlépe bez oloupání. V případě, že jsou jablka používána pro výrobu šťáv, přechází do džusů okolo 78 % chlorogenové kyseliny, 9 % katechinu a 21 % floridzinu. Zbytek zůstává navázaný ve výlisku, kde zůstává většina antioxidantů (van der Sluis et al., 2002). Z tohoto zjištění vyplývá, že konzumace jablek formou džusů, bez dužiny, není nejvhodnější formou konzumace tohoto ovoce.

Antioxidační a protizánětlivá aktivita sušených slupek, sledovaná *in vitro* na buněčném modelu Caco-2, kde byl vyvolán oxidační stres, přidáním železo/askorbátu, dokazuje zvýšení koncentrace malondialdehydu, vyčerpání n-3 polyenových mastných kyselin a změny v aktivitě endogenních antioxidantů, jako je superoxid dismutáza, glutathionperoxidáza. Při pre-inkubaci s jablečnými slupkami dochází k zabránění peroxidace lipidů, zprostředkovaná železo/askorbátem. Současně dochází k inhibici zánětu vyvolaného pomocí LPS, o čemž svědčí snížená regulace cytokinů (TNF- $\alpha$  a IL-6), COX-2 a NF- $\kappa$ B (Denis et al., 2013). Jak uvádí Andre et al. (2012) mají i další bioaktivní sloučeniny z jablka schopnost inhibovat NF- $\kappa$ B *in vitro*, na buněčné linii HEK 293 (lidské embryonální ledvinové buňky), Flp-293/TNFp WTLuc a Flp-293/TNFp-308Luc. Dochází ke snížení aktivity promotéru genu TNF- $\alpha$ , prostřednictvím triterpenových frakcí z jablka. Podle jiné studie však nemodulují hladinu TNF- $\alpha$ , na buněčné linii tlustého střeva T84, ale dochází k supresivnímu účinku na indukcii hladiny IL-8 (Mueller et al., 2013). To je potvrzením našich *in vitro* výsledků inhibice NO produkované LPS stimulovanými RAW264.7.

Cytotoxicita jednotlivých částí jablka na střevní buňky, buněčné linie Caco-2, je výraznější u jablečné dužiny ( $IC_{50} = 1,78$  mg/ml) než u slupky ( $IC_{50} = 2,97$  mg/ml). U buněčné linie HeLa jsou hodnoty takřka dvojnásobné (Luo et al., 2016). Na buněčných liniích HEP-G2 a HT-29 jsou naopak hodnoty  $IC_{50}$  násobně vyšší (Li et al., 2013). V naší studii bylo dosaženo výsledku, že metanolvý extrakt, ani džus, neměl cytotoxické účinky, při koncentraci 1 mg/ml, na makrofágy buněčné linie RAW264.7.

U *in vivo* studie, zabývající se účinky jablka na lidské zdraví, bylo podáváno 11 zdravým pacientům 3 g nezralých slupek jablka. Výsledky naznačují ne-antioxidační aspekt oligomerních prokyanidinů, který je široce použitelný v případě mnoha onemocnění. Orální podávání oligomerních prokyanidinů zvýší signalizaci IFN typu I (centrální drahou poskytující kriticky přirozenou ochranu proti virové a bakteriální infekci) *in vivo* a může rozšířit přirozenou ochranu (Snyder et al., 2014).

## 5.2. Jedlé houby

Polyporales představují širokou skupinu potencionálního zdroje mykochemikálií s farmakologickým přínosem. Mezi ně patří zejména polysacharidy, glykoproteinové komplexy, triterpenoidy, flavonoidy a různé pigmenty (Grienke et al., 2014). Celosvětově je již mnoho z těchto druhů hub součástí některých doplňků stravy. Často je to na základě důkazů o jejich tradičním použití. Je pravděpodobné, že je to díky jejich chemotoxickým vztahům k daleko více populárním druhům, které jsou tradičně využívány v čínské medicíně. Většina těchto přípravků je založena na extrakcích pomocí etanolu. Etanolem extrahovatelné složky triperpenoidy a flavonoidy nebo jejich směsi, mají údajně často antioxidační (Macakova et al., 2010), protizánětlivé (Yoshikawa et al., 2005) a imunomodulační vlastnosti (Quang et al., 2006, Cyranka et al., 2011).

*Sparassis crispa* patří mezi běžně konzumované jedlé houby. Pěstuje se v Japonsku, Číně, Německu a USA (Ohno et al., 2003). Z důvodu vysokých obsahů  $\beta$ -glukanů (117,4 mg/g extraktu) v této houbě, převládá především  $\beta$ -(1,3)-D-glukanů (Ohno et al., 2002). Tento typ  $\beta$ -glukanů má vliv na indukcii produkce INF- $\gamma$ ,

v buňkách sleziny myši DBA/2 (Harada et al., 2002). Zároveň vykazuje protinádorovou aktivitu (Ohno et al., 2002), kdy při orálním podávání aktivuje Th1 (T-lymfocyt) buňky, inhibuje aktivizaci Th2 buněk a tím nastává Th1 dominance imunity v ústní dutině (Hasegawa et al., 2004) a při jiných anti-metastatických účincích (Yamamoto et al., 2009). Jak bylo zmíněno má extrakt *S. crispa* schopnost aktivovat leukocyty a související imunitní systém.

V klinické studii byla *S. crispa*, ve formě prášku (300 mg/den) perorálně podávána pacientům, s nádorovým onemocněním (plic, žaludku, tlustého střeva a dalších) a po léčbě imunoterapií, kteří byli měsíc poté sledováni. *S. crispa* byla podávána pomocí aplikace adoptivního transferu lymfocytů. U 9 sledovaných pacientů ze 14, došlo ke zlepšení (Ohno et al., 2003). To naznačuje, že *S. crispa* je jeví, jako vhodný zdroj pro imunoterapii při rakovině. Další možný vliv má *S. crispa* na hojení ran vzniklých během *diabetes mellitus*, tzv. diabetických vředů. *In vivo* pokusy na zvířatech zatím prokázaly, že podáním *S. crispa* se urychluje toto hojení a v místě postižení dochází k významnému nárůstu migrace makrofágů a fibroblastů (Kwon et al., 2009).

Tento extrakt byl mírně toxický, pro buněčnou linii HT-29 a zároveň vykazuje toxicitu větší než 500 µg/ml, k buněčné linii Caco-2. HT-29 buněčná linie se, podle našich vlastních výsledků a publikované literatury (Li et al., 2014, Doskočil et al., 2015), často objevuje jako citlivější na různé sekundární metabolity v testech toxicity.

Extrakt z *N. lepideus*, v koncentraci 250 µg/ml, způsobil 50% zvýšení chemiluminiscence. Extrakt této jedlé houby (Jung et al., 2008), nezpůsobuje žádnou toxicitu na buňky střevního epitelu. Naše chemická charakterizace hub ukázala, že je v tomto extraktu vyšší obsah β-glukanů při relativně nízkém obsahu fenolových látek. Při zkoumání exopolysacharidů, extrahovaných z plodnic této houby, bylo již dříve zjištěno, že mají vliv na zvýšení exprese různých cytokinů, prostřednictvím čehož dochází ke zvýšení imunitní odpovědi (Jin et al., 2003b, Choi et al., 2006) a dále také ke zvýšení proliferace lymfocytů (Jin et al., 2003a, Jung et al., 2008). I přesto, že při využití etanolu je obsah polysacharidů velmi nízký, je to obecně používané netoxické rozpouštědlo a výsledný extrakt může mít nové vlastnosti, například v důsledku konformačních změn v polysacharidových komplexech. Příbuzný druh *L. edodes*, který byl použit jako referenční vzorek v naší studii, nestimuloval fagocytózu, ale potlačoval ji i při koncentraci tak nízké, jako je 62 µg/ml. Vzhledem k tomu, že je tento druh široce uznávaný, jako účinná látka regulující imunitu, může být toto potlačení připsáno povaze rozpouštědla a přítomnosti bioaktivního etanolu. *N. lepideus* má prokázanou imunomodulační aktivitu *in vitro* (Zheng et al., 2005), tak i *in vivo* (Vetvicka and Vetvickova, 2014).

*Polyporus squamosus* je houba, požitelná pouze mladá a měkká. Injekce s obsahem mycelia této houby, při alergické reakci, snižuje proliferaci monocytů *in vitro*, což naznačuje potencionál imunopresivní aktivity (Babakhin et al. 1997) a prokazuje vlastnosti při zhášení radikálů (Elmastas et al., 2007). Bylo prokázáno, že obsahuje lektiny (Mo et al., 2000). Podobných důkazů o přítomnosti specifických sekundárních metabolitů, je však málo. Dokonce i obsah fenolových látek je velmi nízký (41,6 µmol GAE/g). Etanolvý extrakt této houby, při stimulaci zymosanem, indukuje v našem testu fagocytózu o 41 % vyšší, aniž by vykazoval toxicitu vůči buněčné linii kolorektálního karcinomu.

Zdá se, že nejaktivnější extrakty s pozitivními účinky na fagocytózu, byly mezi extrakty s nejslabší antioxidační aktivitou, publikovanou na totožných extraktech dříve (Macakova et al., 2010). Sloučeniny v komplexních směsích, jako je například surový etanolvý extrakt, mohou být zapojeny do mnoha různých interakcí. Například antioxidanty nebo nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH) nebo inhibitory oxidáz,

by mohly inhibovat uvolňování ROS, v průběhu fagocytární reakce na vnější podněty (Busse et al., 1984, Kanashiro et al., 2004). To by mohlo vést k falešným negativním výsledkům, vzhledem k tomu, že slabá antioxidační aktivita vedla k jasně pozitivnímu vlivu na fagocytózu. Schopnost zhaset volné radikály pravděpodobně vysvětluje potlačení fagocytózy u extraktu *L. sulphureus* a *S. crispa*, které patří k extraktům s nejnižší antioxidační aktivitou ve studii (Macakova et al., 2010). V našich testech tyto extrakty potlačují fagocytózu neutrofilů o 16–74 %. V případě *L. sulphureus* byl extrakt, v podstatě ještě netoxický, pro buněčné linie Caco-2 a HT-29, s  $IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$ .

Námi dosažené výsledky přispívají k pochopení komplexního způsobu působení těchto druhů v imunitní modulaci. Neutrofilní granulocyty, používané v našich testech, jsou buňky schopné fagocytózy, zabíjení, napadání mikroorganismů a mají rozhodující úlohu v zažívacím traktu a jeho imunitním systému. U gastrointestinálních poruch, jako je Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida, hraje pravděpodobně roli v etiopatogenezi selhání neutrofilů neboť jejich respirační vzplanutí u pacientů, s podmínkami pro jejich šíření, je podstatně nižší, než kontrolní skupiny (Levine and Segal, 2013).

V rámci této studie nebyl pozorován vztah mezi celkovým obsahem  $\beta$ -glukanů a TPC, což naznačuje, že obsah složek se liší ve struktuře a činnosti.

Výsledky ukazují slibné hodnoty pro vodorozpustné  $\beta$ -glukany, mající vliv na fagocytózu, v porovnání s etanolovými extrakty. Obsah  $\beta$ -glukanů v tomto kontrolním extraktu byl přibližně 3× vyšší, než u extraktů etanolových.

Přes všechna naše zjištění se domníváme, že by bylo vhodné dále pokračovat v započatém výzkumu a hledat další souvislosti mezi bioaktivními látkami a jejich antioxidační, antiproliferační a imunomodulační aktivitou. Přínos této práce spočívá v tom, že dle dostupných informací jsme provedli první studii zabývající se vlivem komplexního extraktu ovoce a zeleniny na produkci NO na makrofázích *in vitro*. Dále jsme jako první popsali imunomodulační aktivitu spočítávající ve stimulaci fagocytózy, u středoevropských druhů jedlých dřevokazných hub, na neutrofilních fagocytech *in vitro*.

## 6. Závěr

Hlavním cílem práce bylo stanovit antioxidační, antiproliferační a imunomodulační aktivitu vybraného ovoce, zeleniny a hub, za použití klasických metod jako jsou TPC, ORAC a DPPH, tak i dalších metod využívajících buněčné linie a složky lidské krve.

Jak je patrné z výsledků, existují rozdíly v antioxidační aktivitě mezi džusy a metanolovými extrakty z ovoce a zeleniny. Nejvyšší obsah celkových fenolových látek byl zaznamenán u borůvek, naopak nejnižší aktivita byla u rajčete. Stejně tomu bylo i u antioxidační aktivity měřené pomocí metody ORAC. U dalších vzorků byla občas antioxidační aktivita vyšší u extraktů s nižším obsahem celkových fenolových látek. Taková aktivita může být způsobena přítomností například vitamínu C a jiných látek, které jsme nestanovovali, ale mohly by mít vliv na celkovou antioxidační aktivitu. U inhibice oxidu dusnatého byla u metanolového i vodného extraktu aktivita často výraznější pro extrakty, které obsahovaly nižší koncentraci celkových fenolových látek a měly nízkou antioxidační aktivitu. Takovým případem je i rajče, které mělo nejnižší obsah fenolových sloučenin, a jeho antioxidační aktivita byla jednou z nejmenších. Přesto byla inhibice oxidu dusnatého, proti



jiným vzorkům, velmi výrazná. Za to je pravděpodobně odpovědný lykopen přítomný v rajčeti, který nebyl v naší práci stanovován.

U jedlých hub řádu Polyporales se ukázalo, že námi testované etanolové extrakty kromě *S. crispa* nebyly toxické vůči buňkám kolorektálního karcinomu člověka. Tento test byl proveden hlavně proto, že se jedná o jedlé houby. Hlavní cílem této části bylo stanovení imunomodulační aktivity. Z námi testovaných vzorků pouze *N. lepideus* a *P. squamosus*, u kterých byl zaznamenán výrazný fagocytární index vyšší o 55 %, resp. 41 % proti kontrole. Další významná aktivita pak byla zaznamenána u *G. lucidum* a jejího vodného extraktu, běžně využívaného v Čínské tradiční medicíně, který sloužil jako standard. U této houby jsou za aktivitu odpovědné především glukany. Obdobně by tomu mělo být i u dalších námi testovaných druhů. Při stanovení obsahu glukanu v extraktu byl obsah výrazný pouze z *L. tigrinus* a *R. badius*. Při porovnání výsledků imunomodulační aktivity a obsahu glukanu je patrné, že pravděpodobně námi stanovené glukany nemají vliv na tuto aktivitu. Druhou možností bylo, že by za aktivitu mohly být odpovědné fenolové látky. Například u *S. crispa* byl nejvyšší obsah celkových fenolových látek s průměrným obsahem glukanu, avšak imunomodulační aktivita byla nejnižší, jaká byla v našem testu naměřena. Je pravděpodobné, že za imunomodulační aktivitu mohou být odpovědné i jiné látky, které jsme nestanovovali.

Výsledky naznačují, že některé námi testované rostliny a houby mohou být perspektivní ve snižování následků vzniklých v důsledku oxidačního stresu. Ten má podíl na celé řadě onemocnění a snížení tohoto oxidačního stresu může vést ke snížení progresu těchto onemocnění. Výsledky naznačují možný mechanismus účinků na lidské zdraví. Při jejich interpretaci je však třeba brát v úvahu, že *in vitro* testy a provedený screening jsou prvním stupněm systematického výzkumu účinků a slouží pro výběr kandidátů. Do budoucna by bylo vhodné provést podrobnější studii účinků námi testovaných extraktů s objasněním účinku jejich působení.

## 7. Použitá literatúra

- ADAMS, L. S., PHUNG, S., YEE, N., SEERAM, N. P., LI, L. Y. & CHEN, S. A. 2010. Blueberry phytochemicals inhibit growth and metastatic potential of MDA-MB-231 breast cancer cells through modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Research*, 70, 3594-3605.
- ALONSO-SALCES, R. M., NDJOKO, K., QUEIROZ, E. F., IOSET, J. R., HOSTETTSMANN, K., BERRUETA, L. A., GALLO, B. & VICENTE, F. 2004. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, 1046, 89-100.
- ANDRE, C. M., GREENWOOD, J. M., WALKER, E. G., RASSAM, M., SULLIVAN, M., EVERS, D., PERRY, N. B. & LAING, W. A. 2012. Anti-Inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10546-10554.
- BABAKHIN, A. A., MAJOUL, L. A., VEDERNIKOV, A. A., LESKOV, V. P., PISAREV, V. M., BABAKHIN, A., LOGINA, N. Y., GUSHCHIN, I. S., NOLTE, H. & DUBUSKE, L. M. *In vivo* and *in vitro* immunomodulation induced by the extract of the mycelium fungus *Polyporus squamosus*. 1997. OceanSide Publications, Inc, 301-310.
- BEGIĆ-AKAGIĆ, A., SPAHO, N., ORUČEVIĆ, S., DRKENDA, P., KURTOVIĆ, M., GAŠI, F., KOPJAR, M. & PILIŽOTA, V. 2011. Influence of cultivar, storage time, and processing on the phenol content of cloudy apple juice. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3, 1-8.
- BOH, B. 2013. *Ganoderma lucidum*: a potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs. *Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery*, 8, 255-287.
- BOIVIN, D., LAMY, S., LORD-DUFOUR, S., JACKSON, J., BEAULIEU, E., CÔTÉ, M., MOGHRABI, A., BARRETTE, S., GINGRAS, D. & BÉLIVEAU, R. 2009. Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*, 112, 374-380.
- BOULTON, D. W., WALLE, U. K. & WALLE, T. 1999. Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: Chemical instability and metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 353-359.
- BOYER, J., BROWN, D. & LIU, R. H. 2004. Uptake of quercetin and quercetin 3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7172-7179.
- BUSSE, W. W., KOPP, D. E. & ELLIOTT, M. 1984. Flavonoid modulation of human neutrophil function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73, 801-809.
- CAI, Y., SUN, M. & CORKE, H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2288-2294.
- CAO, G. & PRIOR, R. L. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in Enzymology*, 299, 50-62.
- CARVALHO-SILVA, L. B. D., DIONÍSIO, A. P., PEREIRA, A. C. D. S., WURLITZER, N. J., BRITO, E. S. D., BATAGLION, G. A., BRASIL, I. M., EBERLIN, M. N. & LIU, R. H. 2014. Antiproliferative, antimutagenic and antioxidant activities of a Brazilian tropical fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1319-1324.
- CASTAGNINI, J. M., BETORET, N., BETORET, E. & FITO, P. 2015. Vacuum impregnation and air drying temperature effect on individual anthocyanins and antiradical capacity of blueberry juice included into an apple matrix. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1289-1296.
- CHEYNIER, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223S-229S.
- CHINNICI, F., GAIANI, A., NATALI, N., RIPONI, C. & GALASSI, S. 2004. Improved HPLC determination of phenolic compounds in cv. Golden Delicious apples using a monolithic column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3-7.
- CHOI, J. J., JIN, M., LEE, J. K., LEE, W. Y., PARK, Y.-I., HAN, Y. N. & KIM, S. 2006. Control of cytokine gene expression by PG101, a water-soluble extract prepared from *Lentinus lepideus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339, 880-887.
- CHU, Y.-H., CHANG, C.-L. & HSU, H.-F. 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 561-566.

- CHU, Y. F., SUN, J., WU, X. Z. & LIU, R. H. 2002. Antioxidant and anti proliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6910-6916.
- COHEN, J. H., KRISTAL, A. R. & STANFORD, J. L. 2000. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68.
- CYRANKA, M., GRAZ, M., KACZOR, J., KANDEFER-SZERSZEN, M., WALCZAK, K., KAPKA-SKRZYPCZAK, L. & RZESKI, W. 2011. Investigation of antiproliferative effect of ether and ethanol extracts of birch polypore medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst.(Higher Basidiomycetes) *in vitro* grown mycelium. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13.
- CZANK, C., CASSIDY, A., ZHANG, Q. Z., MORRISON, D. J., PRESTON, T., KROON, P. A., BOTTING, N. P. & KAY, C. D. 2013. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a C-13-tracer study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 995-1003.
- DE SILVA, D. D., RAPIOR, S., FONS, F., BAHKALI, A. H. & HYDE, K. D. 2012a. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity*, 55, 1-35.
- DE SILVA, D. D., RAPIOR, S., HYDE, K. D. & BAHKALI, A. H. 2012b. Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Diversity*, 56, 1-29.
- DENIS, M. C., FURTOS, A., DUDONNE, S., MONTOUDIS, A., GAROFALO, C., DESJARDINS, Y., DELVIN, E. & LEVY, E. 2013. Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. *Plos One*, 8.
- DIACONEASA, Z., LEOPOLD, L., RUGINĂ, D., AYVAZ, H. & SOCACIU, C. 2015. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 2352-2365.
- DOSKOCIL, I., HAVLIK, J., VERLOTTA, R., TAUCHEN, J., VESELA, L., MACAKOVA, K., OPLETAL, L., KOKOSKA, L. & RADA, V. 2016. *In vitro* immunomodulatory activity, cytotoxicity and chemistry of some central European polypores. *Pharmaceutical Biology*, 1-8.
- DOSKOČIL, I., HOŠTÁLKOVÁ, A., ŠAFRATOVÁ, M., BENEŠOVÁ, N., HAVLÍK, J., HAVELEK, R., KUNEŠ, J., KRÁLOVEC, K., CHLEBEK, J. & CAHLÍKOVÁ, L. 2015. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*, 13, 394-398.
- DUBOST, N. J., OU, B. & BEELMAN, R. B. 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105, 727-735.
- ELMASTAS, M., ISILDAK, O., TURKEKUL, I. & TEMUR, N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 337-345.
- GALEONE, C., PELUCCHI, C., LEVI, F., NEGRI, E., FRANCESCHI, S., TALAMINI, R., GIACOSA, A. & LA VECCHIA, C. 2006. Onion and garlic use and human cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 1027-1032.
- GIOVANELLI, G. & BURATTI, S. 2009. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, 112, 903-908.
- GONZALEZ-BARRIO, R., EDWARDS, C. A. & CROZIER, A. 2011. Colonic catabolism of ellagitannins, ellagic acid, and raspberry anthocyanins: *in vivo* and *in vitro* studies. *Drug Metabolism and Disposition*, 39, 1680-1688.
- GONZÁLEZ-VALLINAS, M., GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M., RODRÍGUEZ-CASADO, A. & DE MOLINA, A. R. 2013. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews*, 71, 585-599.
- GORINSTEIN, S., PARK, Y.-S., HEO, B.-G., NAMIESNIK, J., LEONTOWICZ, H., LEONTOWICZ, M., HAM, K.-S., CHO, J.-Y. & KANG, S.-G. 2009. A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. *European Food Research and Technology*, 228, 903-911.
- GOULAS, V., KOURDOULAS, P., MAKRIS, F., THEODOROU, M., FELLMAN, J. K. & MANGANARIS, G. A. 2014. Comparative polyphenolic antioxidant profile and quality of traditional apple cultivars as affected by cold storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 2037-2044.

- GRIENKE, U., ZÖLL, M., PEINTNER, U. & ROLLINGER, J. M. 2014. European medicinal polypores—A modern view on traditional uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154, 564-583.
- GÜNÇ ERGÖNÜL, P., AKATA, I., KALYONCU, F. & ERGÖNÜL, B. 2013. Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *The Scientific World Journal*, 2013.
- HADARI, F., RASHIDI, M. R., KESHAVARZ, S. A., MAHBOOB, S. A., ESHRAGHIAN, M. R. & SHAHI, M. M. 2008. Effects of onion on serum uric acid levels and hepatic xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase activities in hyperuricemic rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11, 1779.
- HARADA, T., MIURA, N. N., ADACHI, Y., NAKAJIMA, M., YADOMAE, T. & OHNO, N. 2002. IFN- $\gamma$  induction by SCG, 1, 3- $\beta$ -D-glucan from *Sparassis crispa*, in DBA/2 mice *in vitro*. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22, 1227-1239.
- HASEGAWA, A., YAMADA, M., DOMBO, M., FUKUSHIMA, R., MATSUURA, N. & SUGITACHI, A. 2004. [*Sparassis crispa* as biological response modifier]. *Gan to kagaku ryoho. Cancer and Chemotherapy*, 31, 1761-1763.
- HERTOG, M. G. L., FESKENS, E. J. M., KROMHOUT, D., HOLLMAN, P. C. H. & KATAN, M. B. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342, 1007-1011.
- HUANG, D. J., OU, B. X. & PRIOR, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- JACOB, J. K., HAKIMUDDIN, F., PALIYATH, G. & FISHER, H. 2008. Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines. *Food Research International*, 41, 419-428.
- JIN, M., JUNG, H.-J., SHIN, S.-S., JEON, H., CHOI, J.-J. & KIM, S. 2003a. Extract of *Lentinus lepideus* and composition comprising the same having immune enhancing activity. Google Patents. WO2003075940 A1
- JIN, M., JUNG, H. J., CHOI, J. J., JEON, H., OH, J. H., KIM, B., SHIN, S. S., LEE, J. K., YOON, K. & KIM, S. 2003b. Activation of selective transcription factors and cytokines by water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Experimental Biology and Medicine*, 228, 749-758.
- JUNG, Y.-S., YANG, B.-K., JEONG, Y.-T., ISLAM, R., KIM, S.-M. & SONG, C.-H. 2008. Immunomodulating activities of water-soluble exopolysaccharides obtained from submerged culture of *Lentinus lepideus*. *Journal of Microbiol Biotechnol*, 18, 1431-1438.
- KALT, W., MCDONALD, J. E., RICKER, R. D. & LU, X. 1999. Anthocyanin content and profile within and among blueberry species. *Canadian Journal of Plant Science*, 79, 617-623.
- KANASHIRO, A., KABEYA, L. M., POLIZELLO, A. C. M., LOPES, N. P., LOPES, J. L. C. & LUCISANO-VALIM, Y. M. 2004. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. *Phytotherapy Research*, 18, 61-65.
- KARAMAN, S., TUTEM, E., BASKAN, K. S. & APAK, R. 2013. Comparison of antioxidant capacity and phenolic composition of peel and flesh of some apple varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 867-875.
- KARLSEN, A., RETTERSTOL, L., LAAKE, P., PAUR, I., KJOLSRUD-BOHN, S., SANDVIK, L. & BLOMHOFF, R. 2007. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappa B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *Journal of Nutrition*, 137, 1951-1954.
- KATSUBE, N., IWASHITA, K., TSUSHIDA, T., YAMAKI, K. & KOBORI, M. 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 68-75.
- KAY, C. D. & HOLUB, B. J. 2002. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 88, 389-397.
- KHANIZADEH, S., TSAO, R., REKIKA, D., YANG, R., CHARLES, M. T. & VASANTHA RUPASINGHE, H. P. 2008. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 396-401.
- KOZARSKI, M., KLAUS, A., NIKSIC, M., JAKOVljeVIC, D., HELSPER, J. & VAN GRIENSVEN, L. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms

- Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. Food Chemistry, 129, 1667-1675.
- KWON, A. H., QIU, Z. Y., HASHIMOTO, M., YAMAMOTO, K. & KIMURA, T. 2009. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. American Journal of Surgery, 197, 503-509.
- LEVINE, A. P. & SEGAL, A. W. 2013. What is wrong with granulocytes in inflammatory bowel diseases? Digestive Diseases, 31, 321-327.
- LI, F., LI, S., LI, H. B., DENG, G. F., LING, W. H., WU, S., XU, X. R. & CHEN, F. 2013. Antiproliferative activity of peels, pulps and seeds of 61 fruits. Journal of Functional Foods, 5, 1298-1309.
- LI, G., YU, K., LI, F., XU, K., LI, J., HE, S., CAO, S. & TAN, G. 2014. Anticancer potential of *Hericium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers. Journal of Ethnopharmacology, 153, 521-530.
- LIANG, Z., CHENG, L., ZHONG, G.-Y. & LIU, R. H. 2014. Antioxidant and antiproliferative activities of twenty-four vitis vinifera grapes. PloS One, 9, e105146.
- LIN, J.-Y. & TANG, C.-Y. 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. Food Chemistry, 101, 140-147.
- LIN, M. T. & BEAL, M. F. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature, 443, 787-795.
- LIU, M., LI, X. Q., WEBER, C., LEE, C. Y., BROWN, J. & LIU, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2926-2930.
- LU, Q.-Y., JIN, Y.-S., ZHANG, Q., ZHANG, Z., HEBER, D., GO, V. L. W., LI, F. P. & RAO, J. Y. 2004. *Ganoderma lucidum* extracts inhibit growth and induce actin polymerization in bladder cancer cells *in vitro*. Cancer Letters, 216, 9-20.
- LU, Y. & YEAP FOO, L. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chemistry, 68, 81-85.
- LUO, J. C., ZHANG, P., LI, S. Q. & SHAH, N. P. 2016. Antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activities of free and bound phenolics from peel and flesh of fuji apple. Journal of Food Science, 81, M1735-M1742.
- MACAKOVA, K., OPLETAL, L., POLASEK, M. & SAMKOVA, V. 2010. Free-radical scavenging activity of some European polyporales. Natural Product Communications, 5, 923-926.
- MARINOVA, D., RIBAROVA, F. & ATANASSOVA, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 40, 255-260.
- MCDUGALL, G. J., ROSS, H. A., IKEJI, M. & STEWART, D. 2008. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown *in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 3016-3023.
- MEYERS, K. J., WATKINS, C. B., PRITTS, M. P. & LIU, R. H. 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6887-6892.
- MIN, S. J., VALAN, A. M., JUNG-HO, K., SUNGGIL, K., DAE-SEOK, Y., KYOUNG, Y. M. & SUN-JU, K. 2015. Identification and quantification of quercetin glycosides present in different color onions (*Allium cepa* L.). Research Journal of Biotechnology, 10, 25-33.
- MO, H., WINTER, H. C. & GOLDSTEIN, I. J. 2000. Purification and characterization of a Neu5Aca2-6Galβ1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. Journal of Biological Chemistry, 275, 10623-10629.
- MOSMAN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunol Methods, 65:55-63.
- MOYER, R. A., HUMMER, K. E., FINN, C. E., FREI, B. & WROLSTAD, R. E. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 519-525.
- MUELLER, D., TRIEBEL, S., RUDAKOVSKI, O. & RICHLING, E. 2013. Influence of triterpenoids present in apple peel on inflammatory gene expression associated with inflammatory bowel disease (IBD). Food Chemistry, 139, 339-346.

- NIKI, E. 1997. Free radicals, antioxidants, and cancer. Food factors for Cancer prevention. Springer.
- NURMI, T., MURSU, J., HEINONEN, M., NURMI, A., HILTUNEN, R. & VOUTILAINEN, S. 2009. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2274-2281.
- NUUTILA, A. M., KAMMIOVIRTA, K. & OKSMAN-CALDENTEY, K. M. 2002. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76, 519-525.
- O'LEARY, K. A., DAY, A. J., NEEDS, P. W., MELLON, F. A., O'BRIEN, N. M. & WILLIAMSON, G. 2003. Metabolism of quercetin-7-and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 65, 479-491.
- OHNO, N., HARADA, T., MASUZAWA, S., MIURA, N. N., ADACHI, Y., NAKAJIMA, M. & YADOMAE, T. 2002. Antitumor activity and hematopoietic response of a  $\beta$ -glucan extracted from an edible and medicinal mushroom *Sparassis crispa* Wulf.: Fr.(Aphyllorphomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4, 1-14.
- OHNO, N., NAMEDA, S., HARADA, T., MIURA, N. N., ADACHI, Y., NAKAJIMA, M., YOSHIDA, K., YOSHIDA, H. & YADOMAE, T. 2003. Immunomodulating activity of a  $\beta$ -glucan preparation, SCG, extracted from a culinary–medicinal mushroom, *Sparassis crispa* Wulf.: Fr.(Aphyllorphomycetideae), and application to cancer patients. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5.
- OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M. & PRIOR, R. L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- PANDEY, K. B. & RIZVI, S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270-278.
- PEARSON, D. A., TAN, C. H., GERMAN, J. B., DAVIS, P. A. & GERSHWIN, M. E. 1999. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sciences*, 64, 1913-1920.
- PRICE, K. R. & RHODES, M. J. C. 1997. Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 331-339.
- PRIOR, R. L., CAO, G., MARTIN, A., SOFIC, E., MCEWEN, J., O'BRIEN, C., LISCHNER, N., EHLENFELDT, M., KALT, W. & KREWER, G. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2686-2693.
- PRIOR, R. L. & CAO, G. H. 1999. *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 1173-1181.
- QUANG, D. N., HASHIMOTO, T. & ASAKAWA, Y. 2006. Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances. *Chemical Record*, 6, 79-99.
- RINCÃO, V. P., YAMAMOTO, K. A., RICARDO, N. M., SOARES, S. A., MEIRELLES, L. D. P., NOZAWA, C. & LINHARES, R. E. C. 2012. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal*, 9, 37.
- RISO, P., KLIMIS-ZACAS, D., DEL BO, C., MARTINI, D., CAMPOLO, J., VENDRAME, S., MOLLER, P., LOFT, S., DE MARIA, R. & PORRINI, M. 2013. Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *European Journal of Nutrition*, 52, 949-961.
- RUAN, W. & POPOVICH, D. G. 2012. *Ganoderma lucidum* triterpenoid extract induces apoptosis in human colon carcinoma cells (Caco-2). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2, 203-209.
- RUPASINGHE, H. P. V. & CLEGG, S. 2007. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 133-137.
- SANTAS, J., ALMAJANO, M. P. & CARBO, R. 2010. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 403-409.

- SESINK, A. L. A., O'LEARY, K. A. & HOLLMAN, P. C. H. 2001. Quercetin gluconides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *Journal of Nutrition*, 131, 1938-1941.
- SHARMA, O. P. & BHAT, T. K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202-1205.
- SHI, M., ZHANG, Z. & YANG, Y. 2013. Antioxidant and immunoregulatory activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP). *Carbohydrate Polymers*, 95, 200-206.
- SNYDER, D. T., ROBISON, A., KEMOLI, S., KIMMEL, E., HOLDERNESS, J., JUTILA, M. A. & HEDGES, J. F. 2014. Oral delivery of oligomeric procyanidins in Apple Poly (R) enhances type I IFN responses in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, 95, 841-847.
- STONER, G. D., SARDO, C., APSELOFF, G., MULLET, D., WARGO, W., POUND, V., SINGH, A., SANDERS, J., AZIZ, R., CASTO, B. & SUN, X. L. 2005. Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days. *Journal of Clinical Pharmacology*, 45, 1153-1164.
- SUN, J., CHU, Y.-F., WU, X. & LIU, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449-7454.
- SUN, T., POWERS, J. R. & TANG, J. 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, 105, 101-106.
- TAMRAKAR, S., TRAN, H. B., NISHIDA, M., KAIFUCHI, S., SUHARA, H., DOI, K., FUKAMI, K., PARAJULI, G. P. & SHIMIZU, K. 2016. Antioxidative activities of 62 wild mushrooms from Nepal and the phenolic profile of some selected species. *Journal of Natural Medicines*, 1-11.
- THIMM, J. C., BURRITT, D. J., SIMS, I. M., NEWMAN, R. H., DUCKER, W. A. & MELTON, L. D. 2002. Celery (*Apium graveolens*) parenchyma cell walls: cell walls with minimal xyloglucan. *Physiologia Plantarum*, 116, 164-171.
- TRIBOLO, S., LODI, F., WINTERBONE, M. S., SAHA, S., NEEDS, P. W., HUGHES, D. A. & KROON, P. A. 2013. Human metabolic transformation of quercetin blocks its capacity to decrease endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and endothelin-1 secretion by human endothelial cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8589-8596.
- VAN DER SLUIS, A. A., DEKKER, M., DE JAGER, A. & JONGEN, W. M. F. 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3606-3613.
- VAN DER SLUIS, A. A., DEKKER, M., SKREDE, G. & JONGEN, W. M. F. 2002. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7211-7219.
- VETVICKA, V. & VETVICKOVA, J. 2014. Immune-enhancing effects of Maitake (*Grifola frondosa*) and Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts. *Annals of Translational Medicine*, 2.
- VRHOVSEK, U., RIGO, A., TONON, D. & MATTIVI, F. 2004. Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6532-6538.
- WANG, S. Y. & LIN, H. S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146.
- WANG, J., & MAZZA, G. 2002. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- $\gamma$ -activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 850-857.
- WOLFE, K., WU, X. & LIU, R. H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 609-614.
- WILLIAMSON, G. & CLIFFORD, M. N. 2010. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, 104, S48-S66.
- WU, L.-C., HSU, H.-W., CHEN, Y.-C., CHIU, C.-C., LIN, Y.-I. & HO, J.-A. A. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95, 319-327.
- YAMAMOTO, K., KIMURA, T., SUGITACHI, A. & MATSUURA, N. 2009. Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of  $\beta$ -1, 3-D-glucan purified from hanabiratake, *Sparassis crispa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 259-263.

- YANG, J., MEYERS, K. J., VAN DER HEIDE, J. & LIU, R. H. 2004. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and anti proliferative activities of onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6787-6793.
- YOSHIKAWA, K., INOUE, M., MATSUMOTO, Y., SAKAKIBARA, C., MIYATAKA, H., MATSUMOTO, H. & ARIHARA, S. 2005. Lanostane Triterpenoids and triterpene glycosides from the fruit body of *Fomitopsis pinicola* and their inhibitory activity against COX-1 and COX-2. *Journal of Natural Products*, 68, 69-73.
- YOU, Y.-H. & LIN, Z.-B. 2002. Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23, 787-791.
- YU, J., AHMEDNA, M. & GOKTEPE, I. 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*, 90, 199-206.
- ZHAO, L., DONG, Y., CHEN, G. & HU, Q. 2010. Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 80, 783-789.
- ZHENG, R., JIE, S., HANCHUAN, D. & MOUCHENG, W. 2005. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *International Immunopharmacology*, 5, 811-820.
- ZHU, X.-L., CHEN, A.-F. & LIN, Z.-B. 2007. *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 219-226.



## 8. Seznam publikací autora k řešené problematice

### *Vědecká publikace s IF*

---

**Doskocil, I.**, Havlik, J., Verlotta, R., Tauchen, J., Vesela, L., Macakova, K., Opletal, L., Kokoska, L., Rada, V. 2016. *In vitro* immunomodulatory activity, cytotoxicity and chemistry of some central European Polypores. *Pharmaceutical Biology*, 1-8

---

### *Příspěvky na mezinárodních konferencích*

---

**Doskocil, I.**, Havlik, J., Frůblingova, L., Landa, P., Volstatova, T., Hroncova, Z., Rada, V. (2014). Podtyp: Příspěvek ve sborníku (mimo kategorii RIV); *In vitro* antiradical and anti-inflammatory properties of fruit and vegetable juices. 17<sup>th</sup> World Congress of Food Science and Technology & Expo, Research that Resnates, August 17-21,2014, Montreal, Canada.

---

**Doskocil, I.**, Havlik, J., Frůblingova, L., Hroncova, Z., Volstatova, T., Landa, P. (2014). Podtyp: Příspěvek ve sborníku (mimo kategorii RIV); *In vitro* antiradical and no suppression properties of fruits and vegetables. 3<sup>rd</sup> International Conference on Food Digestion, Wageningen, The Netherlands, 11.3.- 13.3.2014, p. 146.

---

Havlik, J., Verlotta, R., **Doskocil, I.**, Hroncova, Z., Volstatova, T., Bernardi, R. (2014). Podtyp: Příspěvek ve sborníku (mimo kategorii RIV); Granulocyte phagocytic activity induced by edible Polypore mushrooms. 3<sup>rd</sup> International Conference on Food Digestion, Wageningen, The Netherlands, 11.3.-13.3.2014, p.145.

---