

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

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

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

Doktorská disertační práce

Autor: **Ing. Ivo Doskočil**

Školitel: **doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

© Praha 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že disertační práci „Anti-proliferační a antioxidační účinek vybraných rostlin a hub *in vitro*“ jsem vypracoval samostatně, pod vedením školitele doktorského studia, s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor disertační práce prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne:.....

Ing. Ivo Doskočil.....

Poděkování

Výzkum k předložené dizertační práci byl podpořen projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, PROGRAM COST CZ LD14070 a interní grantovou agenturou České zemědělské univerzity v Praze, CIGA 20142012. Díky této podpoře mohla práce vzniknout.

Chtěl bych také poděkovat nadaci “Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových“, která mi poskytla finanční prostředky v rámci cestovního stipendia.

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. (Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze), stejně jako vedoucímu katedry prof. Ing. Vojtěchu Radovi, Ph.D., za umožnění vypracování této disertační práce.

Velké poděkování patří bývalým studentům Ing. Lucii Frübringové a Robertě Verlottě, se kterými jsem spolupracoval na daném tématu. Dále bych rád Ing. Janu Tauchenovi, za spolupráci po dobu společných doktorských studií na ČZU. Poděkování patří i dalším kolegům z naší kanceláře, ať minulým jako je Ing. Alena Brázdilová, Ph.D., tak i současným jako jsou Ing. Zuzana Hroncová, Ing. Veronika Jarošová, Ing. Tereza Volšátová, Ing. Petra Hovorková a Ing. Miroslav Joch, kteří mi v případě potřeby kdykoliv pomáhali radou při řešení jakéhokoliv problému.

Obsah

1. Úvod.....	4
Hypotéza	6
Cíl práce	6
2. Literární přehled.....	7
2.1. Volné radikály a antioxidanty	7
2.2. Oxidační stres a lidské zdraví.....	8
2.2.1. Ateroskleróza	8
2.2.2. Cystická fibróza	9
2.2.3. Zánětlivá onemocnění střev	9
2.2.4. Nádorová onemocnění	10
2.3. Oxidační stres a imunita.....	12
2.3.1. Role fagocytózy v imunitním systému	14
2.4. Biologicky aktivní sloučeniny u rostlin a hub.....	15
2.4.1. Sloučeniny s antioxidační a antiproliferační aktivitou	15
2.4.1.1 Vitamin E (α - tokoferol)	15
2.4.1.2 Askorbová kyselina	16
2.4.1.3 Karotenoidy (β -karoten)	17
2.4.1.4 Rostlinné fenolové sloučeniny.....	18
2.4.2. Sloučeniny s imunomodulační aktivitou.....	22
2.4.2.1 Lektiny	22
2.4.2.2 Terpeny a terpenoidy	22
2.4.2.3 Polysacharidy.....	23
2.5. Význam ovoce, zeleniny a hub ve výživě člověka.....	28
2.5.1. Význam rostlin a hub ve výživě lidí	28
2.5.1.1 Ovoce a zelenina.....	29
2.5.1.2 Houby	33
3. Materiál a metodika	38

3.1. Materiál	38
3.2. Metodika.....	39
3.2.1. Metody použité pro vzorky ovoce a zeleniny	39
3.2.1.1 Příprava džusů	39
3.2.1.2 Příprava metanolových extraktů.....	39
3.2.1.3 Obsah celkový fenolových sloučenin	40
3.2.1.4 Stanovení antioxidační aktivity	40
3.2.1.5 Kultivace buněčných tkání	41
3.2.1.6 Inhibice oxidu dusnatého	41
3.2.1.7 Test cytotoxicity (MTT)	42
3.2.2. Metody použité pro vzorky hub	42
3.2.2.1 Příprava extraktů hub.....	42
3.2.2.2 Stanovení obsahu β-glukanů.....	42
3.2.2.3 Obsah celkových fenolových sloučenin	43
3.2.2.4 Imunomodulační aktivita granulocytů	44
3.2.2.5 Kultivace buněčných tkání	45
3.2.2.6 Test cytotoxicity (MTT)	45
3.3. Statistické vyhodnocení.....	46
4. Výsledky	47
4.1. Ovoce a zelenina	47
4.1.1. Antioxidační aktivita džusů	47
4.1.2. Antioxidační aktivita extraktu	52
4.1.3. Antiproliferační aktivita.....	56
4.2. Houby	57
4.2.1. Imunomodulační aktivita	57
4.2.2. Chemická charakterizace vzorků hub	59
4.2.3. Antiproliferační aktivita.....	61

5. Diskuze.....	63
6. Závěr	72
Seznam zkratk	74
7. Použitá literatura	76
Seznam tabulek a obrázků.....	110

1. Úvod

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-proliferální sloučeniny, které by mohly mít pozitivní efekt při léčbě celé řady onemocnění (Rice-Evans et al., 1997, González-Vallinas et al., 2013). Tyto biologicky aktivní sloučeniny jsou přítomny především v rostlinné složce stravy. Veřejnost má o těchto antioxidantních účincích povědomí a spolu s ním stoupá zájem o doplňky stravy, které tyto látky obsahují. Například vitaminy nebo rostlinné fenolové sloučeniny existují v koncentrované formě (Cheynier, 2005, Dubost et al., 2007, Pandey and Rizvi, 2009) a je možné je získat z širokého spektra druhů rostlin a hub. Léčivé houby nejsou nejvýznamnějším představitelem a nepředstavují majoritní podíl na trhu, s těmito speciálními potravinami. Přesto jsou zajímavé v prevenci nádorových onemocnění a v podpoře imunity. Jejich použití má oporu v tradiční čínské medicíně. Přijímají se obvykle ve formě nálevů nebo kapslí, v některých kulturách se používají přímo v kulinářství. Příkladem hub s touto aktivitou jsou *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (houževnatec jedlý), *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Krast (lesklokorka lesklá) a podobné.

U těchto speciálních potravin byl zjištěn velmi komplexní vliv na celou řadu fyziologických a metabolických funkcí člověka, který byl velmi podrobně prozkoumán. Nejčastěji to platí o houbách z jiných zemí a kultur. Česká republika je však zemí s velkou tradicí v houbaření a využívání divokých hub v kulinářství. Z tohoto pohledu je tak velmi zajímavé znát potenciál lokálních surovin. Například některé druhy hub s velmi dobře dokumentovanou aktivitou pocházející z Číny a 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).

Vznik nádorového onemocnění je spojován s oxidačním stresem. Důkazem, že rostlinné sloučeniny mají vliv při potlačování progresu nádorového bujení, jsou farmaceutická cytostatika paklitaxel, vinkristin a vinblastin, která prokázala významnou roli při léčbě rakoviny a jsou běžnou součástí chemoterapie využívané při léčbě nádorových onemocnění.

Nevýhodou těchto cytostatik může být jejich cytotoxicita vůči „normálním“ buňkám, i když je výrazně nižší, než vůči buňkám nádorovým (Doskočil et al., 2015). Podobné vlastnosti má i řada jiných sloučenin vykazujících protinádorový efekt. Mezi nimi jsou fenolové sloučeniny, u kterých byla také zaznamenána anti-proliferační aktivita (Masci et al., 2016). Tyto biologicky aktivní látky s antioxidačním a anti-proliferačním účinkem se nacházejí zejména v léčivých rostlinách. V poslední době je věnována pozornost jedlým druhům hub a rostlinám, 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).

Na základě těchto poznatků, předložená disertační práce poskytuje informace o *in vitro* antioxidačních a antiproliferačních 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 také 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, antioxidační, anti-proliferační 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 a imunomodulační a antiproliferační aktivitou.

Hypotéza

Byly stanoveny následující 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 antiproliferační aktivitu obdobnou, jako houby již využívané v tradiční medicíně.

Cíl práce

Cílem práce je zhodnocení antioxidační, imunomodulační a antiproliferační aktivity bioaktivních sloučenin z ovoce a zeleniny a z jedlých hub z řádu Polyporales, do kterého spadají nejvýznamnější léčivé houby čínské medicíny.

2. Literární přehled

2.1. Volné radikály a antioxidanty

Z chemického pohledu je volný radikál jakákoliv vysoce reaktivní molekula, atom, či iont s jedním nebo více nepárovými elektrony ve valenčním obalu, který je schopen samostatné existence a dovede vytvářet řetězové reakce (Heunks and Dekhuijzen, 2000). Základní formy volných radikálů jsou volné kyslíkové radikály (Reactive oxygen species; ROS) a volné dusíkové radikály (Reactive nitrogen species; RNS). Mezi volné radikály patří taktéž hydroxylový radikál a NO (Fang et al., 2002, Halliwell and Gutteridge, 2015). Jako volné radikály působí i singletový kyslík, peroxid vodíku a kyselina chlorná (Pietta, 2000). Bylo zjištěno, že oxidace je důležitá v biologických procesech a to včetně oxidační fosforylace v mitochondriích, buněčné signalizaci, fagocytóze a dalších. Na těchto činnostech se podílí enzymy (patří sem například hydrogen nikotinamidadeninukleotid (NADPH) oxidáza, xantinoxidáza, cyklooxygenáza, endoteliální syntáza NO), které katalyzují vznik volných radikálů (Li et al., 2014b). Volné radikály mohou snadno zahájit oxidaci membránových lipidů, což vede k akumulaci peroxidů lipidů (Elmastaş et al., 2006, Gülçin, 2010). Jsou schopny poškozovat důležité biomolekuly, jako jsou nukleové kyseliny, lipidy nebo proteiny. Volné radikály mohou způsobit poškození DNA, což může vést až k mutaci (Halliwell and Gutteridge, 1990). I přesto, že volné radikály způsobují buněčné poškození, jsou nepostradatelné v mnoha biologických reakcích. Aby nedocházelo k jejich negativnímu projevu, je třeba je udržovat v rovnováze prostřednictvím takzvaných antioxidantů (Halliwell and Gutteridge, 2015).

Antioxidanty lze definovat v souladu s tvrzením, že se jedná o „jakékoliv látky, které přímo vychytávají ROS nebo působí nepřímo a regulují antioxidační obranu nebo inhibici ROS“ (Khlebnikov et al., 2007). Antioxidační ochrana je zprostředkována různými způsoby. Mezi ně patří inhibice ROS, volných radikálů lipidů, přerušení množení řetězce autooxidace. Dále zhášení singletového kyslíku pomocí synergie s dalšími antioxidanty nebo cheláty iontů kovů, které předávají kov pro-oxidantům (deriváty železa a mědi) do stabilního produktu a inhibitory pro-oxidačních enzymů (Darmanyan et al., 1998, Heim et al., 2002, Min and Boff, 2002, Pokorný, 2007, Kancheva, 2009). I přes ztrátu elektronu nevznikají z antioxidantu volné radikály, ale jsou to látky nadále stabilní (Denisov and Afanas'ev, 2005). Antioxidanty se dělí na vysokomolekulární antioxidanty, kam patří řada různých enzymů, jako jsou superoxiddismutáza, kataláza nebo glutathionperoxidáza (Sies, 1985, Antunes et al., 2002, Passardi et al., 2005). Druhou skupinou jsou antioxidanty nízkomolekulární, kam patří

neenzymatické antioxidanty jako je glutation, askorbová kyselina, močová kyselina, bilirubin, tokoferol, koenzym Q10 a karotenoidy (Benaroudj et al., 2001, Žitňanová et al., 2004, Valko et al., 2007). Další nízkomolekulární antioxidanty mohou pocházet z potravin a jsou založeny na rostlinné bázi. Nejčastěji se jedná o fenolové sloučeniny, které mají vliv na ROS/RNS (Gülçin, 2012, Bunea et al., 2012).

2.2. Oxidační stres a lidské zdraví

Negativní působení volných radikálů označujeme pojmem oxidační stres (Valko et al., 2007). Účinky oxidačního stresu jsou náhodné povahy. Bylo popsáno na 150 poruch zdraví, způsobených oxidačním stresem (Halliwell, 1994) a dalších specifických onemocnění, kdy oxidační stres hraje primární roli při vzniku onemocnění (Yan et al., 2013, Li et al., 2013). Oxidační stres je jedním z faktorů vzniku aterosklerózy, kdy dochází k produkci ROS, v endoteliální hladké svalovině a v buňkách adventicia (Cai and Harrison, 2000). Zjevná důležitost ROS při cévních onemocněních vede k značnému zájmu o enzymatické zdroje, které přispívají k produkci volných radikálů v cévních tkáních. Zdá se, že v tomto procesu hraje důležitou úlohu xantinoxidáza, NADPH, mitochondriální zdroje a NO-syntáza (NOS) (Ohara et al., 1993, White et al., 1996, Griendling et al., 2000, Laursen et al., 2001, Ballinger et al., 2002). Přesto oxidační stres často vzniká, jako důsledek onemocnění, kdy dochází ke zvýšené produkci ROS/RNS (Rahal et al., 2014). Často tomu tak je u poranění pokožky (Halliwell et al., 1992). Tato kapitola má za cíl shrnout potenciál antioxidantů při léčbě a prevenci nemocí, u kterých oxidační stres hraje důležitou roli v jejich progresi.

2.2.1. Ateroskleróza

Ateroskleróza je hlavní příčinou srdečního infarktu, mrtvice a gangrény na končetinách. Pro aterosklerózu je charakteristické zesílení cévní stěny, v důsledku ukládání nízkodenzitního lipoproteinu (Low-density lipoprotein, LDL), čímž dochází k postupnému zamezení průtoku krve cévami. Omezený přístup krve postihuje zejména mozek a srdce, kdy dochází k infarktu myokardu nebo mrtvici (Ross, 1993). Mezi další rizikové faktory patří vysoký krevní tlak se záněty (Chae et al., 2001). Možnosti prevence a léčba spočívají ve snížení LDL, kdy i snížení hladiny LDL o 1 mmol/l snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění (Cholesterol Treatment Trialists, 2012) tím, že dojde ke snížení oxidace LDL (Navab et al., 2004). U LDL dochází k endogenní oxidaci působením ROS, RNS

a reaktivních forem chlóru, jako jsou například kyselina chlorná, lipoxygenázy a další (Navab et al., 2012, Nicholls and Hazen, 2005).

2.2.2. Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je dědičná smrtelná lidská nemoc, která postihuje zejména dýchací a trávicí soustavu. Tato nemoc je způsobena mutací v genu, který kóduje transmembránový regulátor vodivosti (Ziady and Hansen, 2014). Tato mutace je umístěna na chromozomu 7 (band q31–32). Zde se nachází i vadný membránový protein CFTR (CF transmembránový regulátor vodivosti CFTR), který je zapojen do transportu chloridových iontů pod kontrolou proteinkinázy A. Narušuje normální pohyb vody a elektrolytů v různých epiteliálních buňkách. Narušen je pohyb zejména v dýchacích cestách, ale také v gastrointestinálním traktu, v systému vylučování potu a dalších orgánech (Van Der Vliet et al., 1996). Přítomnost vadného CFTR se projevuje vytvořením redoxní nerovnováhy v epiteliálních buňkách a extracelulární tekutině. Tato redoxní nerovnováha způsobuje abnormální tvorbu ROS. Konstitutivní porucha metabolismu glutationu, spolu se sníženým příjmem a absorpcí antioxidantních vitaminů rozpustných v tucích, by mohla přispět ke zvýšení oxidačního stresu a k progresi klinického stavu (Back et al., 2004, Wood et al., 2003, Iuliano et al., 2009). Kvantifikace oxidačního stresu může být provedena pomocí hodnocení detekce peroxidace lipidů, kdy u pacientů s CF byly zaznamenány zvýšené hladiny 4-hydroxy-2-nonenalu (HNE) a malondialdehydu (MDA) i přes normální hladinu vitaminu E, A a C. Hladiny HNE a MDA se postupně s věkem zvyšují a koncentrace antioxidantních vitaminů v krvi se snižuje (Lezo et al., 2013).

2.2.3. Zánětlivá onemocnění střev

Mezi zánětlivá onemocnění střev patří ulcerózní kolitida (UK) a Crohnova nemoc (CN). Obě nemoci se vyznačují tím, že mají chronickou recidivující imunitní aktivaci a záněty v gastrointestinálním traktu. Obecně je zánětlivé onemocnění střev způsobeno dysfunkcí imunitního systému v gastrointestinálním traktu. Onemocnění je doprovázeno pronikáním zánětu do střevní sliznice (Brandtzaeg et al., 1997). Nejsou však známy konkrétní cesty, jak toto buněčné poškození vzniká. Má se za to, že potenciálně škodlivým je oxidační stres. Ten je považován za možný spouštěč zánětlivého onemocnění střev, jelikož bylo potvrzeno, že ROS hrají roli při tomto onemocnění (Spitz et al., 2004). To potvrdily studie, které prokázaly

zvýšenou tvorbu ROS a RNS, včetně superoxidů, peroxidu vodíku a dalších ve sliznici tlustého střeva, u zvířecích modelů (Pavlick et al., 2002, Tanida et al., 2011). Během toho dochází k aktivaci prozánětlivých látek, jako jsou cytokiny ((TNF- α (Faktor nádorové nekrózy- α), IFN- γ (interferon)), leukotrieny B₄, faktor aktivující destičky imunokomplexů (Leusen et al., 1996) makrofágů a neutrofilů (Maloy and Powrie, 2011). U lidí byla prokázána ve střevní sliznici peroxidace lipidů (např. reaktivními aldehydy, F2-isoprostany) a transformace bílkovinných kationtů (například proteinové karbonyly) (Cracowski et al., 2002, Hatsugai et al., 2010). Naopak jsou ve sliznici snižené obsahy antioxidantů, jako jsou koenzym Q10, glutation, superoxiddismutáza, kataláza, paraoxonáza-1 a metalotionein (Kruidenier and Verspaget, 2002, Rezaie et al., 2007, Catarzi et al., 2011). To je pravděpodobně v důsledku reakce na oxidační stres, kdy tkáň zpočátku reaguje zvýšenou produkcí antioxidantů. Přetrvávající oxidační stres vyčerpává schopnost organismu produkovat více antioxidantů, což nakonec v důsledku vede ke snížení hladiny produkovaných antioxidantů (Rezaie et al., 2007). Mnohé provedené studie prokázaly, že je výrazně snížena antioxidační kapacita u UK i CN (Rezaie et al., 2006, Koutroubakis et al., 2004, Jahanshahi et al., 2004, Barbosa et al., 2003). Holmes et al. (1998) pozoroval 1,7× nárůst oxidovaného glutationu v tlustém střevě u UK v porovnání s neaktivním onemocněním pacientů. V jedné z mnoha provedených studií trvajících 3 měsíce sledovali Geerling et al. (2000) účinky podávání antioxidantů (např. selen 12,4 μ g, β -karoten 150 μ g, vitamin E 4 mg a vitamin C 150 mg) a n-3 mastných kyselin u 25 pacientů s CN. Během této doby byla výrazně zvýšena celková antioxidační aktivita a došlo ke zvýšení aktivity superoxiddismutázy, zatímco po přidání antioxidantu byla aktivita glutationperoxidázy snížena. Výsledkem studií je, že přídavek antioxidantů zlepšuje stav pacientů s CN, přitom vede k nižší mobilizaci vnitřního antioxidačního mechanismu.

2.2.4. Nádorová onemocnění

U části nádorových onemocnění se jedná o genetickou poruchu, při které charakteristicky dochází k nadměrné proliferaci. K tomu dochází v jedné buňce, které prošla několika buněčnými děleními s mutacemi (Nowell, 1976). Během dělení je genetická informace obsažená v buňce změněna. K těmto změnám dochází v důsledku vystavení fyzikálním karcinogenům (např.: ultrafialové záření, ionizující záření) nebo chemickým karcinogenům (jako jsou naftylamin, N-nitrosamin) (Bertram, 2000). Genetické modifikace

buněk způsobují nečinnost u signálních drah, které regulují buněčné dělení. Tato mutace může vést až k samovolné proliferaci a rakovině (Kufe et al., 2003).

Další možností vzniku nádorového onemocnění je přímé působení volných radikálů ROS, jako je superoxid přítomný v dýchacím řetězci mitochondrií a z něho vzniklý hydrogen peroxid. Druhou možností je nepřímé působení enzymů monoaminoxidázy a hydroxylových radikálů, které mohou modifikovat a rozrušit purinové a pyrimidové báze, což vede k poškození DNA (Matés et al., 2010). ROS mohou vyvolat změny sekvence DNA ve formě mutací, delecí, amplifikace genu a transkripce DNA (Matés et al., 2008). Hromadí se důkazy, že ROS mohou také sloužit jako kritické signální molekuly buněčné proliferace (Ray et al., 2012). Podporují metastáze nádorů, prostřednictvím genové aktivace (Ishikawa et al., 2008).

Dále ROS mohou regulovat expresi hladiny Bcl-2 (z genové rodiny bcl genů - B-cell lymphoma, genů ovlivňující propustnost mitochondriální membrány), ovlivňovat jeho funkci a indukovat buněčnou smrt, přes nekrotické nebo apoptotické dráhy (Azad et al., 2010). Regulace apoptózy zahrnuje aktivaci receptorů, změny v hladinách exprese rodiny proteinů Bcl-2, aktivaci kaspázy a mitochondriální disfunkci (Ryter et al., 2007). C-JUN-N-termální kinázy, nebo stresem aktivované proteinkinázy a enzymy z rodiny mitogen aktivovaných proteinkináz, jsou také zapojeny do ROS zprostředkované buněčné smrti (Shen and Liu, 2006). Již při nízké až střední koncentraci mohou ROS vyvolat buněčné stárnutí a apoptózu nebo mohou prospěšně působit na fyziologii v antimutagenních drahách (Valko et al., 2006, Tan et al., 2011). Nicméně ROS působí jako poslové v transdukčních signálních drahách (Zamocky et al., 2008) a jsou považovány za významné mediátory poškození buněčných struktur, včetně lipidů, membrán, bílkovin a DNA (Valko et al., 2007). Zvýšené hladiny reaktivních forem jsou spojeny s ontogenní stimulací a oxidačním stresem a ROS může proto být považován za důležitý faktor karcinogeneze (Valko et al., 2006).

Fytochemikálie z rostlin a hub mohou být důležitým faktorem při léčbě rakoviny a chemoprevenci nebo chemoterapii. Mnoho složek z rostlin vykazuje účinky na buněčnou apoptózu a modulaci intracelulárního redoxního stavu (Shu et al., 2010). Mnoho antioxidantů z fenolových sloučenin, jako je například katechin, epigallokatechin gallát (EGCG) a kurkumin, projevují své protizánětlivé a antioxidantní účinky prostřednictvím fáze II detoxifikačních/antioxidačních enzymů, které jsou zprostředkovány integrovaným Nrf2 (nukleární faktor) (Jomova et al., 2010, Tan et al., 2011, Saw et al., 2011, Shu et al., 2011). Většina fytochemických sloučenin působí na více drah. Například u EGCG bylo prokázáno, že má více vlivů na buněčný cyklus, na protizánětlivou a protinádorovou regulaci

prostřednictvím modulace NF- κ B, COX-2, DNA metyltransferázy p38 a metaloproteinázy-2 (Jeong et al., 2004, Pandey and Gupta, 2009, Jagtap et al., 2009).

2.3. Oxidační stres a imunita

Jedním z mnoha možných způsobů vzniku nádorového onemocnění je oslabení imunitního systému. V tomto případě dochází k poruše buněčné signalizace a poškozené buňky nejsou imunitním systémem rozpoznány a eliminovány (Zou and Chen, 2008). Za normálních fyziologických podmínek jsou, pro udržování vlastní tolerance a k ochraně před poškozením, klíčové imunitní parametry.

Imunitu lze rozdělit na dvě základní skupiny a to podle rychlosti a specifčnosti reakce. První skupinou je imunita vrozená, zahrnující prvky imunitního systému (neutrofilů, monocytů, makrofágy, cytokiny) a poskytující okamžitou obranu hostitele. Druhou skupinou je adaptivní imunita, založená na reakci specifických antigenů prostřednictvím T-lymfocytů a B-lymfocytů. Tato imunita je přesně cílená na paměť, kdy při další expozici je odpověď rychlejší, než v případě vrozené imunity (Parham, 2014).

Hlavním prvkem vrozené imunity je aktivace neutrofilů v místě infekce. Ty jsou určeny k neutralizaci patogenů (Witko-Sarsat et al., 2000). Stejný postup, ale vyskytující se na nevhodném místě a v nevhodný čas, vede k zánětlivým onemocněním pojivových tkání, zánětům a syndromu zánětlivé odpovědi (Mackay, 2001, Feldmann and Maini, 2001). Aktivované neutrofilů se v imunitním procesu zúčastňují prostřednictvím fagocytózy. To je proces, kdy dochází ke zvětšení cytoplasmatické membrány, která vytvoří membránový váček (fagozóm) okolo pohlcované částice. V takto vzniklé cytoplasmatické granuli z neutrofilů dochází ke kombinaci dvou mechanismů. Jednak dochází k reakci s kyslíkem při respiračním vzplanutí a dále dochází k postupné redukci kyslíku pomocí NADPH oxidázy, vedoucí k produkci ROS (Garred et al., 1995). ROS jsou nezbytné pro aktivaci zánětlivých multiproteinových komplexů, známých jako inflamazomy (Haneklaus et al., 2013). Ty jsou hlavním čidlem buněčných stresových signálů. ROS totiž mění chemické struktury různých molekul prostřednictvím oxidačních modifikací specifických epitopů, které jsou vysoce imunogenní a mohou způsobit aktivaci adaptivní imunity (Leonard and Maes, 2012).

Adaptivní imunitní systém (většinou) rozpozná proteinové cíle a antigeny, protože jeho předností je výjimečná specifčnost a schopnost rozlišovat strukturální rozdíly kódované v jediné aminokyselině. Také se může pochlubit pamětí umožňující zlepšení specifčnosti

a rychlosti odezvy, v případě nalezení stejného antigenu, při další expozici (Lilic, 2009). Získaná imunita zahrnuje specifické rozpoznávací molekuly (antigeny), vázající se na patogeny, které jsou rozlišeny jako cizí hostitelé. Antigeny fungují prostřednictvím protilátek imunoglobulinů (Ig) produkovanými B-lymfocyty a T-lymfocyty.

T-lymfocyty hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi na infekční agens. Pro optimální a vhodnou imunitní odpověď T-lymfocytů je vyžadována aktivace přes T-buněčné receptory (T cell receptors – TCR) (Williams and Kwon, 2004). Tyto buněčné receptory jsou schopny rozpoznat antigeny vystavené na povrchu buněk, kde dochází k expresi peptidových fragmentů, odvozených z patogenu, na buněčný povrch T-lymfocytů, které dále signalizují infekci buňky. Tyto fragmenty jsou dále transportovány k povrchu infikovaných buněk a tam jsou spojeny s proteiny hlavního histokompatibilního komplexu (major histocompatibility complex – MHC). Existují dvě třídy MHC, lišící se zdrojem vázaného peptidu. Označujeme je MHC I a MHC II. MHC I váže peptidy pocházející z patogenních proteinů, které jsou syntetizovány uvnitř hostitelských buněk cytosolu. Peptidy navázané na MHC II jsou odvozeny z patogenu, které byly fagocytovány makrofágy nebo buňkami prezentujícími antigen (makrofágy, dendritické buňky, B-lymfocyty) (Calder and Kew, 2002). Antigeny nejsou zpracovávány a předávány efektivně. Nicméně přidáním ligandu TLR (Toll-like receptor) na fagozóm dojde k efektivnímu zpracování a prezentaci antigenu apoptických buněk. TLR signalizace ve fagozómu je důležitá pro aktivaci procesu antigenu a proteinových cest MHC II (Torchinsky et al., 2009).

Aktivace T-lymfocytů a proliferace vyžadují koordinovanou aktivaci proteokináz, transkripčních faktorů a produkci cytokinů. Mitogenní aktivita vyvolává silnou proliferaci T-lymfocytů. Přídavek antioxidantů inhibuje proliferaci a produkci IL-2, která je vyžadována pro optimální rozšíření T-lymfocytů (Fidelus et al., 1987, Novogrodsky et al., 1982, Dornand and Gerber, 1989, Chaudhri et al., 1988). Z toho vyplývá, že produkce ROS je důležitá ke zprostředkování aktivace T-lymfocytů (Chaudhri et al., 1986). Na rozdíl od toho některé studie uvádějí, že vystavení exogenním oxidačním stresům potlačuje mitogenní nebo antigenní indukci aktivace T-lymfocytů (Schmielau and Finn, 2001, Patterson et al., 1988). Další studie však takto jednoduchý pohled komplikují.

Ve skutečnosti se ukázalo, že peroxid vodíku může inhibovat a za určitých podmínek také stimulovat proliferaci lymfocytů (Roth and Dröge, 1987, Patterson et al., 1988, Los et al., 1995). Rostoucí množství intracelulárních antioxidantů jako je glutation (GSH), zvyšuje proliferaci myších slezinných lymfocytů v reakci na mitogeny (Fidelus and Tsan, 1986,

Fidelus and Tsan, 1987). Význam intracelulárního GSH v aktivaci T-lymfocytů byl také prokázán s použitím inhibitorů GSH syntézy, která snižuje produkci IL-2 (Hehner et al., 2000). V nedávné době bylo prokázáno, že antioxidantní enzymy (jako je superoxiddismutázy nebo kataláza) nebo přírodní antioxidanty (askorbová kyselina) nemají žádný vliv na proliferaci lidských primárních T-lymfocytů při stimulaci CD3 x CD28 (CD - diferenční skupina; CD patří mezi membránové antigeny) (Belikov et al., 2014). Jedná se o proteiny exprimované v T-buňkách, které poskytují kostimulační signály, vyžadované pro aktivaci a přežití T- buněk. I po desetiletích intenzivního zkoumání zůstává stále spornou otázkou vlivu ROS na potlačení/podpoření funkce T-lymfocytů. Pozorované rozdíly mohou být výsledkem použitých různých T-lymfocytů a jejich podskupin, kdy u nich může docházet k rozdílné citlivosti na oxidaci.

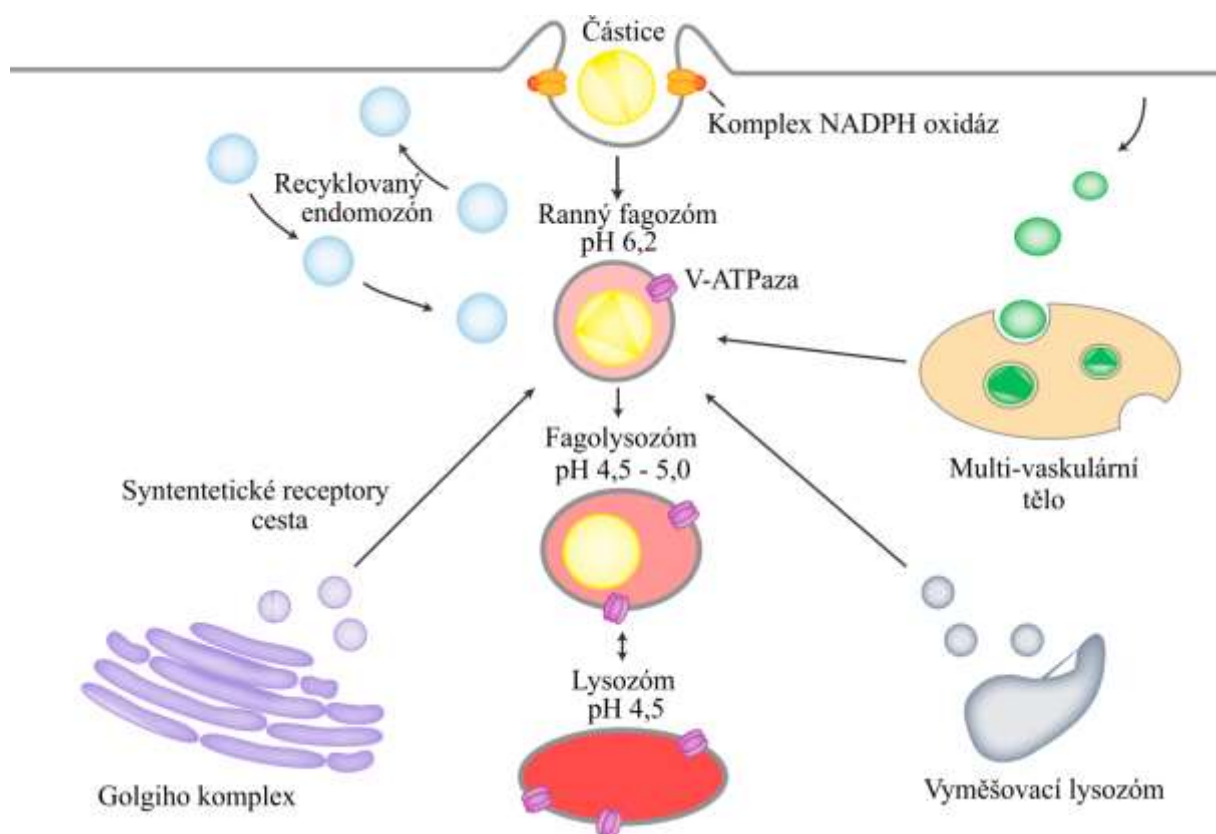
Kromě zjištění, že antioxidanty a peroxid vodíku stimulují aktivitu T-lymfocytů, jsou T-lymfocyty zdrojem ROS. Mnohé studie prokázaly, že TCR spouští produkci, jak singletového kyslíku, tak peroxidu vodíku v lidských a myších T-lymfoblastech, T-lymfocytech a také v Jurkat T-lymfocytech (Devadas et al., 2002, Kwon et al., 2003, Jackson et al., 2004, Remans et al., 2004, Kamiński et al., 2012, Belikov et al., 2014). Produkce ROS u T-lymfocytů je, vzhledem k velmi nízké koncentraci obtížná (Williams and Kwon, 2004),

2.3.1. Role fagocytózy v imunitním systému

Fagocytóza je definována jako buněčné pohlcení částic (> 0,5 μm) v rámci plazmatické membrány. Je úzce spjata a částečně překrývá endocytózy rozpustných ligandů pomocí tekuté fáze pinocytózy a receptorových cest. Cizí tělesa z infikovaných míst jsou fagocytovány neutrofily, makrofágy a dendritickými buňkami (Flannagan et al., 2012). K jejich označení se může použít pojem „profesionální fagocyty“, protože fagocytóza je jejich primární úkol (Lozupone and Fais, 2015, Wunderlich et al., 2015). Fagocytóza působí v první obranné linii proti infekci a také hraje důležitou roli v zahájení adaptativní imunitní reakce, podporované zapojením uvolňovaných prozánětlivých cytokinů.

K iniciaci fagocytózy dochází přichycením částice na receptory plazmatické membrány a jejich aktivaci. Signál přenosové kaskády se spouští s novým uspořádáním aktinového cytoskeletu, které vede k prodloužení plazmatické membrány po stranách částice. V té se postupně uzavírá, až dojde k úplnému zavření a vzniku fagocytární vakuoly. U fagocytární

vakuoly dochází k postupnému dozrávání různými fúzí, štěpením, které zahrnují zejména endozómy, ve speciálních případech také pomocí endoplazmatického retikula a je připraveno pro fúzi s lysozomem (obr. 1) (Pavelka and Roth, 2015).



Obr. 1: Fagocytární vychytávání exogenních částic - je výsledkem dynamické, integrované sekvence spojení plazmatické membrány s intracelulárními vezikulárními membrány, zrání fagozómů, které vyvrcholí ve fázi fagolysozómu a trávení. Upraveno dle Gordon (2016).

2.4. Biologicky aktivní sloučeniny u rostlin a hub

2.4.1. Sloučeniny s antioxidační a antiproliferační aktivitou

2.4.1.1 Vitamin E (α -tokoferol)

V přírodě existuje osm izomerů tokoferolu, které společně zahrnujeme pod označení vitamin E. Nejvíce rozšířeným a biologicky nejúčinnějším je α -tokoferol (Food and Nutrition Board et al., 2000). Vitamin E je silným zhášecem radikálů, bránícím šíření volných radikálů v membránách a plazmatických lipoproteinech (Traber and Atkinson, 2007). Vitamin E hraje důležitou roli v antioxidační ochraně lipidů, biologických membrán a lipoproteinové plazmy. Je tak považován za první linii obrany při řetězových peroxidačních reakcích polyenových

mastných kyselin (Sies and Murphy, 1991). Tokoferol dokáže reagovat 1000× rychleji, než polyenové mastné kyseliny (Buettner, 1993). Reaguje s meziprodukty lipoperoxidace, mění je na hydroperoxydy, které jsou následně rozkládány enzymem glutationperoxidázou. Tím dochází k přerušení řetězové reakce. Po odštěpení vodíku z jeho fenolové skupiny vznikají tokoferoxylové radikály, a aby byla možná jejich zpětná regenerace na vitamin E, reagují většinou s kyselinou askorbovou. Sled reakcí provázejících oxidační modifikace lipoproteinů o nízké hustotě, může vést až k ateroskleróze. Z toho důvodu se neustále *in vitro* i *in vivo* zkoumá vzájemný vztah mezi příjmem vitaminu E a vznikem těchto negativních stavů (Stephens et al., 1996). Kromě antioxidačních vlastností plní vitamin E v buňce také signální funkci a podílí se na pochodech, jako je buněčná proliferace (Arya et al., 1998, Aziz et al., 2003, Sylvester and Shah, 2005, Cheng et al., 2013, Cheng et al., 2014). Vitamin E je nezbytný pro zachování imunologické funkce u seniorů (Meydani et al., 1997), zejména pokud jde o imunitní synapse CD4 receptorů T-lymfocytů, které jsou důležité pro T-buněčnou signalizaci a funkci imunitního systému (Ahmed et al., 2004). Suplementace má svůj význam u deficientních subjektů, např. u předčasně narozených dětí (Debier, 2007) nebo u subjektů s vrozeným nedostatkem syntézy glutationu, případně glukózo-6-fosfátdehydrogenázy (Ristoff and Larsson, 1998).

2.4.1.2 Askorbová kyselina

Struktura askorbové kyseliny je podobná glukóze, ze které se u většiny savců vytváří. Pro primáty, člověka a některé další savce, je askorbová kyselina esenciální a jsme odkázáni na její příjem potravou (Sánchez-Moreno et al., 2003). Předpokládá se, že ztráta schopnosti syntézy askorbové kyseliny vedla k zvýšenému vzniku náhodných mutací a mohla být příčinou rychlejšího vývoje člověka (Challem, 1997). Určitou náhradou za neschopnost vytvářet askorbovou kyselinu, představuje močová kyselina. Lidský organismus přišel v průběhu evoluce o enzym urikázu. To vedlo ke zvýšení hladin urátů, solí močové kyseliny v tělních tekutinách, které slouží jako významný antioxidant (Racek, 2003). Block et al. (2004) zjistili, že askorbová kyselina může snížit hladinu C-reaktivního proteinu, což je marker zánětu a možná i prediktor onemocnění srdce. Askorbová kyselina v organismu zastává celou řadu dalších důležitých funkcí. Vystupuje jako kofaktor řady enzymů, účastní se hydroxylace prolinu a lysinu při biosyntéze kolagenu, podílí se na tvorbě karnitinu a noradrenalinu a je zapojena do metabolismu cholesterolu. Důležitá je i pro redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} v trávicím traktu. Mimo to má také významné postavení v oxidačně-redukčních dějích

(Murray et al., 2012). Působením volných radikálů askorbová kyselina oxiduje na dehydroaskorbát. Zvýšená zátěž volných radikálů může vyvolat pokles koncentrace kyseliny askorbové v krevní plazmě. Nedostatkem askorbové kyseliny proto nejčastěji trpí kuřáci, lidé prodávající těžké infekce, lidé s hypertensí nebo pacienti se septickým šokem (Galley et al., 1997). Prostřednictvím zvyšování aktivity fagocytů a jejich ochranou před oxidací zřejmě stimuluje obranyschopnost organismu. Z ovoce a zeleniny jsou nejvyšší koncentrace askorbové kyseliny nacházeny u papriky, rajčete, citronu, červeného rybízu a brokolice (Sánchez-Moreno et al., 2003). Více než 85 % celkového příjmu askorbové kyseliny u člověka je přijímáno potravou, zejména prostřednictvím příjmu ovoce a zeleniny (Davey et al., 2000)

2.4.1.3 Karotenoidy (β -karoten)

Karotenoidy jsou lipofilní rostlinné pigmenty, řadí se mezi terpenoidy, odpovědné za červené, oranžové a žluté odstíny ovoce nebo zeleniny (Rao and Rao, 2007). Jedná se o nejvýznamnější zdroj vitamínu A (Paiva and Russell, 1999). Existuje více jak 600 karotenoidů. Jen 40 z nich je přítomných v lidské potravě a jen 20 z nich bylo nalezeno v lidské krvi a tkáních. Nejvýznamnějšími zástupci jsou β -karoten, α -karoten, lykopen, lutein a kryptoxantin (Gerster, 1997). I když jsou karotenoidy přítomny v mnoha běžných potravinách, jako jsou ovoce, zelenina a produkty z nich (například džusy), představuje hlavní potravinový zdroj žluto-oranžová zelenina a ovoce. Ta bývá zdrojem β -karotenu a α -karotenu a oranžové plody poskytují α -kryptoxantin. Tmavá zelená zelenina poskytuje lutein a rajčata lykopen (Mangels et al., 1993). Mezi bohaté zdroje β -karotenu patří mrkev. U ní až 85 %, z karotenoidů tvoří β -karoten. Dalším důležitým zdrojem karotenoidů je špenát (*Spinacia oleracea*), kapusta (*Brasica oleracea*), vodní meloun (*Citrullus lanatus var. lanatus*), petržel (*Petroselinum crispum*), rajčata (*Solanum lycopersicum* L.), brokolice (*Brasica oleracea var. botrytis italica*) a tykev (*Cucurbita pepo*) (Ong and Tee, 1992, Reboul et al., 2006). Na základě epidemiologických studií zkoumajících obsah tkáňových karotenoidů a jejich příjem v potravě, je potvrzen vliv karotenoidů na snížení chronických onemocnění a výskyt rakoviny (Agarwal and Rao, 2000, Johnson, 2002, Elliott, 2005, Boeing et al., 2012, Kaulmann and Bohn, 2014, Leoncini et al., 2015).

2.4.1.4 Rostlinné fenolové sloučeniny

Největší pozornost, z antioxidantně působících látek přítomných v ovoci a zelenině, je v poslední době soustřeďována na rostlinné fenolové sloučeniny (tab. 1). V roce 1930 byla z pomeranče izolována nová substance, původně mylně považovaná za vitamin P. Až později bylo zjištěno, že se jedná o flavonoid (rutin) a nejedná se o vitamin, v pravém slova smyslu (Nijveldt et al., 2001).

Tabulka 1: Přehled některých fenolových sloučenin a jejich biologických účinků.

Sloučenina	Cílová aktivita	Buněčná linie /zvířecí model	Zdroj
Apigenin	iNOS, COX-2	Myší makrofágy	(Liang et al., 1999)
Apigenin	COX-2	T1 a T17 buňky	(Kang et al., 2009a)
Butein	IL-8	HT-29 buňky	(Lee et al., 2007)
Epigallokatechin	COX-2	SW837 buňky	(Shimizu et al., 2004)
Epikatechin	COX-2	TP-1 buňky	(Zhang et al., 2006)
Hesperidin	COX-2, NO, prostaglandin	RAW264.7 buňky	(Sakata et al., 2003)
Katechin	IL-12	J774.1 buňky	(Ichikawa et al., 2004)
Kvercetin	iNOS	Myší hepatocyty	(Martínez-Flórez et al., 2005)
Kvercetin	iNOS, COX-2	Lidské lymfocyty	(Raso et al., 2001)
Kvercetin	TNF- α , IL-1 β -	Periferní krevní buňky	(Sternberg et al., 2008)
Kvercetin	Fagocytóza	WEHI buňky	(Yu et al., 2010)
Kvercetin, kaempferol	iNOS, COX-2	Jaterní buňky	(García-Mediavilla et al., 2007)
Kvercetin, kaempferol	TNF- α , IL-6, IL-1 β -	RBL-2HR buňky	(Park et al., 2008)
Gallová kyselina	COX-1, COX-2	HL-60 buňky	(Madlener et al., 2007)
Chlorogenová kyselina	iNOS, COX-2	RAW264.7 buňky	(Hu and Kitts, 2004)
Kávová kyselina	COX-2	JB6 buňky	(Kang et al., 2009b)
Kávová kyselina	iNOS, COX-2	RAW264.7 buňky	(Hu and Kitts, 2004)
Luteolin	iNOS, COX-2	RAW264.7 buňky	(Chen et al., 2007)
Luteolin, fisitin, apigenin	IL-4, IL-5, IL-1 β -	Lidské basofily	(Hirano et al., 2004)
Nobiletin	COX-2	Lidské fibroblasty	(Lin et al., 2003)
Rutin, kvercetin	iNOS, COX-2	RAW264.7 buňky	(Shen et al., 2002)

COX-2 cyklooxygenáza; iNOS – indukovatelná syntáza oxidu dusnatého; IL-8 – interleukiny; TNF- α – Faktor nádorové nekrózy- α .

Toto zjištění vedlo k zahájení série výzkumů, s cílem izolovat další fenolové sloučeniny a prostudovat jejich mechanismy působení. Celkem je známo více jak 8 000 rozličných struktur, které lze rozdělit na fenolové kyseliny (mono-, di-, tri- hydroxybenzoové kyseliny a deriváty skořicové kyseliny), stilbeny, lignany a flavonoidy (flavonoly, flavony, flavanoly, flavanony, isoflavony, antokyanidiny). Jednotlivé skupiny se od sebe liší počtem fenolových kruhů (Manach et al., 2005). Na rozdíl od tradičních vitaminů nejsou esenciální. Zatímco vitaminy mají v těle vytvořeny speciální mechanismy pro jejich zadržování, fenolové sloučeniny jsou zpracovávány jako xenobiotika (Lugasi and Hóvári, 2003). Fenolové sloučeniny zvyšují biologickou hodnotu potravin, ve kterých se vyskytují a jsou nositeli kvality, na jejímž základě mohou být potraviny označovány jako „funkční“ (Kaur and Kapoor, 2001).

U ovoce a zeleniny jsou fenolové sloučeniny významným prvkem, podílejícím se na jejich jakosti, ovlivňují chuť, barvu a nutriční složení (Cheynier, 2005). Obsah fenolových sloučenin v potravinách závisí na kultivačních technikách rostlin, kultivarech, podmínkách růstu, procesu zrání, zpracování ovoce či zeleniny a na způsobu jejich skladování. Například loupání, krájení, vaření a smažení cibule může redukovat celkový obsah kvercetinu až o 75 % (Naczka and Shahidi, 2006). Denní příjem fenolových sloučenin se pohybuje kolem hodnoty 1 g (Scalbert and Williamson, 2000). Doporučený denní příjem flavonoidů by se měl pohybovat kolem 25 mg/den (Haidari et al., 2008). Takový příjem je výrazněji vyšší, než příjem antioxidantních vitaminů (Scalbert and Williamson, 2000).

Provedené studie na ověření účinnosti fenolových sloučenin, uskutečněné na buněčných tkáních nebo zvířatech prokázaly, že fenolové sloučeniny mají antioxidantní a protinádorovou aktivitu. Často se ukazuje, že tyto sloučeniny mají kromě aditivního účinku také synergický účinek (Liu, 2003, Nagaprashantha et al., 2011, Atanassova et al., 2011, Khan et al., 2012, Angst et al., 2013, Yang et al., 2015, Hung et al., 2015, Du et al., 2012, Chen et al., 2015).

Nejpočetnější skupinou z fenolových sloučenin jsou flavonoidy vyskytující se výhradně v rostlinách, nejčastěji ve formě glykosidů. Z chemického hlediska se jedná o skupinu různorodých látek, jejichž základ tvoří jedno, či více aromatických jader (mnohdy s heterocyklickou strukturou), na něž se váže několik fenolových skupin (Balasundram et al., 2006). Deriváty flavonoidů, které se vyskytují volně v přírodě – tzv. bioflavonoidy, jsou odvozeny od heterocyklu flavanu. Antioxidantní účinek bioflavonoidů závisí na jejich struktuře, poloze hydroxylových skupin a dvojných vazeb heterocyklického jádra (Rice-Evans

et al., 1996). Bors et al. (1997) stanovili tři základní kritéria, která se podílí na potenci molekuly flavonoidu zachytávat volné radikály: přítomnost dvou hydroxy-skupin v 3' a 4' pozici na B kruhu; dvojná vazba mezi C2 a C3, substituce C3 a C5 OH-skupinami a dále oxo-funkční skupina na C4. Jejich antioxidační vlastnosti jsou dále silně ovlivněny stupněm glykosylace např. aglykony kvercetin a myricetin vykazují *in vitro* daleko vyšší aktivitu než jejich glykosidy (Kaur and Kapoor, 2001).

Další skupinou jsou fenolové kyseliny, které se rozlišují na dvě základní skupiny: na deriváty benzoové kyseliny a na deriváty kyseliny skořicové. Hydroxybenzoové kyseliny jsou součástí struktury hydrolyzovatelných tanninů (gallotanninů v mangu a ellagitanninů v jahodách, malinách a ostružinách) (Manach et al., 2005). Hydroxyskořicové kyseliny jsou běžnější než hydroxybenzoové kyseliny. Nejvýznamnějšími z této skupiny jsou deriváty p-umarinové, kávové, ferulové a sinapové kyseliny (El Gharras, 2009).

Normální růst buněk v organismu je udržován rovnováhou mezi buněčnou proliferací a buněčnou smrtí, kdy tzv. apoptóza je centrálním regulátorem tkáňové homeostázy (Xu et al., 2011). Maligní buňky z různých částí orgánů, mají sníženou schopnost podstupovat buněčnou apoptózu, jako odpověď na fyziologické stimuly. Indukce buněčné apoptózy v maligních buňkách tedy může představovat slibnou strategii v protinádorové léčbě (Anter et al., 2011). Fenolové sloučeniny z rostlin a hub jsou schopny indukovat tuto buněčnou apoptózu v nádorových buňkách (Seelinger et al., 2008, Jeong et al., 2009). Rovněž mají schopnost vázat se na buněčnou membránu, proniknout touto membránou v *in vitro* kultivovaných buňkách a následně modulovat metabolické aktivity v buňce (Chan et al., 2000).

Bylo zjištěno, že struktura fenolových sloučenin vykazuje anti- a pro-oxidační schopnost (Leung et al., 2007). Několik nedávných studií prokázalo, že k protinádorové aktivitě dochází prostřednictvím pro-oxidačního účinku flavonoidů (Li et al., 2008, Habtemariam and Dagne, 2010). Nádorové buňky v porovnání se zdravými buňkami vykazují, při vyšší úrovni oxidačního stresu vyšší citlivost k toxickému účinku léků, které zvyšují hladinu ROS, v porovnání se zdravými buňkami (Valdameri et al., 2011). I přesto, že rostlinné fenolové sloučeniny mohou mít pro-oxidační účinek, jejich hlavní role spočívá zřejmě v antioxidačním působení, protože mají schopnost zhaset ROS, RNS a jiné volné radikály (Li et al., 2008, Habtemariam and Dagne, 2010).

Jedním z hlavních důvodů vzniku nádorových onemocnění je deregulace buněčného cyklu (Lu et al., 2005). Fenolové sloučeniny mohou inhibovat progresi buněčného cyklu (růstu) během S a G2/M fáze buněčného cyklu, vedoucí ke zpomalení nebo zastavení růstu

buněk. To je velmi důležité v prevenci nádorových onemocnění (Lu et al., 2005, Morley et al., 2007). Apigenin v koncentraci 100 μM , při 24 hodinové inkubaci, inhibuje buněčnou proliferaci v G2/M fázi buněčného cyklu na pankreatických buněčných liniích ASPC-1, MIA PaCa2 a S2-013. Při této koncentraci dochází ke snížení hladiny cyklinů A, B a fosforylované formy cdc2 a cdc25, které se řadí mezi proteiny potřebné pro přechod z G2 fáze na M fázi buněčného cyklu (Ujiki et al., 2006). Kvercetin indukuje buněčný růst v G2/M fázi buněčného cyklu u HeLa buněk (buňky karcinomu děložního hrdla), kdy $\text{IC}_{50} = 80 \mu\text{M}$, za 24 hodin. Dochází ke zpomalení mitochondriální apoptózy prostřednictvím uvolnění tumor supresorového proteinu p53 z mitochondrie do buněčné cytoplazmy (Vidya Priyadarsini et al., 2010). Flavonoidy tangeretin a nobiletin pocházející z citrusů při koncentraci 54 μM respektive 60 μM (24 hodinová inkubace), jsou schopné v G1/S fázi buněčného cyklu inhibovat proliferaci buněk kolorektálního karcinomu na buněčné linii HT-29 (Morley et al., 2007). Dále jsou na této buněčné linii schopny inhibovat buněčnou proliferaci flavonoidy obsažených v jablku, zejména to je chlorogenová kyselina ($\text{IC}_{50} = 289,2 \mu\text{M}$, za 72 hodinovou inkubaci) a kvercetin ($\text{IC}_{50} = 148,4 \mu\text{M}$, za 48 hodinovou inkubaci a 101,9 μM , za 72 hodinovou inkubaci) (Veeriah et al., 2006).

Zjištění, že se nádorové buňky mohou téměř neomezeně množit, vedlo k lepšímu chápání rakoviny a vytvoření průkopnických *in vitro* metod, pomocí kterých se stanovuje účinnost léčiv na nádorové onemocnění (Holbeck, 2004). Díky tomu byla koncem 20. století ustanovena celá řada lidských nádorových buněčných linií. Zároveň byly vyvinuty screeningové *in vitro* testy v 96-jamkových destičkách. Pomocí nich je možné stanovit potenciální antiproliferační aktivitu vybraných látek (Boyd and Paull, 1995). Tyto testy jsou založené na využití redukce tetrazoliových solí, kdy buňky jsou schopny aktivně redukovat na rozpustný formazan (Berridge et al., 2005). Kromě schopnosti neomezeně se množit mají nádorové buňky řadu metabolických drah, shodnou s buňkami normálními. Často se tak používají v *in vitro* modelech k simulaci pochodů a metabolických dějů v normálních buňkách (Volštátová et al., 2015).

V současné době jsou tyto *in vitro* testy určené pro hledání potencionálně účinných léčiv, zaměřených na malé molekuly, které usmrcují skupinu vybraných lidských buněčných linií (Gonzalez-Nicolini and Fussenegger, 2005). Testy na nádorových buněčných liniích jsou využívány jako první krok při hledání nových účinných léčiv na nádorová onemocnění. Sloučeniny, které jsou schopny úspěšně usmrcovat nádorové buňky v buněčných kulturách

nebo inhibovat jejich růst, jsou následně testovány na schopnost potlačovat růst nádoru na zvířecích modelech (Miranda et al., 1999).

2.4.2. Sloučeniny s imunomodulační aktivitou

2.4.2.1 Lektiny

Lektiny tvoří různorodou skupinu proteinů vázajících se specifickými vazebnými kapacitami na sacharidy. Byly izolovány z různých organismů, nicméně některé jsou typické pro houby. Jsou charakteristické specifickou imunomodulační, antiproliferační a protinádorovou aktivitou. Lektiny izolované z *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer (kukmák sklepní) vykazují silnější imunomodulační aktivitu, než jiný známý lektin - konkanavalin A (Sze et al., 2004). Lektiny odvozené z plodnice *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray (trsnatec lupinatý) jsou charakteristické pro své silné cytotoxické účinky, a to i při velmi nízkých koncentracích u HeLa buňek. Termostabilní lektin izolovaný z *Ganoderma capense* (Lloyd) Teng rovněž vykazuje vyšší mitogenní aktivitu, než konkanavalin A a antiproliferační aktivitu na leukemické buňky a hepatomy (Ngai and Ng, 2004). Imunitní systém je nesmírně komplexní a ne vždy je aktivita odhalena prostřednictvím systematického screeningu začínajícího u *in vitro* testů. Dva lektiny izolované z *Leucocalocybe mongolica* (S. Imai) X.D. Yu & Y.J. Yao (čirůvka mongolská), TML-1 a TML-2 ukazují imunomodulační a protinádorovou aktivitu, při testování v *in vivo*, ale ne v *in vitro* podmínkách. Účinek spočívá spíše v nespecifické aktivaci imunitního systému, než v jakýchkoli přímých cytotoxických účincích (Wang et al., 1996b). Lektiny stimulují produkci dusitanů a TNF- α , kdy inhibují růst myších lymfoblastů (P815), které vznikají při aktivaci faktorů makrofágů. Mezi tyto faktory patří interferony- γ (INF- γ) a další cytokiny, které se aktivují přes up-regulaci iNOS, interleukinu-1 β - (IL-1 β -) a transformující růstový faktor- β - (Liu et al., 2005).

2.4.2.2 Terpeny a terpenoidy

Terpeny jsou velkou a diverzifikovanou skupinou organických látek, které se skládají z pětiuhlíkatých isoprenových jednotek se vzorcem $(C_5H_8)_n$. Tyto terpenové sloučeniny jsou pojmenované na základě počtu opakování isoprenových jednotek. Nacházejí se v rostlinách a jsou hlavní složkou pryskyřic a silic. V houbách jsou terpeny přítomny v modifikované podobě (terpenoidy nebo isoterpenoidy) a vykazují biologickou aktivitu s potenciálním

lékařským využitím. Houby patřící do skupiny *Ganoderma* spp. jako například *G. orbiforme* (Fr.) Ryvarden (lesklokorka lesklá) a *G. applanatum* (Pers.) Pat. (lesklokorka ploská), jsou známé pro vysoký obsah triterpenoidů. Například lanostan ukazuje imunomodulační a protiinfekční aktivitu (Jeong et al., 2008). Extrakty z plodnic *Basidiomycetes* (stopkovýtrusné) obsahují širokou škálu terpenů a terpenových derivátů, jako je kyselina ganodermová, ganoderiková a ganoderová. Ty vykazují biologickou aktivitu, včetně stimulace nukleárního faktoru (NF)- κ B a mitogenem aktivované proteinkinázy (Gao et al., 2002).

2.4.2.3 Polysacharidy

Polysacharidy představují strukturně různorodou třídu biologických makromolekul složených z cukerných jednotek s širokou škálou fyzikálně chemických vlastností (Geethangili and Tzeng, 2011). Houby představují důležitý zdroj různých typů polysacharidů, které vykazují imunomodulační aktivitu (El Enshasy, 2011). Většina z těchto polysacharidů jsou homoglykany (polysacharidy, které obsahují zbytky jen jednoho typu molekul monosacharidu) nebo heteroglykany (polysacharidy, které obsahují zbytky dvou nebo více typů molekul monosacharidů). Polysacharidy jsou schopny se vázat s jinými proteiny za vzniku peptidoglykanů nebo polysacharido-proteinových komplexů. Poprvé zaznamenaný polysacharid s potencionální imunomodulační a protinádorovou aktivitou, byl lentinan, tvořený β -(1,3)-glukany v hlavním řetězci s postranními řetězci z jednotlivých β -(1,6)-glukanů spojených prostřednictvím D-glukozových zbytků s několika vnitřními β -(1,6)-glukany. Tento polysacharid s trojitou šroubovicovou strukturou byl poprvé izolován z *Lentinula* spp. v roce 1960 v Japonsku (Ikekawa et al., 1969). Od té doby bylo provedeno nespočet studií v oblasti výzkumu stanovení nových polysacharidových sloučenin s imunomodulační aktivitou extrahovaných z plodnic hub. Až koncem roku 1980 byly objeveny další dva polysacharidy β -glukanového typu, schizophyllan z *Schizophyllum commune* Fr. (klanolístka obecná) a krestin z *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (outkovka pestrá). Oba byly charakterizovány s ohledem na chemickou strukturu a účinnost (El Enshasy, 2011).

Polysacharidy mohou pocházet z bakterií, hub, hnědých řas a fotosyntézy rostlin. Molekulární cíle jejich biologického účinku jsou velmi rozmanité (tab. 2). Na buněčné úrovni představují polysacharidy buď rezervní polysacharidy v cytoplasmě nebo strukturní polysacharidy v membránách nebo v buněčných stěnách organismu (Leung et al., 2006).

Polysacharidy vykazují významné účinky v modulaci imunity. Obecně platí, že polysacharidy jsou rozpoznávány receptory na povrchu T buněk a spouští tak imunitní odpověď (Tzianabos, 2000). Rovněž jsou rozpoznávány receptory fagocytů, makrofágů a neutrofilních granulocytů (Bianco et al., 1975). Spolu s proteiny a polynukleotidy, které jsou základními biomakromolekulami v životních aktivitách, hrají významnou roli při mezibuněčné komunikaci, buněčné adhezi a molekulárním rozpoznáváním v imunitním systému (Dwek, 1996).

Tabulka 2: Polysacharidy z hub a jejich imunomodulační aktivita.

Název	Aktivní složka	Imunomodulační aktivita	Zdroj
<i>Agaricus subrufescens</i> Peck. (žampion brazilský)	Glykoprotein, β -1,3-D-glukan, s větvením β -1,6-D-glukany	Indukce produkce TNF, IFN- γ , a IL-8	(Firenzuoli et al., 2008)
<i>Cryptoporus volvatus</i> (Peck) Shear	β -1,3-D-glukan	Snížení aktivita TLR2 a NF- κ B	(Yao et al., 2011)
<i>Flammulina velutipes</i>	Glykoprotein, peptidoglykan	Zvýší se produkce NO, IL-1, a TNF- α sekrece	(Yin et al., 2010)
<i>Ganoderma orbiforme</i> (Fr.) Ryvarden	Ganoderan, heteroglykan, Mannoglukan, glykopeptid	Stimulace produkce TNF- α , IL-1, IFN- γ , aktivita NF- κ B.	(Zhu et al., 2007)
<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.) Pers. (korálovec ježatý)	heteroglykan-peptid, β -1,3 s větvením β -1,2-mannan	Stimulace NO produkce, zvýšená sekrece TNF- α , IL-1 β -, IL-12	(Lee et al., 2009)
<i>Inonotus obliquus</i> (Ach. ex Pers.) Pilát (rezavec šikmý)	β -D-glukan	Zvýšený IL-1 β -, IL-6, TNF- α , a iNOS u makrofágů	(Won et al., 2011)
<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	Lentinan, glukan, mannoglukan, proteoglykan	Indukce nespecifické cytotoxicity u makrofágů a zvýšená produkce cytokinů	(Bisen et al., 2010)
<i>Morchella conica</i> Fr. (smrž kuželovitý)	Galaktomannan	Indukce produkce NO, IL-1 β -, IL-6	(Su et al., 2013)
<i>Morchella esculenta</i> (L.) Pers. (smrž obecný)	Galaktomannan, β -1,3-D-glukan	Aktivované makrofágy, aktivita NF- κ B	(Cui et al., 2011)

IFN – interferon; IL – interleukin; TLR2 – toll-like receptor; TNF- α – Faktor nádorové nekrózy- α ; NF- κ B – Nukleární faktor kappa B.

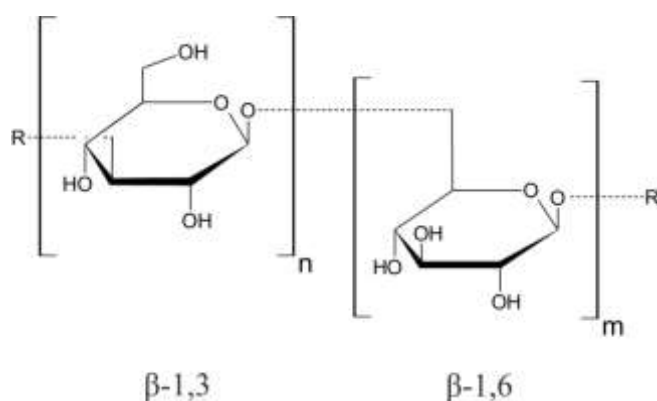
Tabulka 2 (pokračování): Polysacharidy z hub a jejich imunomodulační aktivita.

Název	Aktivní složka	Imunomodulační aktivita	Zdroj
<i>Ophiocordyceps sinensis</i> (Berk.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (housesnice čínská)	β -D-glukan, heteroglykan, kordyglukan	Zvýšení indukce IL-5 a snížení IL-4 a IL-17	(Chen et al., 2013)
<i>Pleurotus ostreatus</i> sensu Cooke [Ill. Brit. Fung. 279 (195) Vol.2 (1883)]	Pleuran, heterogalaktan, proteoglykan	Produkce IL-4 a IFN- γ	(El Enshasy et al., 2012)
<i>Sarcodon imbricatus</i> (L.) P. Karst.	Fukogalaktan, 1,6- α -D-glukan se zbytky glukopyranosylu	Zvýšení uvolňování TNF- α a NO u makrofágů	(Han et al., 2011)
<i>Podosordaria nigripes</i> (Klotzsch) P.M.D. Martin	β -glukan	Inhibice produkce NO, IL-1 β -, IL-6, TNF- α , a IFN- γ	(Ko et al., 2011)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary (hlízenka obecná)	Skleroglukan (1,6-monoglucosyl s větvením β -1,3-D-glukany)	Stimuluje proliferaci lymfocytů, zvýšení uvolňování TNF- α	(Bimczok et al., 2009)
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	Schizophyllan, 1,6-monoglucosyl větvení β -1,3-D-glukan	Aktivace T-buněk, zvýšení produkce interleukinů, TNF- α	(Hobbs, 2005)
<i>Sparassis crispa</i> (Wulfen) Fr. (kotrč kadeřavý)	β -glukan	Zlepšuje produkce IL-6 a INF- γ	(Ohno et al., 2003)
<i>Taiwanofungus camphoratus</i> (M.Zang & C.H.Su) Sheng H.Wu, Z.H.Yu, Y.C.Dai & C.H.Su (1994) (outkovka kafrová)	β -1,3-D-gluko-pyranan s větvením β -1,6-D-glukosylu, proteoglykan	Indukce INF- γ , TNF- α	(Geethangili and Tzeng, 2011)
<i>Trametes versicolor</i>	Krestin, heteroglykan, glykopeptid, polysacharid K, polysacharid peptid	Stimulace aktivovaných T buněk, zlepšení produkce IFN- γ a IL-2 k produkci, start genové produkce cytokinů (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8)	(Cui and Chisti, 2003)
<i>Tremella aurantialba</i> Bandoni & M. Zang	Heteroglykan	Zlepšuje u myši v slezině proliferaci lymfocytů	(Du et al., 2010)

IFN – interferon; IL – interleukin; TLR2 – toll-like receptor; TNF- α – Faktor nádorové nekrózy- α ; NF- κ B – Nukleární faktor kappa B.

Z hlediska imunitní účinnosti v boji proti nádorovým onemocněním byly polysacharidy izolované z hub vyhodnoceny jako účinnější díky struktuře skládající se z jednotek páteřního β -(1,3)-glukanu, na něž navazují řetězce napojené prostřednictvím β -(1,6)-glukanů s různými stupni větvení. Polysacharidy jsou potenciálně užitečné, biologicky účinné látky pro farmaceutické účely. Mají například vliv na regulaci imunitního systému proti negativním účinkům záření, hrají roli ve srážení krve, mají význam v léčbě rakoviny, HIV a regulaci glykémie (Chan et al., 2007). Navzdory mnoha *in vitro* a *in vivo* studiím, provedeným během posledních 50 let, které odhalují potenciál extraktů hub, jako imunomodulátorů, není k dispozici dostatek informací o jejich účinnosti v klinických studiích (El Enshasy and Hattikaul, 2013). Protinádorová aktivita houbových polysacharidů je zřejmě značným dílem připisatelná na vrub aktivaci imunitního systému (Wasser, 2002, Vannucci et al., 2013).

Mezi polysacharidy patří glukany, které obsahují glukózu jako jedinou monomerní jednotku. Tato skupina polysacharidů zahrnuje glykogen, celulózu a dextran (Rop et al., 2009). Nejvýznamnější z pohledu účinku na imunitní systém mají β -glukany s rozmanitější strukturou (tab. 3). Ovesné a ječmenné β -glukany mají především dlouhé lineární řetězce s jednotlivými monomery vzájemně spojenými dlouhými β -(1,4)-glukan vazbami, od nichž se oddělují řetězce kratší se strukturou β -(1,3)-glukanu. Na rozdíl od toho houby mají kratší řetězce β -(1,6)-glukanů navázané na páteřními větve β -(1,3)-glukanů (obr. 2). β -Glukany kvasinek mají větvení β -(1,6), ale s přídatnými řetězci β -(1,3)-glukanu (Akramiene et al., 2007).



Obr. 2: Struktura β -1,3 glukanů z hub s postranními β -1,6 řetězci.

Nedávné studie prokázaly vztahy mezi strukturou a aktivitou polysacharidů v imunitním systému, zejména u β -glukanů z hub (Chan et al., 2007, Akramiene et al., 2007).

Polysacharidy izolované z hub vykazují účinnější modulaci imunitního systému, než polysacharidy z jiných zdrojů (Chan et al., 2007). β -glukany stimulují imunitní systém a jejich účinky jsou pravděpodobně spojeny s aktivací makrofágů. Dále makrofágy, T-lymfocyty, B-lymfocyty a NK buňky proliferující se v reakci na přítomnost polysacharidů, tzv. BRM (modifikátory biologické odpovědi – biological response modifiers), působí na stimulaci, která je zprostředkována vazbou polysacharidů na odpovídající receptory (Leung et al., 2006).

β -Glukany byly popsány jako modulátory humorální a buněčné imunity. Aktivita β -(1,3)-D-glukanů z hub naznačuje, že mohou mít příznivé účinky při zánětlivých onemocněních, kdy mohou být modulátory protizánětlivé odpovědi, jako mediátor interleukinů (Mantovani et al., 2008). β -Glukany mohou být také využity v nevyváženém imunitním systému několika rozdílnými způsoby (Ley, 2008), jak je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Struktura, zdroj a biologická aktivita β -glukanů.

Struktura	Zdroj	Účinek	Zdroj
β -(1,3); (1,6)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex E.C. Hansen	Anti-parazitický	(Soltys et al., 1996)
		Anti-bakteriální	(Cisneros et al., 1996)
		Anti-fungální	(Meira et al., 1996)
		Anti-mutagenní, genotoxický	(Tohamy et al., 2003, Şener et al., 2006, Oliveira et al., 2007)
		Protinádorová	(Kiho et al., 1998)
		Stimulce krvetvorby	(Turnbull et al., 1999)
	<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin) Berkhout	Imunostimulační aktivita	(Miura et al., 2003)
	<i>Poria cocos</i> F.A. Wolf	Protinádorová	(Wang et al., 2004)
		Indukce cytokinů	(Grinde et al., 2006)
		Anti-mutagenní, genotoxická	(Masihi, 2000)
<i>Agaricus subrufescens</i> Peck	Inhibice CYP450	(Hashimoto et al., 2002)	
	Protinádorová	(Ohno et al., 2001)	

Tabulka 3 (pokračování): Struktura, zdroj a biologická aktivita β -glukanů.

Struktura	Zdroj	Učinek	Zdroj
β -(1,3); (1,6)	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	Protinádorová	(Ohno et al., 2001)
		Protinádorová	(c Ooi and Liu, 2000, Zhang et al., 2005)
	<i>Schizophyllum commune</i> FR.	Protinádorová	(c Ooi and Liu, 2000)
β -(1,3); (1,4)	<i>Avena</i> spp. (oves)	Anti-bakteriální,	(Shin et al., 2005)
		Anti-parazitická	(Yuri et al., 1998)
		Anti-trombolická	(Chang et al., 2006)
	<i>Hordeum</i> spp. (ječmen)	Anti- mutagenní	(Oliveira et al., 2006, Angeli et al., 2006)

2.5. Význam ovoce, zeleniny a hub ve výživě člověka

2.5.1. Význam rostlin a hub ve výživě lidí

Souvislost mezi stravou a zdravím byla známá již od dávných dob, kdy lékaři léčili své pacienty bylinami a potravinami, o kterých věřili, že mají léčebné vlastnosti (Steinmetz and Potter, 1996). Z tohoto důvodu je strava bohatá na ovoce a zeleninu široce doporučována pro své pozitivní vlastnosti na lidské zdraví. Z nutričního hlediska je nenahraditelným zdrojem řady vitaminů a je zdrojem nestravitelných fermentovatelných sacharidů snižujících riziko vzniku rakoviny tlustého střeva (Terry et al., 2001). Dále je ovoce a zelenina nejbohatším zdrojem biologicky aktivních látek, jako jsou rostlinné fenolové sloučeniny (fenolové kyseliny, flavonoidy, chinony, kumariny, lignany, stilbeny, taniny) (Zheng and Wang, 2001, Cai et al., 2003), různé sloučeniny dusíku (alkaloidy, aminy) (Velioglu et al., 1998), vitaminů (Proteggente et al., 2002) a terpenoidy (včetně karotenoidů) (Velioglu et al., 1998, Burns et al., 2003). Tedy sloučenin vykazujících protizánětlivou, protinádorovou, antimutagenní, anti-bakteriální a antivirovou aktivitu (Halliwell, 1994, Owen et al., 2000, Sala et al., 2002, Koushik et al., 2012, Reiss et al., 2012, Jansen et al., 2013).

Mezinárodní organizace, působící v oblasti monitoringu a osvěty v oblasti lidského zdraví, jako je Světová zdravotnická organizace (World Health Organization), doporučují konzumaci minimálně 400 g ovoce a zeleniny denně, přičemž další zvýšení může vést

k dalším zdravotním benefitům. Jedna porce (150 ml) může být nahrazena doma připraveným džusem (Caswell, 2009). Právě džusy se stávají v poslední době stále populárnějšími, jako rychlá a dobře dostupná náhrada čerstvého ovoce a zeleniny v lidském jídelníčku.

Další nedílnou součástí zejména střeoevropské a asijské stravy jsou houby, které jsou obdobně jako zelenina a ovoce konzumovány po celá staletí. Zpočátku tomu pravděpodobně bylo díky uspokojivé chuti a textuře, která byla tak atraktivní, že v některých společnostech byla jejich konzumace omezena jen na královské rodiny. Mimoto po více jak 2 000 let sloužily některé druhy hub jako léčiva a tonika (Miles and Chang, 1997). Znalost nutriční hodnoty volně rostoucích hub byla omezena na chápání hub společností, především v porovnání se zeleninou, jako pouhé pochutiny (Kalač, 2009). Houby jsou označovány jako funkční potraviny a jsou zdrojem bílkovin s vysokou biologickou hodnotou. Současně jsou vhodnou dietní potravinou, protože mají nízký obsah lipidů. Mezi hlavní lipidy hub patří fosfolipidy, steroly, estery sterolu, mono-, di- a triglyceridy mastných kyselin, jakož i volné mastné kyseliny (Sadler, 2003).

V mnoha evropských zemích jsou volně rostoucí houby konzumovány jen zřídka. Jejich konzumace je upřednostňována především v zemích střední a východní Evropy. V České republice, kde je houbaření považováno za „národní koníček“, se spotřeba pohybuje okolo 5,6 kg čerstvých hub, na jednu domácnost ročně (Kalač, 2009). V ostatních evropských zemích je konzumace volně rostoucích hub zanedbatelná - například ve Spojeném království činí konzumace volně rostoucích hub 0,12 kg na domácnost za rok (Román et al., 2006). Proti tomu je výrazná konzumace komerčně pěstovaných hub a to zejména *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach (pečárka dvouvýtrusá), která ve Spojeném království činí 1,8 kg/osobu/rok (Clarke, 2010).

2.5.1.1 Ovoce a zelenina

Ovoce a zelenina jsou důležitým zdrojem vitaminů (např. C, A, E, B₆, tiaminu, niacinu), minerálních látek, vlákniny, ale i dalších látek s biologicky významným účinkem (Grassmann et al., 2002). Výjimečnost askorbové kyseliny, tokoferolů, karotenoidů a některých fenolových sloučenin, zejména flavonoidů, je dána jejich schopností působit antioxidačně v řadě fyziologických procesů (Kaur and Kapoor, 2001, Crozier et al., 2009). Epidemiologické studie dokládají, že existuje určitá pozitivní korelace mezi příjmem ovoce, zeleniny a prevencí onemocnění, jako jsou zejména nádorová onemocnění, diabetes, artritida

a řada jiných chronických onemocnění (Freedman et al., 2007, Yamaji et al., 2008, Carter et al., 2010, Key, 2011, Boeing et al., 2012).

V poslední době získaly na oblibě zejména ovocné a zeleninové džusy připravované doma. Přínos takových džusů byl podpořen uskutečněnou studií, která prokázala, že lidé, kteří pijí ovocné a zeleninové džusy, mají lepší celkové stravovací zvyklosti. Konkrétně výzkum provedený na skupině 3 618 dětí ve věku 2–11 let poukázal na fakt, že děti, které konzumovaly denně více než 170 ml ovocného džusu, měly jednoznačně vyšší příjem askorbové kyseliny, vitamínu B6, folátů, sodíku, hořčíku a železa. A naopak měly mnohem nižší příjem nasycených mastných kyselin. Zvýšená spotřeba džusů navíc pozitivně korelovala s vyšší konzumací ovoce a zeleniny, což ovšem na druhou stranu neznačí příčinnou souvislost (Caswell, 2009).

Je provedena celá řada studií na stanovení antioxidační aktivity ovoce a zeleniny (Duthie et al., 2006, Sun et al., 2007, de Souza et al., 2014, Reque et al., 2014). Velký zájem budí zejména druhy, které jsou běžně konzumovány ve formě džusů nebo jako součást pokrmů, a přitom mají význačné obsahy vybraných fytochemikálií se zdravím prospěšným účinkem. Jedná se zejména o brokolici (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) používanou k přípravě polévek nebo jako příloha pokrmů. Má se za to, že látky obsažené v brokolici snižují LDL cholesterol a zlepšují pružnost a pevnost cévních stěn. Celer (*Apium graveolens* L.) se využívá jako koření a ve starém Egyptě dokonce jako afrodiziakum. V současné době se kromě kulinářského využití používá v lidovém léčitelství na snížení krevního cukru a hladiny krevního tlaku. Z ovoce jsou velmi oblíbené zejména borůvky (*Vaccinium myrtillus* L.) nebo jablka (*Malus domestica* Borkh.), z obou se vyrábí nebo jsou součástí džusů. Tyto druhy jsou bohatým zdrojem fenolových látek. V následující části jsou uvedeny základní charakteristiky a vlastnosti čtyř vybraných druhů ovoce a zeleniny, které vykazovaly později v experimentální části významné výsledky biologické aktivity.

Brokolice (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) je košťálovou zeleninou, patřící do čeledi *Brassicaceae* (brukvovitých). Je populární zeleninou využívanou v kuchyni, s řadou prokázaných zdravích prospěšných účinků. Provedená retrospektivní epidemiologická studie ukazuje, že zvýšená spotřeba brukvovité zeleniny v podobě tří a více porcí týdně oproti jedné porci týdně vede ke snížení rizika rakoviny prostaty o 41 % (95% s intervalem spolehlivosti = 0,39–0,90) (Cohen et al., 2000). Kromě antioxidačních vitaminů a fenolových sloučenin, brukvovitá zelenina obsahuje sloučeniny ze skupiny glukosinolátů. Příkladem jsou glukobrassicin 3-indolylmetyl, glukorafanin a 4-metylsulfinylbutyl. Ty mají spíše nízkou

antioxidační aktivitu (Plumb et al., 1996). Produkty jejich hydrolýzy, především izotiokyanáty mohou mít ochrannou funkci proti rakovině (Keum et al., 2004). Jedná se zejména o sulforafan (1-izotiokyanáto-4-metylsulfanylbutan), který je produktem hydrolýzy glukorafanu. Sulforafan má vliv na detoxifikační enzymy podílející se na čištění chemických karcinogenů a reaktivních forem kyslíku, dále má anti-tumorigenní vlastnosti, které způsobují zastavení buněčného cyklu a apoptózu nádorové buňky (Jeffery and Araya, 2009). Další sloučenina patřící mezi izotiokyanáty – benzylizotiokyanát (BITC) a fenetylizotiokyanát (FEITC) dokáží inhibovat syntézu DNA s IC_{50} 5,1 $\mu\text{mol/l}$ respektive 2,4 $\mu\text{mol/l}$. Koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$ má za následek výrazné prodloužení délky dělicího cyklu buňky u buněčné linie Caco-2 od 32 h do 220 h (BITC) a 120 h (FEITC). Zvýšení této koncentrace až na 10 $\mu\text{mol/l}$ vede ke zvýšení inhibice proliferace buněčného cyklu v G2/M fázi z 12,4 % na 48,3 % (BITC) a 36 % (FEITC) (Visanji et al., 2004).

Celer (*Apium graveolens* L.), jehož zdraví prospěšný účinek spočívá ve schopnosti regulovat činnost srdce, slinivku břišní, může přispívat ke zvýšené sekreci inzulínu potřebného pro snížení hladiny glukózy v krvi. Může tak být podáván nebo přijímán pro omezení komplikací vzniklých v důsledku diabetu nebo jeho léčbu (Thimm et al., 2002). Listy a bulvy celeru mají vliv také na biochemické parametry, jako je obsah glutationu, aktivitu katalázy, glutationperoxidázy, xantinoxidázy a peroxidázy (Hamza and Amin, 2007). U čerstvého stonku byla stanovena vláknina o obsahu 1,0–1,8 g/100 g (Raffo et al., 2006), přičemž je známo složení pektinu, který tvoří hlavní část buněčné stěny (Thimm et al., 2000) a má protizánětlivou aktivitu (Popov et al., 2006). Z biologicky aktivních sloučenin celer obsahuje fenolové sloučeniny (155,4–117,2 mg/100 g), jako jsou apiin, apigenin, isokvercetrin, třísloviny (4–4,4 mg /100 g) a kyselinu fytovou (19,6–22,1 mg/100 g) (Khare, 2008). Například apigenin (50–80 μM) je schopný inhibovat buněčnou proliferaci u buněk kolorektálního karcinomu buněčné linie Caco-2 a HT-29, kdy v G2/M fázi buněčného cyklu dochází k inhibici buněčné proliferace u 42 % pro HT-29 a 26 % pro Caco-2 buněčnou linii oproti kontrole (15 %) (Wang et al., 2000).

Borůvky (*Vaccinium* spp.) patří do čeledi *Ericaceae* (vřesovcovité) a jsou konzumovány po staletí. Dnes existují důkazy o tom, že příjem tohoto ovoce může zlepšit náš zdravotní stav (Seeram, 2008). Látky z *V. myrtillus* L. mohou hypoteticky zabránit vzniku nádorových onemocnění (Neto, 2007) tím, že zabraňují růstu nádorových buněk (Katsube et al., 2003, Seeram et al., 2006, Bao et al., 2008). Za tuto schopnost jsou pravděpodobně zodpovědné přítomné antokyany a jejich glykosidy, jako je delfinidin nebo malvidin (Katsube et al.,

2003). Přitom byly potvrzeny antiproliferační a anti-oxidační vlastnosti těchto antokyanů. Tyto látky inhibují buněčný růst u HT-29 a Caco-2 buněčných linií v koncentraci 15–50 µg/ml a mají také za následek 2–7× zvýšení fragmentace DNA, což ukazuje na indukci buněčné apoptózy (Yi et al., 2005). Delfinidin, v koncentraci 6 µM v přítomnosti buněčné linie prsního karcinomu MCF-7, významně inhibuje tvorbu aduktů benzo[a]pyrenu a DNA. Navíc došlo k potlačení vzniku ROS (Singletary et al., 2007). Antokyanový extrakt z borůvky *Vaccinium uliginosum* L. obsahuje kyanidin-3-glukosid (140,9±2,6 µg/mg sušiny), následovaný malvidin-3-glukosidem (10,3±0,3 ng/mg) a malvidin-3-galaktosidem (8,1±0,4 µg/mg). Tento extrakt nemá žádný cytotoxický vliv na buněčnou linii HEP-G2 (IC₅₀ = 0,56 mg/ml) a Caco-2 (IC₅₀ = 0,39 mg/ml). Buňky vystavené extraktu snižují růst v G1 fázi, bez vlivu na G2/M fázi buněčného cyklu (Liu et al., 2010).

Jablka (*Pyrus Malus* L.) jsou jedním z hlavních zdrojů flavonoidů v lidské potravě. Mohou obsahovat až 2 g fenolových sloučenin na kg čerstvých jablek (Bao et al., 2013). Mezi fenolové sloučeniny patří kvercetin a jeho glykosidy, epikatechin, katechin, floretin, floridzin a chlorogenová kyselina (Lu and Yeap Foo, 2000, Chinnici et al., 2004). Stejně jako u předchozích potravin mají tyto fenolové sloučeniny řadu antioxidačních a antiproliferačních schopností. Provedené studie vypovídají, že konzumace i přibližně 2/3 jablka denně (110 g), vede k 49 % snížení rizika srdečního infarktu u mužů, v porovnání s muži, kteří konzumovali pouze 18 g jablek denně (Hertog et al., 1993). Na modelu lidského metastazujícího karcinomu tlustého střeva (buněčná linie SW620) bylo prokázáno, že proantokyanidiny z jablka mohou měnit signální dráhy polyaminové biosyntézy a spouštění apoptózy v nádorových buňkách (Gossé et al., 2005). Extrakty z jablek mají silnou schopnost inhibovat růst buněčné linie HT-29 (IC₅₀ = 36,6 µM za 48 h a 27,9 µM za 72 h) a značně ovlivňovat expresi genů kódujících enzymy, jsou to především GSTP1, GSTT2, GSTM2 (glutathion S-transferáza - GST), CHST5 a CHST6 (sulfotranferáza - Carbohydrate sulfotransferase CHST) v sub-toxických koncentracích (Veeriah et al., 2006). Na buněčných liniích MCF-7 dochází k významné inhibici buněčné proliferaci při koncentraci 10–80 mg/ml. Při koncentraci >20 mg/ml dochází u buněčné linie MCF-7 k významné indukci G1 fáze buněčného cyklu. V závislosti na dávce po vystavení extraktu jablka se u buněk snižuje produkce cyklinu D1 a proteinu CDK4, patřící mezi tranzitní regulátory, účastníci se progresu v G1 fázi a přechodu G1 do S-fáze buněčného cyklu (Sun and Liu, 2008).

2.5.1.2 Houby

Houby (*Fungi*) představují skupinu živých organismů, které se dříve přiřazovaly k rostlinám, ale nyní mají vlastní samostatný taxonomický řád (Bovi et al., 2013). Na světě je známo více jak 70 000 druhů hub (Blackwell, 2011), z toho více než 2 000 druhů hub je jedlých. Přesto pouze 25 druhů z nich je široce akceptováno jako jedlé a jsou komerčně pěstovány (Valverde et al., 2015). Mezi světově nejčastěji pěstované houby patří *A. bisporus*, následovaný druhem *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (houževnatec jedlý, známý též jako Shitake), *Pleurotus* spp. (hlíva), a *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer (penízovka sametonohá). Jejich produkce se neustále zvyšuje a mezi největší světové producenty patří především Čína (Miles and Chang, 2004, Patel and Goyal, 2012). Divoké druhy hub jsou stále důležité pro svou nutriční hodnotu a mají farmakologický význam (Günç Ergönül et al., 2013). Látky obsažené v houbách mají antioxidační aktivitu (Piazzon et al., 2012) nebo mohou být alternativním zdrojem nových antimikrobiálních sloučenin - zejména sekundárních metabolitů, jako jsou například terpeny, steroidy, antrachinony, deriváty benzoové kyseliny a chinoliny, ale i některých primárních metabolitů, což je například šťavelová kyselina, peptidy a proteiny (Alves et al., 2013). Mezi nejvíce prostudovaný druh patří *L. edodes*, u kterého jsou prokázány antibakteriální účinky proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím (Alves et al., 2012).

Houby jsou zdrojem fenolových sloučenin, s rozdílnými bioaktivními vlastnostmi, kterým je připisována protinádorová aktivita. Acetylované formy nebo konjugáty s glukuronovou kyselinou, například z houby *Coprinopsis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo (hnojivka inkoustová), vykazují vyšší cytotoxicitu, v porovnání s odpovídajícími mateřskými kyselinami (Heleno et al., 2014). V současnosti je však velmi málo známo o mechanismu účinku fenolových sloučenin a jejich bioaktivních formách *in vivo*, které mohou přispět k prevenci celé řady onemocnění. Kromě několika studií zabývajících se biologickými účinky fenolových kyselin je ignorována otázka jejich fyziologických koncentrací v tělním oběhu po požití, jakož i rychlý katabolismus (Rechner et al., 2002).

Mimo nutriční vlastnosti jsou houby využívány pro své léčivé vlastnosti (Smith et al., 2002). Po celá staletí byly houby a extrakty z nich využívány jako léčiva nebo tonika. Moderní výzkum identifikoval a otestoval zdraví prospěšné látky, obsažené v houbách. Zdraví prospěšné účinky mají i nejedlé houby, které obsahují vhodné metabolity, využívané

k léčebným účelům (Miles and Chang, 1997). V současné době existuje více než 270 druhů hub, u kterých jsou známy jejich terapeutické vlastnosti (Smith et al., 2002).

Využití hub při léčbě různých onemocnění má dlouhou tradici v Japonsku, Číně, Koreji a jihovýchodní Asii. V Evropě a v USA jsou houby k léčbě využívány od roku 1980 (El Enshasy, 2011). Některé chronické nemoci, jako jsou srdeční choroby, mrtvice, různé druhy rakovin, chronické respirační onemocnění a diabetes, mají významný podíl na úmrtnost ve světovém měřítku (De Silva et al., 2012). Přestože byla pozornost věnována různým imunologickým vlastnostem a protinádorovým účinkům, nabízejí houby také další potencionálně důležité terapeutické vlastnosti. Ovlivňují vysoký krevní tlak, hladinu cholesterolu, mohou chránit játra a mít další anti-virové a anti-bakteriální účinky (Smith et al., 2002). Působí protizánětlivě, probioticky a na kardiovaskulární systém (Patel and Goyal, 2012). Předpokládá se, že protinádorový efekt je zprostředkován spíše než přímou cestou s cytotoxickou aktivitou, nepřímo přes imunomodulační aktivitu (Chan et al., 2007). Aktivní látky obsažené v houbách jsou považovány za modifikátory biologické odezvy (Wasser and Weis, 1999). Znamená to, že mohou způsobit buněčné poškození, zapříčinit buněčný stres, ale ve svém důsledku mají i pozitivní vliv a pomáhají lidskému tělu v možnosti přizpůsobení různým environmentálním a biologickým účinkům, kterým je lidské tělo vystaveno (Ren et al., 2012).

V průběhu let bylo provedeno mnoho klinických a epidemiologických studií zaměřených na imunomodulační aktivitu hub. Největší pozornost přitahují zejména *Agaricus subrufescens* Peck. (žampion mandlový), *Ganoderma lucidum* sensu auct. asiatic. (lesklokorka lesklá), *G. frondosa*, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (houževnatec jedlý), které jsou známé v historii celosvětově používané etnomedicíny. Zatímco *A. subrufescens* pochází z Brazílie a má kulinářské využití nebo je využíván pro své léčebné vlastnosti, zejména v horských oblastech Brazílie, je druhá jmenovaná součástí tradiční čínské medicíny. Všechny tyto druhy hub jsou hlavně zdrojem polysacharidů, s výraznou imunomodulační funkcí, které jsou izolované a purifikované pro použití v podpůrné léčbě u pacientů podstupujících chemoterapii. V následující části jsou uvedeny základní charakteristiky a vlastnosti čtyř nejdůležitějších imunomodulačních druhů hub.

Agaricus subrufescens Peck. je jednou z nejdůležitějších hub využívanou v kulinářství i při léčbě (Wasser, 2002). Do Japonska se dostala díky svým údajným účinkům na zdraví. I dnes je jako jedlá houba, široce využívaná v orientálních zemích. Je považována za funkční potravinu a využívá se v přírodní terapii převážně ve formě léčivého extraktu pro snížení

negativního vlivu chemoterapie a radioterapie. Využívá ji okolo 300 000–500 000 lidí, kteří ji konzumují nejčastěji podle předpisu třikrát denně v množství 3–5 g vodného extraktu, v závislosti na výtěžnosti (Takaku et al., 2001). U klinické studie, ve které posuzovali vliv, denního příjmu *A. subrufescens* po dobu 6 měsíců, na zlepšení života u pacientů s nádorovými onemocněními, výsledky před a po ukončení studie ukázaly výrazné zlepšení života. Pro šetření byl použit dotazník SF-8 Health Survey. U mužů nastalo výrazné zlepšení fyzických schopností a u žen duševní pohody. Dále u lidí ve věku 65 let došlo ke zlepšení psychické pohody a ve věku starších 66 let k zlepšení fyzických schopností (Ohno et al., 2013). K tomuto zlepšení mohlo dojít vlivem sníženého oxidačního stresu, stimulací imunitního systému nebo snížením hladiny cholesterolu. Pro komplexní vliv na mnoho aspektů lidského zdraví a imunitu jsou některé houby považovány za funkční potraviny. Provedená studie měla za cíl sledovat chemoprotektivní účinek vodného extraktu *A. blazei* na poškození DNA a na hepatokarcinom buněčné linie HEP-G2, prostřednictvím benzo[a]pyrenu (B[a]P). Výsledky naznačují, že přítomné β -glukany působí prostřednictvím vazby na B[a]P nebo zachycením volných radikálů, vznikajících při jejich aktivaci (Angeli et al., 2009). Vodný extrakt obsahující agaritin (10 μ g/ml) po 48 hodinové expozici u buněčné linie mužského lymfomu U937 zvyšoval množství buněčného proteinu annexin V a postupně v závislosti na koncentraci zvyšoval aktivitu kaspázy-3,-8,-9. Přítomnost inhibitoru kaspázy-3 nebo serinové proteázy granzymu B expresi annexinu V zase snížila, což potvrzuje vliv na apoptózu (Akiyama et al., 2011). Výsledek by mohl poskytnout užitečné informace pro tvorbu protinádorových léků zejména pro pacienty s leukemií.

Ganoderma lucidum je známá též pod japonským názvem reishi. Po dlouhou dobu byla využívána v tradiční čínské medicíně, kde sloužila k prevenci nebo léčbě řady onemocnění (Lin, 2005). Jedná se o velmi populární houbu, která je využívána na zlepšení zdraví a podporu dlouhověkosti, v oblastech východní Asie (Zhao et al., 2010). Mezi izolované chemické sloučeniny z této houby, s farmakologickým přínosem, patří triterpenoidy, polysacharidy, ceněné sloučeniny jsou bílkoviny, aminokyseliny, alkaloidy, steroidy, mastné kyseliny a enzymy (Boh et al., 2007). Mezi triterpenoidy patří ganoderová kyselina T (GA-T), která je získávána čištěním metanolového extraktu z *G. lucidum*. GA-T je schopný inhibovat proliferaci karcinomu plic buněčné linie 95-D, kdy IC_{50} je 27,9 μ g/ml. Při dávce 50 μ g/ml (24h) byla životaschopnost snížena o 70 %. Během 24 hodinové inkubace dochází k indukci apoptózy a zastavení buněčného cyklu v G1 fázi. Dochází ke zvýšení apoptózy o 28 %, proti neošetřené kontrole. Naopak během S fáze se apoptóza snižuje

o 24 %. GA-T dále snižuje mitochondriální membránový potenciál v průběhu indukované apoptózy. Během apoptózy byla také sledována stimulace kaspázy-3, ale ne kaspázy-8. Kaspáza-3 byla zapojena do buněčné apoptózy (Tang et al., 2006). Extrakcí teplou vodou dojde k získání polysacharidových frakcí z *G. lucidum*. Tento extrakt na mononukleárních buňkách z lidské periferní krve (PBMC) prokázal v koncentraci 187,8 pg/ml imunopresivní účinek po 48 hodinové inkubaci, na rozdíl od *A. bisporus*, kdy je tato hodnota 392,2 pg/ml na aktivovaných PBMC buňkách a indukující syntézu INF- γ (Kozarski et al., 2011). Polysacharidy z *G. lucidum* silně stimulují proliferaci makrofágů buněčné linie RAW264.7 a to zvýšením proliferace o 58 %, při koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$, v porovnání s koncentrací 0 $\mu\text{g/ml}$. Při koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ dochází k stimulaci produkce oxidu dusnatého a výrazně vyšší produkci (21,16 μmol), v porovnání s koncentrací 0 $\mu\text{g/ml}$ (6,32 μmol) a u pozitivní kontroly ošetřených jen LPS (20,52 μmol) (Shi et al., 2014).

Grifola frondosa (Dicks.) Gray, známa též pod japonským označením jako maitake je běžně dostupná na trhu v Číně, Japonsku a dalších asijských zemích jako léčivá a jedlá houba (Chen et al., 2012). Heteropolysacharid GFPS1b, získaný extrakcí horkou vodou z *G. frondosa*, vykazuje účinnější antiproliferační vlastnosti při koncentracích 100, 300 a 500 $\mu\text{g/ml}$ na buněčné linii MCF-7, v porovnání s jinými polysacharidy GFPS0, GFPS1a, GFPS3 a GFPS5 (Cui et al., 2007b). Polysacharid GFPS1b má pozitivní farmakoterapeutické vlastnosti *in vitro*, kdy výrazněji inhibuje proliferaci buněčné linie karcinomu žaludku SGC-7901 ($\text{IC}_{50} < 40 \mu\text{g/ml}$), v porovnání s „normálními“ jaterními buňkami buněčné linie L-02 ($\text{IC}_{50} > 800 \mu\text{g/ml}$). Polysacharid u této buněčné linie vyvolává buněčnou apoptózu v G2/M fázi, kdy při koncentraci 60 a 120 $\mu\text{g/ml}$ se výrazně zvyšuje apoptóza z 0,59 %, na 8,6 % a 15,08 %, v porovnání s neošetřenou kontrolou. K této apoptóze dochází zřejmě i v důsledku poklesu trans-membránového potenciálu mitochondrií a aktivaci kaspázy-3 (Cui et al., 2007a). Na téže buněčné linii SGC-7901 byl testován ve vodě nerozpustný sulfatovaný polysacharid S-GAP-P s průměrnou hmotností 28 kDa. Tento polysacharid má nevýraznou inhibiční schopnost ($\text{IC}_{50} = 564,28 \mu\text{g/ml}$, za 48 hodinou inkubaci). Cytotoxicitu lze zvýšit využitím kombinace S-GAP-P a 5-fluorouracilem (5-FU), kdy 5-FU je ve stále koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ S-GAP-P s 5-FU se zvyšuje cytotoxicita o 40 % v porovnání s použitím samotného S-GAP-P a o 29 % v porovnání s využitím samotného 5-FU. Při vyšším obsahu S-GAP-P (100–500 $\mu\text{g/ml}$) v kombinaci s 5-FU je však tato interakce velmi malá, v porovnání se samotným S-GAP-P. Vliv na apoptózu byl zaznamenán u S-GAP-P v sub-G0/G1 fázi buněčného cyklu.

Při koncentraci 10 µg/ml byla zaznamenána indukce apoptózy o 2,1 % a při koncentraci 100 µg/ml to pak bylo 13,9 %. Výsledky naznačují, že S-GAP-P inhibuje růst nádorových buněk žaludku prostřednictvím indukce apoptózy. S-GAP v kombinaci s 5-FU má výrazně vyšší vliv na indukci apoptózy, v porovnání se samotným polysacharidem S-GAP-P, kdy apoptóza byla zvýšena o 14,3 %, v porovnání s kontrolou kde se zvýšila o 1,2 % (Shi et al., 2007).

Lentinula edodes (Berk.) Pegler (houževnatec jedlý) též známý jako Shitake. Tato jedlá houba patří mezi druhou nejvíce oblíbenou a třetí nejvíce rozšířenou houbu běžně pěstovanou ve světě (Choi et al., 2006b). Polysacharid izolovaný z *L. edodes* – lentinan má vliv na produkci NO a TNF- α , u makrofágů buněčné linie RAW264.7, které byly stimulovány pomocí lipopolysacharidu. Bylo zjištěno, že lentinan (200 µg/ml) má pozitivní vliv nejen na snížení produkce NO a TNF- α o 70 %, ale dokáže také snížit expresi iNOS a TNF- α (Xu et al., 2012). Cytotoxicita na buněčné linii karcinomu hrtnu HEp-2 je u vodného extraktu z *L. edodes* 74 mg/ml (IC₅₀) a u etanolového extraktu je IC₅₀ 25,8 mg/ml (Rincão et al., 2012). U získaných metanolových a vodních extraktů z *L. edodes* testovaných na adenokarcinomu prsu buněčné linie MCF-7 a normální lidských fibroblastů, byla zjištěna cytotoxicita vodného extraktu vůči linii MCF-7 s hodnotou IC₅₀ 73±14 µg/ml a 140±30 µg/ml vůči normálním fibroblastům. U metanolových vzorků bylo IC₅₀ pro MCF-7 119±23 µg/ml a 251±74 µg/ml pro fibroblasty (Israilides et al., 2008). Na této buněčné linii byl testován etylacetátový extrakt z *L. edodes*, kdy koncentrace 50 µg/ml indukuje buněčnou apoptózu o 50 %. Dochází k výraznému snížení S-fáze buněčného cyklu, která je spojena s indukcí inhibitorů cdk a potlačení aktivity cdk4 a cyklinu D1 (Fang et al., 2006). Etanolový extrakt při koncentraci 1 mg/ml, snižuje životaschopnost buněk MCF-7 o 45 % a u buněčné linie hepatokarcinomu SK-Hep 1 o 40 % proti neošetřené kontrole (Thetsrimuang et al., 2011).

Ze zjištěných a již publikovaných výsledků je patrné, že rozdíly mezi jednotlivými *in vitro* výsledky jsou velmi různé. Tudíž nelze přesně říci, jaký účinek rostliny a houby mají při použití metod, které doposud nebyly využity a jaké je případně využití jiných buněčných linií, kterými jsou například buňky kolorektálního karcinomu lidské střeva. I z tohoto důvodu mají stále své místo a využití screeningu, které dokáží vybrat potencionální druhy pro další testování, tak jak je to i v této práci.

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 Egles Medium (DMEM), dusitan sodný, glukóza, fetální bovinní sérum (FBS), fluorescein (FL), fosfátový pufr (PBS), gallová kyselina, Griessovo činidlo, HISTOPAQUE 1077, hydrogen uhličitán sodný, lipopolisacharid (LPS) izolovaný z *Escherichia coli* 0111:B4, neesenciální aminokyseliny, penicilin, pyruvát sodný, RPMI1640 medium, streptomycin, trypsin, trolox, 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azobis 2-amidopropan dihydrochlorid (AAPH), 3-(4,5-Dimetyltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (CZ). Dimetylsulfoxid (DMSO), etanol (EtOH), metanol (MeOH), zakoupeny u Lach-Ner (CZ). 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 etickým zásadám 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 chinensi*], 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.], 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 plet'ová), *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

3.2.1. Metody použité pro vzorky ovoce a zeleniny

3.2.1.1 Příprava džusů

Ovoce a zeleninu jsme nejprve zbavili svrchních a vnitřních nepoživatelných částí (kůry, slupek, pecek) a odšťavili jí na komerčním centrifugovém odšťavňovači Catler JE 8010. Čerstvě získaná šťáva byla zfiltrována vakuovou filtrací, vždy celkem 3×, podle postupně vzrůstající hustoty pórů filtračního papíru FILTRAK (červený, žlutý, modrý). Ze získaného filtrátu bylo odebráno 10 ml do 15ml zkumavek typu Falcon, které byly následně odpařeny ve vakuovém centrifugačním koncentrátoru ScanVac při 40°C. Část odparku 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.

3.2.1.2 Příprava metanolových extraktů

Jednotlivé druhy ovoce a zeleniny byly nakrájeny na menší kousky a odváženy do 50 ml plastových zkumavek typu Falcon v množství 50 g. Zkumavky byly lyofilizovány a získaný suchý zbytek byl nejemno rozmělněn na laboratorním mlýnku a zvážen. Poté byl suchý zbytek vložen do celulósových extrakčních patron (Whatman) a extrahován 80% metanolem na Soxhletově extraktoru SER 148 (Velp Scientifica), při teplotě 210 °C po dobu 45 minut. Extrakt byl částečně odpařen na vakuové odparce Laborata 4000-efficient (Heidolph). Následně bylo do 15ml zkumavek typu Falcon přeneseno 10 ml tohoto zahuštěného extraktu a na vakuové rotační odparce určen suchý podíl stejným postupem, jako při přípravě džusů. 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.

3.2.1.3 Obsah celkový fenolových sloučenin

Obsah celkových fenolových sloučenin (total phenolic content – TPC) byl stanoven za použití modifikované metody, kterou dříve popsal Sharma a Bhat (2009). Použita byla 96-jamková destička, kde bylo 100 μ l vzorku zředěno 100 μ l redestilované vody. Poté bylo přidáno 25 μ 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 μ l 20% Na_2CO_3 . 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.

3.2.1.4 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 μ l každého vzorku se zředilo 150 μ l FL (48 mmol) a inkubovalo se při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Reakce byla zahájena přidáním 25 μ l AAPH (153 mmol), čímž byl získán konečný objem 200 μ 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 a Prior (1999) a byly vyjádřeny jako μ mol TE (ekvivalent troloxu)/g extraktu.

Druhou metodou byla metoda DPPH, provedena dle Sharma a Bhat (2009). Do řádku mikrotitrační destičky bylo připraveno sedm dvojnásobných ředění, přičemž vzorky byly připraveny na 80% MeOH (175 μ l), v 96-jamkových destičkách. Následně bylo přidáno 25 μ l čerstvě připraveného 4 mmol DPPH v MeOH, do každé jamky (konečný objem 200 μ 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 μ mol TE/g extraktu.

3.2.1.5 Kultivace buněčných tkání

Kultivace makrofágu RAW 264.7

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 byly sklizeny po dvou dnech bez využití trypsinu. Buňky byly uvolněny pomocí serologické stěrky a odstředěny po dobu 10 minut při $700 \times g$. Staré medium bylo odstraněno a nahrazeno 10 ml nového media. Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm^2) s 15 ml media RPMI 1640, které byly uloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 5 % CO_2 a teplotu $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Buňky byly sklizeny druhý den mechanickým uvolněním ode dna kultivační láhve a následně odstředěny na centrifuze, po dobu 10 minut, při $500 \times g$. Bylo odstraněno staré medium a buňky byly naředěny v mediu. Z takto nachystané suspenze bylo odebráno 0,5 ml media s buňkami a byly přidány k 15 ml nového media RPMI 1640 v kultivační láhvi, pro další kultivaci.

3.2.1.6 Inhibice oxidu dusnatého

Inhibice NO byla provedena dle Wang a Mazze (2002), která byla modifikována. Suspenze buněk naředěných na koncentraci 1×10^5 buněk/ml, byly pipetovány do 96-jamkové destičky v množství 100 μl . Destička byla vložena do CO_2 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; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98; 0,49; 0,24 $\mu\text{l/ml}$), a LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) ve 200 μl . Destička byla vložena do CO_2 inkubátoru na dobu 24 hodin. Poté došlo k odebrání 50 μl supernatantu, který byl v nové 96-jamkové destičce smíchán 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.

3.2.1.7 Test cytotoxicity (MTT)

RAW264.7

Cytotoxicita byla měřena pomocí metody MTT dle Mosman (1983), která byla modifikována. Test toxicity probíhal po testu inhibice NO. Z 96-jamkové destičky bylo odstraněno medium, přidáno nové medium s MTT (1 $\mu\text{g/ml}$) a vloženo do CO_2 inkubátoru na dobu dvou hodin. Následně bylo MTT 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 neošetřenou kontrolou.

3.2.2. Metody použité pro vzorky hub

3.2.2.1 Příprava extraktů hub

Etanolové extrakty 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 $-23\text{ }^\circ\text{C}$. 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 $-80\text{ }^\circ\text{C}$, 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.

3.2.2.2 Stanovení obsahu β -glukanů

Obsah β -glukanu byl stanoven pomocí Mushroom and Yeast β -glucan Assay kit K-YBGL (Megazyme). Enzymová sada obsahuje exo-1,3- β -glukanázu, β -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 μl koncentrované HCl s následujícím promísením na vortexu. Dále byly vzorky zahřáty ve vodní lázni o teplotě $30\text{ }^\circ\text{C}$ 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 $100\text{ }^\circ\text{C}$. 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 μ 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 μ l do zkumavky, dále se přidala směs *exo*-1,3- β -glukanázy (20 U/ml) a β -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 μ l jamkových mikrotitračních destičkách za použití TECAN M200 Infinite reader.

Obsah α -glukanů byl stanoven enzymatickou hydrolýzou s pomocí amyloglukosidázy a invertázy. Pro určení měření α -glukanů se navázilo 10 mg vzorku, přidalo se 200 μ l 2M KOH a směsi jsme nechali stát 20 minut v ledové vodní lázni. Následovalo přidání 800 μ l 1,2 M pufru octanu sodného (pH 3,8) a 20 μ 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 μ l do 96-jamkové destičky a měřen společně se slepým vzorkem při absorbanci 510 nm v 200 μ l jamkových mikrotitračních destičkách za použití TECAN M200 Infinite reader.

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

3.2.2.3 Obsah celkových fenolových sloučenin

Pro stanovení obsahu fenolových sloučenin byla využita totožná metoda jako u ovoce a zeleniny viz Podkapitola 3.2.1.3. Obsah celkových fenolových sloučenin.

3.2.2.4 Imunomodulační aktivita granulocytů

Izolace granulocytů

Množství 30 ml 20% buffy coatu bylo naředěno v PBS a opatrně nanášeno na vrstvu 10 ml Ficoll-Paque PLUS nebo 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, dokud supernatant po lyzačním kroku nezůstával průhledný. Nyní již bílá peleta byla dále propláchnuta v PBS a opatrně resuspendována, ve 3 ml PBS. Za účelem standardizace byly buňky obarveny pomocí Türkyho roztoku a následně spočítány pomocí Bürkerova sklíčka. Buněčná suspenze byla poté zředěna v PBS, na konečnou koncentraci 3×10^6 buněk/ml.

Chemiluminiscenční test

Vzorky sériově ředěných extraktů *Polyporales* 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 μl extraktu. Následně bylo přidáno 50 μl suspenze izolovaných granulocytů (3×10^6 buněk/ml), dále bylo přidáno 50 μl luminolu (0,5 mg/ml) a nakonec bylo přidáno 50 μl standardizovaného roztoku zymosanu. Konečný objem v jamce tak činil 250 μl . 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 Konc_{max} (koncentrace max).

3.2.2.5 Kultivace buněčných tkání

Kultivace buněčných linií kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29

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 cm²) s 15 ml DMEM media, které byly uloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 5% CO₂ a teplotu 37 °C. Medium bylo měněno každé dva dny. Buňky byly sklizeny 7. den pomocí trypsinu a odstředěny na centrifuze po dobu 10 minut, při 200 × g. Bylo odstraněno staré medium a buňky byly naředěny v mediu. Z takto nachystané suspenze bylo odebráno 0,5 ml media s buňkami a opět přidány k 15 ml nového DMEM media v kultivační láhvi pro další kultivaci.

3.2.2.6 Test cytotoxicity (MTT)

Caco-2 a HT-29

Cytotoxicita byla měřena pomocí metody MTT dle Mosman (1983), která byla modifikována. 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; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98; 0,49; 0,24 μl/ml). Testované vzorky s buňkami byly inkubovány po dobu 72 hodin. Po této době bylo medium nahrazeno 100 μl nového media s MTT (1 μg/ml). Po 2 hodinách v CO₂ 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.

3.3. 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 β -glukany a FImax; TPC a FImax. Statistické vyhodnocování bylo provedeno v Excelu a IBM SPSS ver. 20.

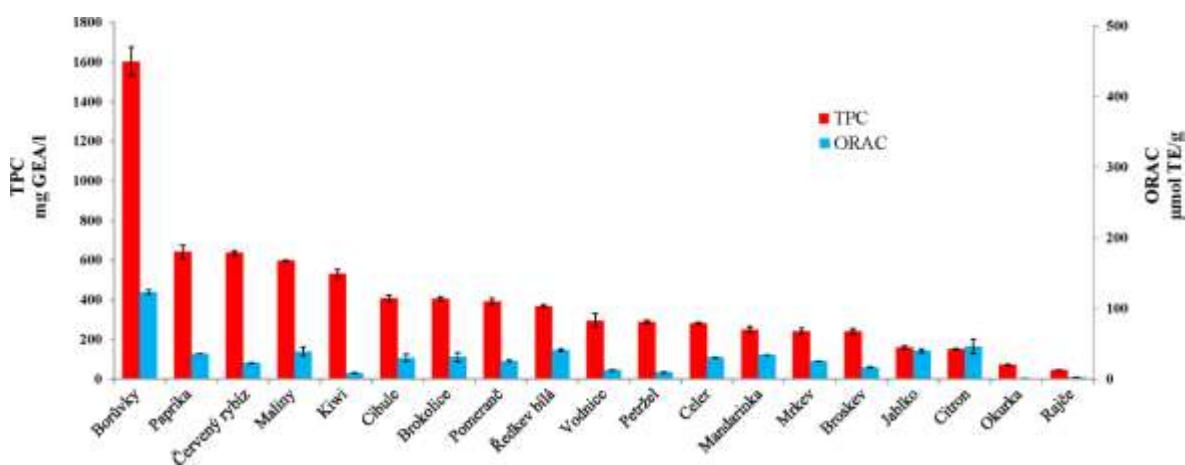
4. Výsledky

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 (tab. 4; obr. 3), byla nejvyšší antioxidační aktivita zjištěna u borůvek $438,5 \pm 12,3 \mu\text{mol TE/g}$ extraktu. 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, maliny, 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).



Obr. 3: Antioxidační aktivita džusů - vyjádřená pomocí obsahu celkových fenolových sloučenin (TPC) v mg GAE/l čerstvého džusu. A antioxidační kapacita (ORAC) v $\mu\text{mol TE/g}$ sušiny. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Tabulka 4: Ovocné a zeleninové džusy - obsah fenolových sloučenin a antioxidační aktivita.

Vzorek džusu	TPC	ORAC
	mg GAE/l džusu (průměr ± SD)	μmol TE/g sušiny (průměr ± SD)
Borůvky	1603,2±73,0	438,5±12,2
Paprika	642,1±33,1	127,9±0,7
Červený rybíz	636,9±12,1	82,4±2,6
Maliny	598,2±3,3	139,0±23,0
Kiwi	530,8±22,5	30,1±1,6
Cibule	407,3±17,1	107,1±17,7
Brokolice	405,6±8,4	111,2±22,3
Pomeranč	392,2±14,3	91,6±5,6
Ředkev bílá	368,2±7,7	146,0±5,5
Vodnice	295,1±36,6	45,2±2,4
Petržel	288,6±6,7	34,3±1,9
Celer	281,7±3,4	107,5±1,9
Mandarinka	250,0±13,8	121,8±1,2
Mrkev	241,9±14,9	91,1±0,6
Broskev	240,3±13,6	59,4±1,9
Jablko	160,1±7,4	147,9±8,9
Citron	152,2±1,5	164,6±36,7
Okurka	71,0±3,1	3,8±0,2
Rajče	45,2±1,4	7,7±0,4

GAE – ekvivalent kyseliny gallové; TE – ekvivalent troloxu; SD – směrodatná odchylka.

V rámci práce byla zjišťována i schopnost testovaných džusů inhibovat produkci oxidu dusnatého, který byl produkován LPS stimulovanými makrofágy buněčné linie RAW264.7 (tab. 5). Z celkového počtu 16 vzorků, které byly použity pro stanovení inhibice produkce NO, vykazovalo 11 vzorků schopnost snižovat produkci NO při koncentraci 1 000 μg/ml.

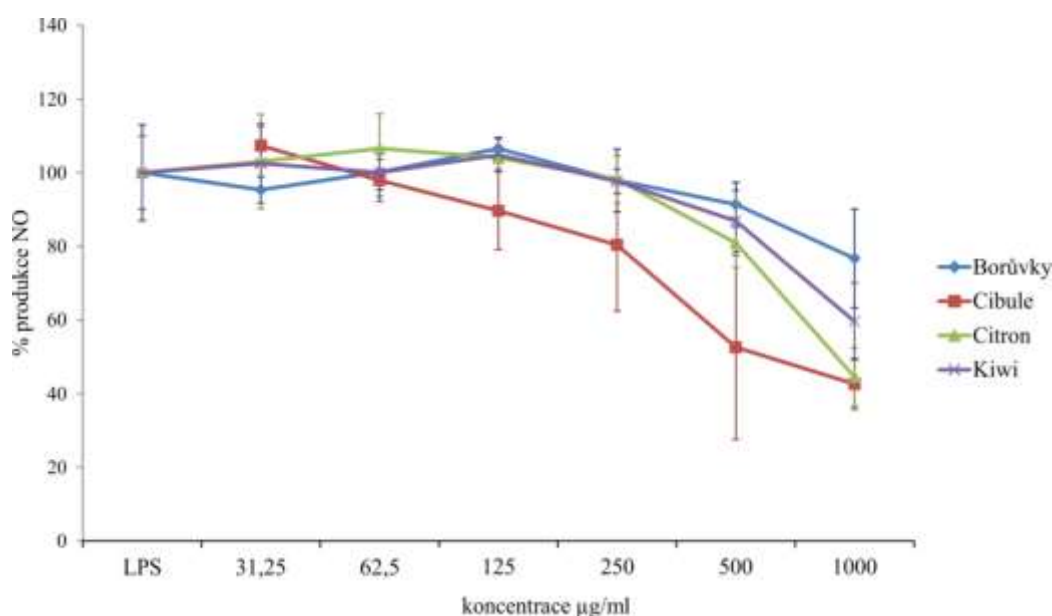
Tabulka 5: Ovocné a zeleninové džusy - produkce NO s cytotoxicitou na buněčné linii RAW264.7.

Vzorek	Produkce NO	Toxicita
	(%)	
Cibule	43*	N
Citron	45	T
Mandarinka	48*	N
Mrkev	52*	N
Maliny	54*	N
Ředkev bílá	55*	N
Petržel	56	T
Celer	56*	N
Kiwi	60*	N
Rajče	61*	N
Paprika	67*	N
Pomeranč	69*	N
Okurka	70	T
Vodnice	71	N
Brokolice	74	N
Jablko	76	N
Borůvky	77*	N
Broskev	86	N
Červený rybíz	87	N
LPS	100	N

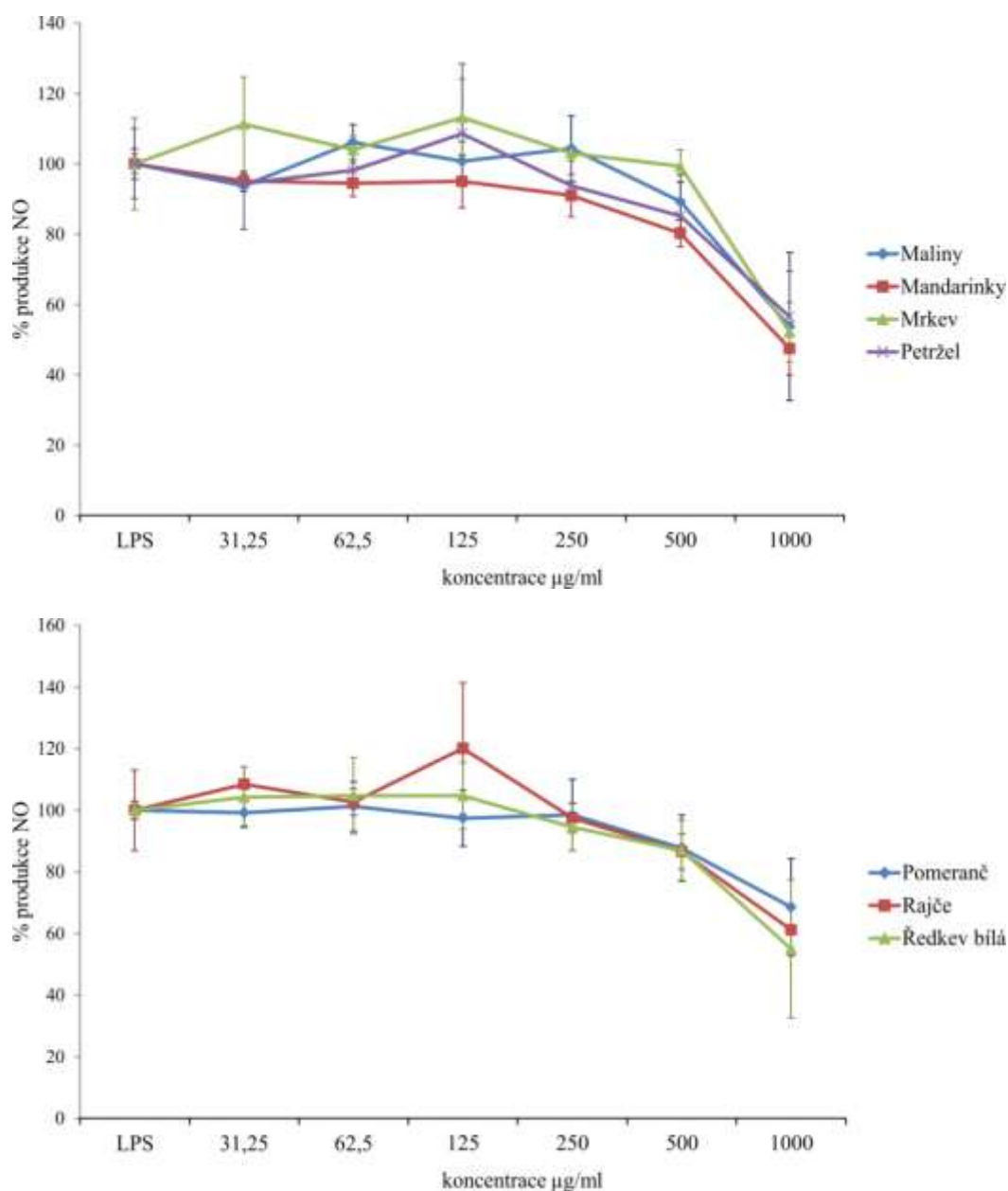
* statistická významnost $p < 0,05$; N- ne cytotoxická, T - cytotoxická koncentrace snižující životaschopnost makrofágů < 90 %.

Významnost rozdílů mezi jednotlivými vzorky byla stanovena pomocí vícenásobného *t*-testu, s Bonferroniho korekcí při $p < 0,05$, vzhledem ke kontrole s přidavkem 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 (obr. 4a; obr. 4b) 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 %. Na obrázku 4 je znázorněna inhibice produkce NO v závislosti na koncentraci extraktu (31,25-1 000 $\mu\text{g/ml}$) u vzorků se statistickou významností.



Obr. 4a: Produkce NO (%) u džusů na buňkách myších makrofágu buněčné linie RAW264.7, vystavených $1\mu\text{g/ml}$ LPS (100%), s přidáním ovocnými a zeleninovými džusy v koncentraci 1 000–31,25 $\mu\text{g/ml}$.

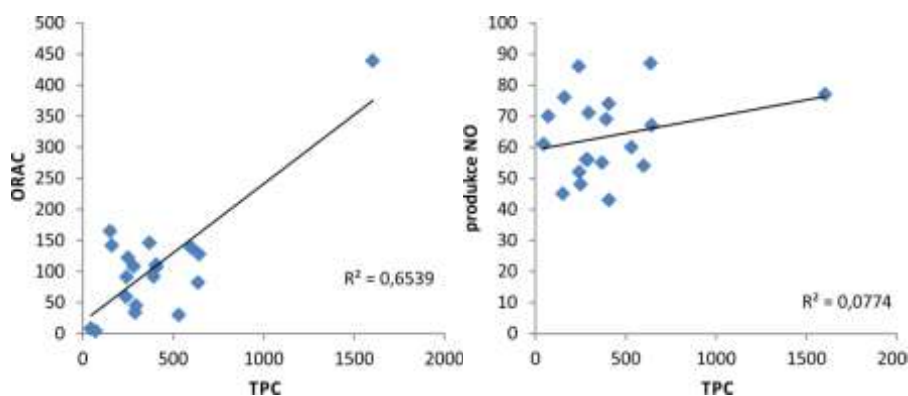


Obr. 4b: Produkce NO (%) u džusů na buňkách myších makrofágu buněčné linie RAW264.7, vystavených 1 µg/ml LPS (100%), s přidávanými ovocnými a zeleninovými džusy v koncentraci 1 000–31,25 µg/ml.

Po stanovení antioxidační aktivity nás zajímalo, zda za tuto aktivitu nejsou zodpovědné fenolové sloučeniny přítomné v ovoci a zelenině. Pokud porovnáme získané výsledky z testovaných vzorků džusů (tab. 4; obr. 3) ovoce a zeleniny, byl nejvyšší obsah fenolových látek zjištěn u borůvek. Fenolové látky byly u tohoto vzorku džusu v koncentraci $1603,2 \pm 73$ mg GAE/l. Poloviční koncentrace, proti výše uvedené, byla zaznamenána u papriky ($642,1 \pm 33,1$ mg/l džusu) a černého rybízu ($636,9 \pm 12,1$ mg GAE/l džusu). 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 ($r = 0,6539$) (obr. 5). 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.



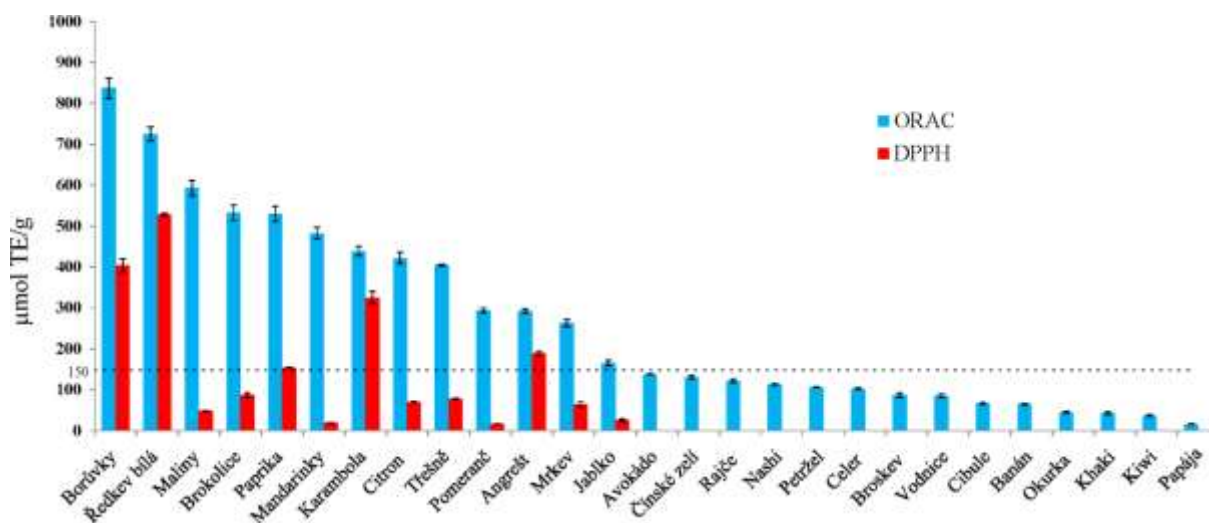
Obr. 5: Vzájemná korelace výsledků zvolených metod TPC + ORAC a TPC + NO.

4.1.2. Antioxidační aktivita extraktu

Kompletní výsledky antioxidační aktivity pro extrakty z ovoce a zeleniny jsou zaznamenány v tabulce 6. Celkem bylo testováno 27 metanolových extraktů pomocí metody ORAC. Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u extraktů z borůvek (836,6±24,1 $\mu\text{mol TE/g}$ sušiny), ředkve bílé (724,5±17,1 $\mu\text{mol TE/g}$ sušiny) a malin (592,7±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±5,3 $\mu\text{mol TE/g}$ sušiny, u mrkve (263,2±8,3 $\mu\text{mol TE/g}$ sušiny) a u jablka s hodnotou 165,0±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, jak je uvedeno v tabulce 6. 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, 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, jak je patrné z obr. 6.



Obr. 6: Antioxidační aktivita metanolových extraktů vyjádřená pomocí ORAC a DPPH v $\mu\text{mol TE/g}$ sušiny. Antioxidační aktivita v metodě ORAC $\geq 150 \mu\text{mol TE/g}$ extraktu byla kritériem dalšího testování metodu DPPH, dále bylo testováno 13 extraktů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka.

Tabulka 6: Antioxidační aktivita metanolových extraktů ovoce a zeleniny.

Jedlý plod	ORAC	DPPH
	($\mu\text{mol TE/g sušiny}$) \pm SD	($\mu\text{mol TE/g sušiny}$) \pm SD
Borůvky	836,6 \pm 24,1	404,6 \pm 15,4
Ředkev bílá	724,5 \pm 17,1	52,2 \pm 3,3
Maliny	592,7 \pm 19,3	48,2 \pm 0,1
Brokolice	532,3 \pm 18,7	87,4 \pm 5,6
Paprika	530,0 \pm 18,6	154,1 \pm 0,1
Mandarinky	483,3 \pm 13,6	18,7 \pm 0,1
Karambola	439,3 \pm 10,8	325,4 \pm 15,3
Citron	422,0 \pm 14,1	70,0 \pm 0,8
Třešně	404,7 \pm 2,0	77,7 \pm 1,2
Pomeranč	293,6 \pm 5,7	16,81 \pm 0,3
Angrešt	291,5 \pm 5,3	189,0 \pm 3,8
Mrkev	263,2 \pm 8,3	64,3 \pm 6,4
Jablko	165,0 \pm 6,7	26,2 \pm 2,7
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	-

GAE – ekvivalent kyseliny gallové; TE – ekvivalent troloxu; SD – směrodatná odchylka.

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 (tab. 7) stejně, jako v případě ovocných a zeleninových džusů. Celkem tedy bylo pomocí metody DPPH testováno 13 metanolových extraktů na schopnost snižovat

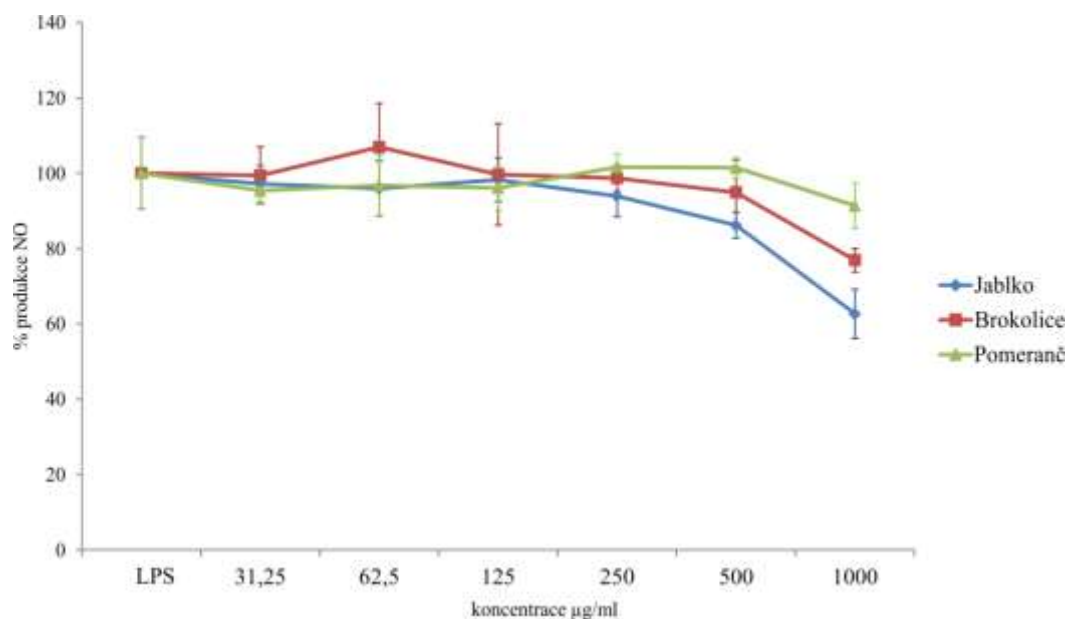
produkci NO. Významnost rozdílů mezi jednotlivými vzorky byla stanovena pomocí t-testu $p < 0,05$, vzhledem ke kontrole s přidavkem LPS, která představovala 100 % produkce NO.

Tabulka 7: Produkce NO metanolových extraktu ovoce a zeleniny.

Jedlý plod	Produkce NO	MTT
	(%)	
Jablko	66*	N
Třešně	68	N
Maliny	74	T
Borůvky	77	T
Brokolice	79*	N
Citron	79	T
Karambola	81	N
Mandarinky	82	N
Mrkev	84	N
Ředkev bílá	86	N
Pomeranč	90*	N
Paprika	91	N
Angrešt	91	N
LPS	100	N

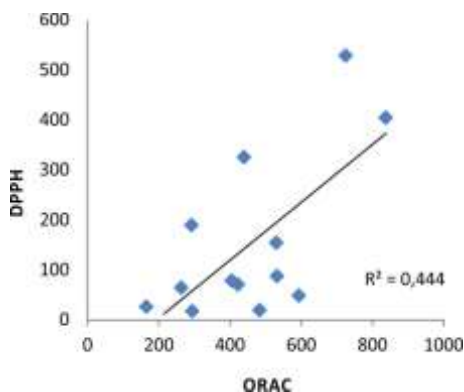
* statistická významnost $p < 0,05$; N- necytotoxická, T - cytotoxická koncentrace snižovala životaschopnost makrofágů < 90 %.

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 % (obr. 7).



Obr. 7: Produkce NO (%) u metanolových extraktů na buňkách myších makrofágů buněčné linie RAW264.7, vystavených 1µg/ml LPS (100%) s přidáním ovocnými a zeleninovými extrakty, v koncentraci 1 000-31,25 µg/ml.

Porovnáním výsledků metod ORAC a DPPH (obr. 8.) je patrné, že mezi hodnotami je střední vzájemná korelace ($r = 0,444$).



Obr. 8: Vzájemná korelace výsledků zvolených metod ORAC a DPPH u extraktů z ovoce a zeleniny.

4.1.3. Antiproliferační aktivita

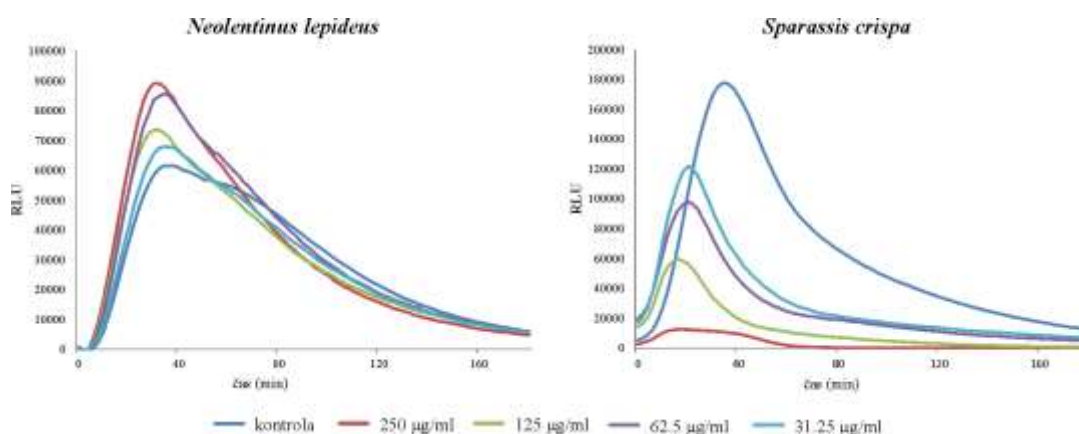
V rámci testu stanovení produkce oxidu dusnatého byla zjišťována cytotoxicita džusů (tab. 5) a extraktů (tab. 7). Výsledky jsou prezentovány pouze jako toxické a netoxické. Hlavním kritériem byla hranice 90% životaschopnosti buněčné linie RAW264.7. U džusu byla z celkového počtu 19 vzorků životaschopnost buněk při koncentraci 1 000 µg/ml menší

než 90 % pouze u 3 vzorků. 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. Výsledky těchto vzorků nebyly dále využity při hodnocení schopnosti vzorků snižovat produkci NO. U ostatních vzorků byla životaschopnost > 90 % a tyto džusy byly dále použity při stanovení inhibice produkce NO.

4.2. Houby

4.2.1. Imunomodulační aktivita

V rámci stanovení imunomodulační aktivity hub byl zjišťován vliv etanolových extraktů na aktivitu fagocytů (tab. 8). 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 %). Dále, z hlediska naměřených hodnot následovaly etanolové extrakty *L. tigrinus*, *P. conchatus*, *A. biennis*, *R. badius*, *P. umblatus*, kdy fagocytární index byl v rozpětí 103 až 122 %. Nejnižších hodnot dosahovala *T. versicolor*, s hodnotou 105 ± 5 %, *L. sulphureus* (74 ± 1 %). Nejnižší hodnoty dosáhla *S. crispa*, u které došlo k 84% snížení fagocytárního indexu na hodnotu 16 ± 9 %. Luminiscenční křivky pro *N. lepideus* a *S. crispa* jsou znázorněny na obrázku 9.



Obr. 9: Typická křivka relativní luminiscence znázorňující zvýšenou aktivitu *N. lepideus* a potlačení u *S. crispa* neutrofilní fagocytózy při koncentraci 31,25–250 µg/ml. RLU – relativní luminiscenční jednotka (Relative luminescence units).

Tabulka 8: Cytotoxické vlastnosti extraktu Polyporales a jejich vliv na fagocytární reakci izolovaných neutrofilů.

Název	Cytotoxicita		Neutrofilní fagocytóza	
	IC ₅₀ (μg/mL)		FI _{max} [#]	Konc _{max} [¥]
	HT-29 (průměr ± SD)	Caco-2 (průměr ± SD)		
<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	155±18**	250
<i>Panus conchatus</i>	>500	>500	141±9	125
<i>Polyporus squamosus</i>	>500	>500	141±8**	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	16±9**	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 ₂ O extrakt)	-	-	190±41**	93
LPS	>100	>100	116±9	6 (ng/ml)
Neošetřená kontrola			100±31	-

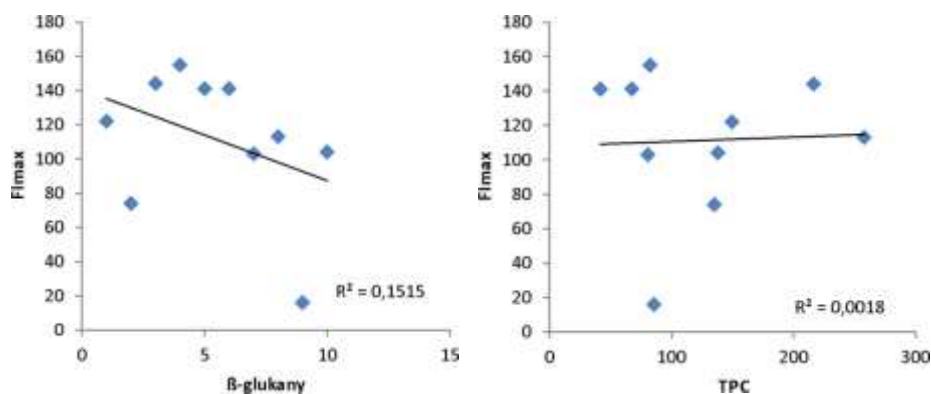
Cytotoxické účinky referenčních vzorků a kontrolních vzorků na epitelální buňky kolorektálního karcinomu buněčné linie Caco-2 a HT-29 a jejich vliv na fagocytární aktivitu izolovaných lidských neutrofilních granulocytů; [#], maximální fagocytární index dosažený při srovnání s kontrolou (100 %); [¥],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

4.2.2. Chemická charakterizace vzorků hub

Kompletní výsledky stanovení β -glukanů a celkových fenolových sloučenin jsou uvedeny v tabulce 9. Výsledky ukazují, že nejvyšší obsah β -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 β -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 β -glukanů dosahovala $13,4 \pm 0,8$ mg/g extraktu. Ke stanovení β -glukanů u extraktu *R. badius* nedošlo z důvodu nedostatku vzorku.

Dále byl u vzorků hub stanoven obsah fenolových sloučenin. Nejvyšší hodnota byla zjištěna u *R. badius* ($257,8 \pm 41,4$ μ mol GAE/g extraktu), o 17 % nižší obsah byl zjištěn u *L. tigrinus* ($216,2 \pm 30,1$ μ 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 μ mol GAE/g extraktu. Nejnižší obsah fenolových sloučenin byl zjištěn u *P. umbellatus* ($80,5 \pm 19,4$ μ mol GAE/g extraktu), *P. conchatus* ($67,4 \pm 18,4$ μ mol GAE/g extraktu) a u *P. squamosus*, jejíž hodnota TPC byla $41,6 \pm 4,4$ μ mol 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 (obr. 10).



Obr. 10: Vzájemná korelace výsledků hub, mezi obsahem β -glukanů a fagocytárním indexem a obsahem fenolových sloučenin a fagocytárním indexem.

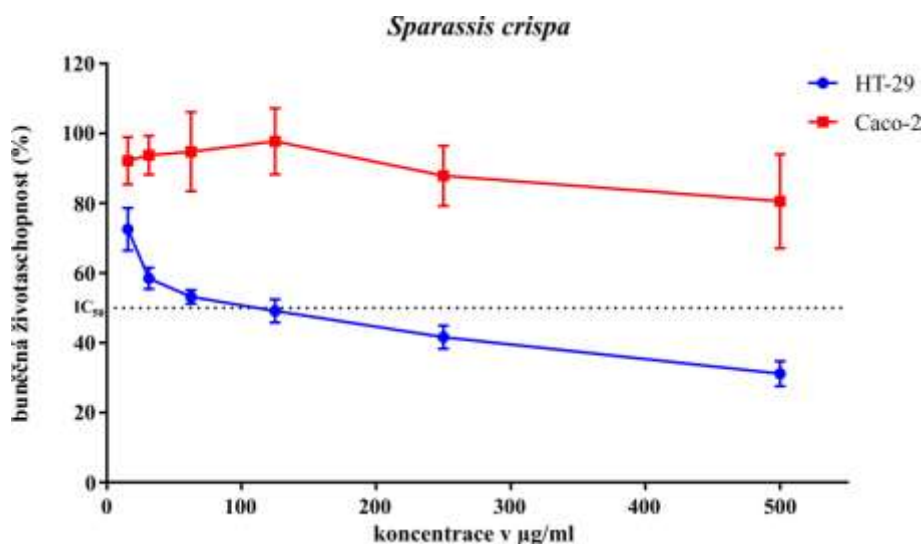
Tabulka 9: Obsah β -glukanů a celkových fenolových látek, v testovaných etanolových extraktech hub z řádu Polyporales.

Název	β -glukany	TPC
	mg/g extrakt (průměr \pm SD)	μ 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 extrakt)	69,4 \pm 1,6	48,0 \pm 9,2
<i>Ganoderma lucidum</i> (EtOH extrakt)	20,6 \pm 1,3	257,9 \pm 48,1
<i>Ganoderma lucidum</i> (H ₂ O extrakt)	64,3 \pm 1,0	191,1 \pm 37,8

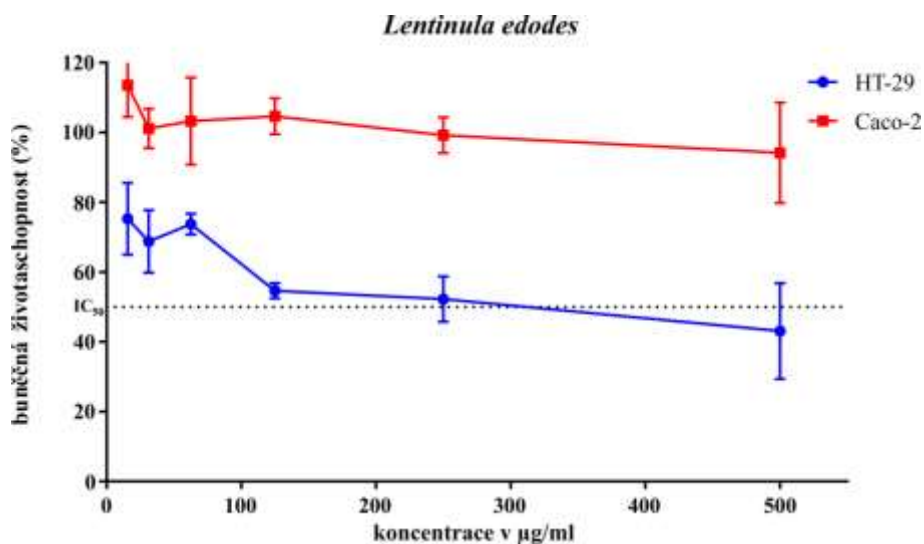
GAE – ekvivalent kyseliny gallové; n.t. – netestováno; SD – směrodatná odchylka.

4.2.3. Antiproliferační aktivita

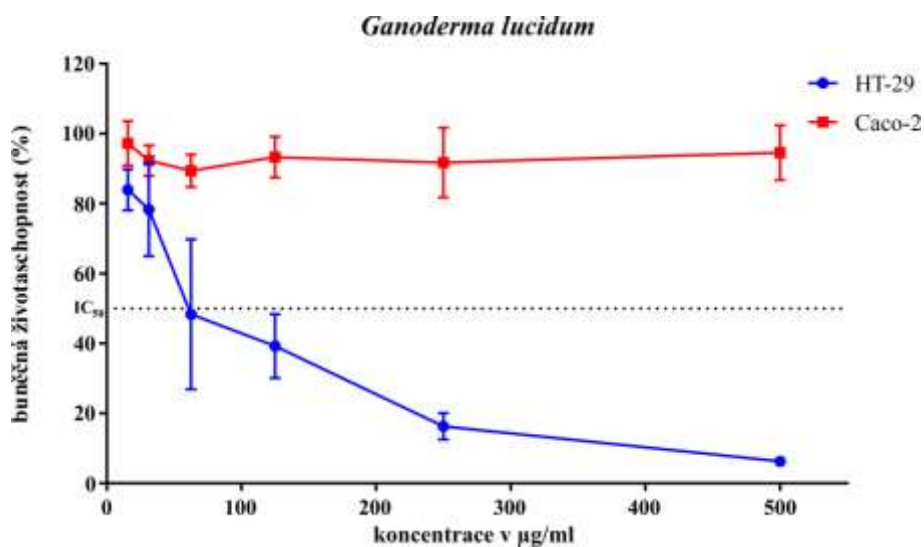
Vliv etanolových extraktů na antiproliferační aktivitu byl zjišťován na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29. Z výsledků uvedených v tabulce 8 je patrné, že námi testované extrakty neprokázaly žádný antiproliferační účinek. Výjimkou jsou jen mírné cytotoxické účinky na buněčnou linii HT-29 u extraktu *S. crispa* se zjištěnou hodnotou IC_{50} 107 ± 16 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 11). U kontrol byla cytotoxicita zjištěna u extraktu *L. edodes* ($IC_{50} = 302 \pm 54$ $\mu\text{g/ml}$) (obr. 12) a *G. lucidum* s hodnotou IC_{50} 151 ± 21 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 13), 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.



Obr. 11: Antiproliferační aktivity etanolového extraktu *S. crispa*, na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29, po 72h inkubaci.



Obr. 12: Antiproliferační aktivita standartního etanolového extraktu *L. edodes* na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29, po 72h inkubaci.



Obr. 13: Antiproliferační aktivita standartního etanolového extraktu *G. Lucidum*, na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT-29, po 72h inkubaci.

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 využívané v tradiční čínské medicíně. Jim 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, Tauchen et al., 2015) 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 cibuli. 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. Na snížení antioxidační aktivity nemá vliv skladování (Connor et al., 2002). Ta je stálá, až do doby konzumace spotřebitelem. 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 antokyany 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 μM). 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, fenylypripionová, izomer kyseliny methylhippurová, homovanilová, hydroxybenzylalkohol, kyselina benzo-4-sulfát a hydroxybenzaldehydy. Tyto metabolity jsou v krvi měřitelné po dobu ≤ 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- α) na dráze NF- κ 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 kvercetinu (Boyer et al., 2004). To může být zapříčiněno rozkladem kvercetinu během inkubace s Caco-2 buňkami, případně metabolismem buněk. Je však možné, že dochází i k oxidační degradaci, kdy se zdá, že meziproduktem 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 kvercetinu (Boulton et al., 1999). Metabolická přeměna kvercetinu 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 jejích 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 kvercetinu, s minimem zjištěných aglykonu kvercetinu, a to vedlo k domněnce, že po požití glykosidů kvercetinu 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 β -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 kvercetinu 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 kvercetinu, jako například isorhammentin glykosid a hydroxyfloreitin glykosid (Alonso-Salces et al., 2004). U jablek, stejně jako u borůvek, nemá skladování vliv na obsah fenolových sloučenin nebo antioxidační 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 superoxiddismutáza, 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- α a IL-6), COX-2 a NF- κ B (Denis et al., 2013). Jak uvádí Andre et al. (2012) mají i další bioaktivní sloučeniny z jablka schopnost inhibovat NF- κ 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- α , prostřednictvím triterpenových frakcí z jablka. Podle jiné studie však nemodulují hladinu TNF- α , 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 metanolový 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 mykochemikálii 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 β -glukanů (117,4 mg/g extraktu) v této houbě, převládá především β -(1,3)-D-glukanů (Ohno et al., 2002). Tento typ β -glukanů má vliv na indukci produkce INF- γ , 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* (Ábel et al., 1989, 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 potenciál imunosupresivní 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 nejméně aktivní 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 etanolový 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 β -glukanů a TPC, což naznačuje, že obsah složek se liší ve struktuře a činnosti.

Výsledky ukazují slibné hodnoty pro vodorozpustné β -glukany, mající vliv na fagocytózu, v porovnání s etanolovými extrakty. Obsah β -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.

Seznam zkratek

5-FU	5-fluorouracil
AAPH	2,2-azobis 2-amidopropan dihydrochlorid
B[a]P	Benzo[a]pyren
Bcl-2	B-cell lymphoma
BITC	Benzylisotiokyanát
BRM	Modifikátory biologické odpovědi
CD	Diferenční skupina
CF	Cystická fibróza
CFTR	CF transmembránový regulátor vodivosti
CN	Crohnova choroba
COX	Cyklooxygenáza
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
EGCG	Epigallokatechin gallát
eNOS	Endoteliální oxid dusnatý syntáza
FBS	Fetální bovinní sérum
FEIT	Fenetylisotiokyanát
FI	Fagocytární index
FL	Fluorescein
GAE	Ekvivalent gallové kyseliny
GA-T	Ganoderová kyselina T
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transferáza
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
CHST	Sulfotranferáza - Carbohydrate sulfotransferase
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobuliny
IL	Interleukin
iNOS	Indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
Kon _{max}	Koncentrace maximální
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein
LPS	Lipopolysacharid
MDA	Malondialdehyd
MHC	Histokompatibilní komplex
MTT	3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl] -2,5-difenylnitrazol bromid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát oxidáza
NF-κB	Nukleární faktor kappa B
NOS	Oxid dusnatý syntáza
Nrf	Nukleární faktor
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
PBS	Fosfátový pufr
S-GAP-P	Vodě nerozpustný sulfatovaný polysacharid
SOD	Superoxid dismutáza

TCR	T-buněčné receptory
TE	Ekvivalent troloxu
Th	T-lymfocyt
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Faktor nádorové nekrózy- α
TPC	Celkové fenolové látky
UK	Ulcerózní kolitida

7. Použitá literatura

- ÁBEL, G., SZÖLLÖSI, J., CHIHARA, G. & FACHET, J. 1989. Effect of lentinan and mannan on phagocytosis of fluorescent latex microbeads by mouse peritoneal macrophages: a flow cytometric study. *International Journal of Immunopharmacology*, 11, 615-621.
- 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.
- AGARWAL, S. & RAO, A. 2000. Carotenoids and chronic diseases. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17, 189-210.
- AHMED, T., MARKO, M., WU, D., CHUNG, H., HUBER, B. & MEYDANI, S. N. 2004. Vitamin E supplementation reverses the age-associated decrease in effective immune synapse formation in CD4+ T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1031, 412-414.
- AKIYAMA, H., ENDO, M., MATSUI, T., KATSUDA, I., EMI, N., KAWAMOTO, Y., KOIKE, T. & BEPPU, H. 2011. Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U937. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1810, 519-525.
- AKRAMIENE, D., KONDROTAS, A., DIDZIAPETRIENE, J. & KEVELAITIS, E. 2007. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 43, 597-606.
- ALONSO-SALCES, R. M., NDJOKO, K., QUEIROZ, E. F., IOSET, J. R., HOSTETTMANN, 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.
- ALVES, M. J., FERREIRA, I. C. F. R., DIAS, J., TEIXEIRA, V., MARTINS, A. & PINTADO, M. 2012. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*, 78,16: 1707-1718
- ALVES, M. J., FERREIRA, I. C. F. R., FROUFE, H. J. C., ABREU, R. M. V., MARTINS, A. & PINTADO, M. 2013. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, 115, 346-357.
- 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.
- ANGELI, J. P., RIBEIRO, L. R., BELLINI, M. F. & MANTOVANI, M. S. 2006. Anti-clastogenic effect of β -glucan extracted from barley towards chemically induced DNA damage in rodent cells. *Human and Experimental Toxicology*, 25, 319-324.
- ANGELI, J. P. F., RIBEIRO, L. R., BELLINI, M. F. & MANTOVANI, M. S. 2009. β -glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects

- of benzo [a] pyrene in the human hepatoma cell line HepG2. Archives of Toxicology, 83, 81-86.
- ANGST, E., PARK, J. L., MORO, A., LU, Q.-Y., LU, X., LI, G., KING, J., CHEN, M., REBER, H. A. & GO, V. L. W. 2013. The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth *in vitro* and *in vivo*. Pancreas, 42, 223-229.
- ANTER, J., ROMERO-JIMÉNEZ, M., FERNÁNDEZ-BEDMAR, Z., VILLATORO-PULIDO, M., ANALLA, M., ALONSO-MORAGA, Á. & MUÑOZ-SERRANO, A. 2011. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. Journal of Medicinal Food, 14, 276-283.
- ANTUNES, F., HAN, D. & CADENAS, E. 2002. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in *in vivo* conditions. Free Radical Biology and Medicine, 33, 1260-1267.
- ARYA, P., ALIBHAI, N., QIN, H., BURTON, G. W., BATIST, G., YOU, S.-L. & ALAOUJAMALI, M. A. 1998. Design and synthesis of analogs of vitamin E: antiproliferative activity against human breast adenocarcinoma cells. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 8, 2433-2438.
- ATANASSOVA, M., GEORGIEVA, S. & IVANCHEVA, K. 2011. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy, 46, 81-88.
- AZAD, N., IYER, A., VALLYATHAN, V., WANG, L., CASTRANOVA, V., STEHLIK, C. & ROJANASAKUL, Y. 2010. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. Annals of the New York Academy of Sciences, 1203, 1-6.
- AZIZ, M. H., KUMAR, R. & AHMAD, N. 2003. Cancer chemoprevention by resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms (review). International Journal of Oncology, 23, 17-28.
- 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. 1997. *In vivo* and *in vitro* immunomodulation induced by the extract of the mycelium fungus *Polyporus squamosus*. OceanSide Publications, Inc. 301-310.
- BACK, E. I., FRINDT, C., NOHR, D., FRANK, J., ZIEBACH, R., STERN, M., RANKE, M. & BIESALSKI, H. K. 2004. Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? American Journal of Clinical Nutrition, 80, 374-384.
- BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K. & SAMMAN, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99, 191-203.
- BALLINGER, S. W., PATTERSON, C., KNIGHT-LOZANO, C. A., BUROW, D. L., CONKLIN, C. A., HU, Z., REUF, J., HORAIST, C., LEBOVITZ, R. & HUNTER, G. C. 2002. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. Circulation, 106, 544-549.
- BAO, L., YAO, X.-S., YAU, C.-C., TSI, D., CHIA, C.-S., NAGAI, H. & KURIHARA, H. 2008. Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 7803-7807.

- BAO, M.-J., SHEN, J., JIA, Y.-L., LI, F.-F., MA, W.-J., SHEN, H.-J., SHEN, L.-L., LIN, X.-X., ZHANG, L.-H., DONG, X.-W., XIE, Y.-C., ZHAO, Y.-Q. & XIE, Q.-M. 2013. Apple polyphenol protects against cigarette smoke-induced acute lung injury. *Nutrition*, 29, 235-243.
- BARBOSA, D. S., CECCHINI, R., EL KADRI, M. Z., RODRÍGUEZ, M. A. M., BURINI, R. C. & DICHI, I. 2003. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil ω -3 fatty acids. *Nutrition*, 19, 837-842.
- 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.
- BELIKOV, A. V., SCHRAVEN, B. & SIMEONI, L. 2014. TCR-triggered extracellular superoxide production is not required for T-cell activation. *Cell Communication and Signaling*, 12, 1-10.
- BENAROUDJ, N., LEE, D. H. & GOLDBERG, A. L. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 24261-24267.
- BERRIDGE, M. V., HERST, P. M. & TAN, A. S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152.
- BERTRAM, J. S. 2000. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167-223.
- BIANCO, C., GRIFFIN, F. M. & SILVERSTEIN, S. C. 1975. Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 141, 1278-1290.
- BIMCZOK, D., WRENGER, J., SCHIRRMANN, T., ROTHKÖTTER, H.-J., WRAY, V. & RAU, U. 2009. Short chain regioselectively hydrolyzed scleroglucans induce maturation of porcine dendritic cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 321-331.
- BISEN, P. S., BAGHEL, R. K., SANODIYA, B. S., THAKUR, G. S. & PRASAD, G. 2010. *Lentinus edodes*: a macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 2419-2430.
- BLACKWELL, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98, 426-438.
- BLOCK, G., JENSEN, C., DIETRICH, M., NORKUS, E. P., HUDES, M. & PACKER, L. 2004. Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: influence of antioxidant supplementation. *Journal of the American College of Nutrition*, 23, 141-147.
- BOEING, H., BECHTHOLD, A., BUB, A., ELLINGER, S., HALLER, D., KROKE, A., LESCHIK-BONNET, E., MÜLLER, M. J., OBERRITTER, H. & SCHULZE, M. 2012. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, 51, 637-663.
- BOH, B., BEROVIC, M., ZHANG, J. & ZHI-BIN, L. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review*, 13, 265-301.

- 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.
- BORS, W., MICHEL, C. & STETTMAIER, K. 1997. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*, 6, 399-402.
- 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.
- BOVI, M., CENCI, L., PERDUCA, M., CAPALDI, S., CARRIZO, M. E., CIVIERO, L., CHIARELLI, L. R., GALLIANO, M. & MONACO, H. L. 2013. BEL β -trefoil: A novel lectin with antineoplastic properties in king bolete (*Boletus edulis*) mushrooms. *Glycobiology*, 23, 578-592.
- BOYD, M. R. & PAULL, K. D. 1995. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research*, 34, 91-109.
- 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.
- BRANDTZAEG, P., HARALDSEN, G. & RUGTVEIT, J. 1997. Immunopathology of human inflammatory bowel disease. *Springer*, 555-589.
- BUETTNER, G. R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300, 535-543.
- BUNEA, C.-I., POP, N., BABEȘ, A. C., MATEA, C., DULF, F. V. & BUNEA, A. 2012. Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry Central Journal*, 6, 66-75.
- BURNS, J., FRASER, P. D. & BRAMLEY, P. M. 2003. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 62, 939-947.
- BUSSE, W. W., KOPP, D. E. & ELLIOTT, M. 1984. Flavonoid modulation of human neutrophil function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73, 801-809.
- C OOI, V. E. & LIU, F. 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 715-729.
- CAI, H. & HARRISON, D. G. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, 87, 840-844.
- 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.
- CALDER, P. C. & KEW, S. 2002. The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, 88, S165-S176.
- CAO, G. & PRIOR, R. L. 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in Enzymology*, 299, 50-62.

- CARTER, P., GRAY, L. J., TROUGHTON, J., KHUNTI, K. & DAVIES, M. J. 2010. Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 *diabetes mellitus*: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 341-349.
- 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.
- CASWELL, H. 2009. The role of fruit juice in the diet: an overview. *Nutrition Bulletin*, 34, 273-288.
- CATARZI, S., FAVILLI, F., ROMAGNOLI, C., MARCUCCI, T., PICARIELLO, L., TONELLI, F., VINCENZINI, M. T. & IANTOMASI, T. 2011. Oxidative state and IL-6 production in intestinal myofibroblasts of Crohn's disease patients. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17, 1674-1684.
- 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.
- CHAE, C. U., LEE, R. T., RIFAI, N. & RIDKER, P. M. 2001. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension*, 38, 399-403.
- CHALLEM, J. J. 1997. Did the loss of endogenous ascorbate propel the evolution of Anthropeida and Homo sapiens? *Medical Hypotheses*, 48, 387-392.
- CHAN, F. L., CHOI, H. L., CHEN, Z. Y., CHAN, P. S. F. & HUANG, Y. 2000. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. *Cancer Letters*, 160, 219-228.
- CHAN, W. K., LAW, H. K. W., LIN, Z.-B., LAU, Y. L. & CHAN, G. C.-F. 2007. Response of human dendritic cells to different immunomodulatory polysaccharides derived from mushroom and barley. *International Immunology*, 19, 891-899.
- CHANG, Y. J., LEE, S., YOO, M. A. & LEE, H. G. 2006. Structural and biological characterization of sulfated-derivatized oat β -glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3815-3818.
- CHAUDHRI, G., CLARK, I. A., HUNT, N. H., COWDEN, W. B. & CEREDIG, R. 1986. Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation. *The Journal of Immunology*, 137, 2646-2652.
- CHAUDHRI, G., HUNT, N. H., CLARK, I. A. & CEREDIG, R. 1988. Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin. *Cellular Immunology*, 115, 204-213.
- CHEN, C.-Y., PENG, W.-H., TSAI, K.-D. & HSU, S.-L. 2007. Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sciences*, 81, 1602-1614.
- CHEN, G.-L., CHEN, S.-G., XIE, Y.-Q., CHEN, F., ZHAO, Y.-Y., LUO, C.-X. & GAO, Y.-Q. 2015. Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, 17, 243-259.

- CHEN, G. T., MA, X. M., LIU, S. T., LIAO, Y. L. & ZHAO, G. Q. 2012. Isolation, purification and antioxidant activities of polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Polymers*, 89, 61-66.
- CHEN, P. X., WANG, S., NIE, S. & MARCONE, M. 2013. Properties of *Cordyceps sinensis*: A review. *Journal of Functional Foods*, 5, 550-569.
- CHENG, G., ZIELONKA, J., JOSEPH, J. & KALYANARAMAN, B. 2014. Blunting the radical scavenging property of mitochondria-targeted, triphenylphosphonium-linked antioxidants failed to mitigate their anti-proliferative and antitumor effects. *Cancer Research*, 74, 498-498.
- CHENG, G., ZIELONKA, J., MCALLISTER, D. M., MACKINNON, A. C., JOSEPH, J., DWINELL, M. B. & KALYANARAMAN, B. 2013. Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death. *BMC Cancer*, 13, 285.
- 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. 2006a. Control of cytokine gene expression by PG101, a water-soluble extract prepared from *Lentinus lepideus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339, 880-887.
- CHOI, Y., LEE, S. M., CHUN, J., LEE, H. B. & LEE, J. 2006b. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99, 381-387.
- CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS, C. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *The Lancet*, 380, 581-590.
- CHU, Y.-F., SUN, J. I. E., WU, X. & LIU, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6910-6916.
- 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.
- CISNEROS, R. L., GIBSON, F. C. & TZIANABOS, A. O. 1996. Passive transfer of poly-(1-6)-beta-glucotriosyl-(1-3)-beta-glucopyranose glucan protection against lethal infection in an animal model of intra-abdominal sepsis. *Infection and Immunity*, 64, 2201-2205.
- CLARKE, J. 2010. *Mushrooms, The New Superfood*. Twickenham
- 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.
- CONNOR, A. M., LUBY, J. J., HANCOCK, J. F., BERKHEIMER, S. & HANSON, E. J. 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 893-898.

- CRACOWSKI, J.-L., BONAZ, B., BESSARD, G., BESSARD, J., ANGLADE, C. & FOURNET, J. 2002. Increased urinary F2-isoprostanes in patients with Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*, 97, 99-103.
- CROZIER, A., JAGANATH, I. B. & CLIFFORD, M. N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, 1001-1043.
- CUI, F.-J., LI, Y., XU, Y.-Y., LIU, Z.-Q., HUANG, D.-M., ZHANG, Z.-C. & TAO, W.-Y. 2007a. Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by polysaccharide-peptide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Toxicology in Vitro*, 21, 417-427.
- CUI, F. J., TAO, W. Y., XU, Z. H., GUO, W. J., XU, H. Y., AO, Z. H., JIN, J. & WEI, Y. Q. 2007b. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Bioresource Technology*, 98, 395-401.
- CUI, H. L., CHEN, Y., WANG, S. S., KAI, G. Q. & FANG, Y. M. 2011. Isolation, partial characterisation and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Morchella esculenta*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 2180-2185.
- CUI, J. & CHISTI, Y. 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, 21, 109-122.
- 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.
- DARMANYAN, A. P., GREGORY, D. D., GUO, Y., JENKS, W. S., BUREL, L., ELOY, D. & JARDON, P. 1998. Quenching of singlet oxygen by oxygen-and sulfur-centered radicals: evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 396-403.
- DAVEY, M. W., MONTAGU, M. V., INZÉ, D., SANMARTIN, M., KANELLIS, A., SMIRNOFF, N., BENZIE, I. J. J., STRAIN, J. J., FAVELL, D. & FLETCHER, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.
- DE SILVA, D. D., RAPIOR, S., FONS, F., BAHKALI, A. H. & HYDE, K. D. 2012. Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity*, 55, 1-35.
- DE SOUZA, V. R., PEREIRA, P. A. P., DA SILVA, T. L. T., DE OLIVEIRA LIMA, L. C., PIO, R. & QUEIROZ, F. 2014. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362-368.
- DEBIER, C. 2007. Vitamin E during pre-and postnatal periods. *Vitamins and Hormones*, 76, 357-373.

- 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(1): e53725.
- DENISOV, E. T. & AFANAS' EV, I. B. 2005. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology, CRC press. p. 1024. ISBN: 9780824753566.
- DEVADAS, S., ZARITSKAYA, L., RHEE, S. G., OBERLEY, L. & WILLIAMS, M. S. 2002. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 195, 59-70.
- 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.
- DORNAND, J. & GERBER, M. 1989. Inhibition of murine T-cell responses by anti-oxidants: the targets of lipo-oxygenase pathway inhibitors. *Immunology*, 68, 384.
- DOSKOČIL, I., HOŠŤÁLKOVÁ, 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.
- DU, G.-J., ZHANG, Z., WEN, X.-D., YU, C., CALWAY, T., YUAN, C.-S. & WANG, C.-Z. 2012. Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients*, 4, 1679-1691.
- DU, X.-J., ZHANG, J.-S., YANG, Y., TANG, Q.-J., JIA, W. & PAN, Y.-J. 2010. Purification, chemical modification and immunostimulating activity of polysaccharides from *Tremella aurantialba* fruit bodies. *Journal of Zhejiang University Science B*, 11, 437-442.
- 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.
- DUTHIE, S. J., JENKINSON, A. M., CROZIER, A., MULLEN, W., PIRIE, L., KYLE, J., YAP, L. S., CHRISTEN, P. & DUTHIE, G. G. 2006. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of nutrition*, 45, 113-122.
- DWEK, R. A. 1996. Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chemical Reviews*, 96, 683-720.
- EL ENSHASY, H. 2011. Immunomodulators. *Industrial Applications*. Springer Berlin Heidelberg, 165-194.
- EL ENSHASY, H., MAFTOUN, P. & MALEK, R. A. 2012. Pleuran: Immunomodulator polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*, structure, production and application. *Mushrooms: Types, Properties and Nutrition*. P, 153-172
- EL ENSHASY, H. A. & HATTI-KAUL, R. 2013. Mushroom immunomodulators: Unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*, 31, 668-677.
- EL GHARRAS, H. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2512-2518.

- ELLIOTT, R. 2005. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1740, 147-154.
- 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.
- ELMASTAŞ, M., GÜLÇİN, İ., BEYDEMİR, Ş., İRFAN KÜFREVİOĞLU, Ö. & ABOULENEIN, H. Y. 2006. A study on the *in vitro* antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Analytical Letters*, 39, 47-65.
- FANG, N., LI, Q., YU, S., ZHANG, J., HE, L., RONIS, M. J. J. & BADGER, T. M. 2006. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by an ethyl acetate fraction from shiitake mushrooms. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 12, 125-132.
- FANG, Y.-Z., YANG, S. & WU, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- FELDMANN, M. & MAINI, R. N. 2001. Anti-TNF α therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annual Review of Immunology*, 19, 163-196.
- FIDELUS, R. K., GINOUVES, P., LAWRENCE, D. & TSAN, M.-F. 1987. Modulation of intracellular glutathione concentrations alters lymphocyte activation and proliferation. *Experimental Cell Research*, 170, 269-275.
- FIDELUS, R. K. & TSAN, M.-F. 1986. Enhancement of intracellular glutathione promotes lymphocyte activation by mitogen. *Cellular Immunology*, 97, 155-163.
- FIDELUS, R. K. & TSAN, M. F. 1987. Glutathione and lymphocyte activation: a function of ageing and auto-immune disease. *Immunology*, 61, 503.
- FIRENZUOLI, F., GORI, L. & LOMBARDO, G. 2008. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5, 3-15.
- FLANNAGAN, R. S., JAUMOUILLE, V. & GRINSTEIN, S. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 61-98.
- FOOD AND NUTRITION BOARD, S., PANEL ON DIETARY, A. & INSTITUTE OF MEDICINE, S. 2000. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids: A Report of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies Press. Washington (DC). ISBN: 10:0-309-06949-1
- FREEDMAN, N. D., PARK, Y., SUBAR, A. F., HOLLENBECK, A. R., LEITZMANN, M. F., SCHATZKIN, A. & ABNET, C. C. 2007. Fruit and vegetable intake and esophageal cancer in a large prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 121, 2753-2760.
- 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.

- GALLEY, H. F., HOWDLE, P. D., WALKER, B. E. & WEBSTER, N. R. 1997. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 768-774.
- GAO, Y., ZHOU, S., CHEN, G., DAI, X. & YE, J. 2002. A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. extract (Ganopofy) in patients with advanced cancer. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4.
- GARCIA-MEDIAVILLA, M. V., CRESPO, I., COLLADO, P. S., ESTELLER, A., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., TUNÓN, M. J. & GONZÁLEZ-GALLEGO, J. 2007. Anti-inflammatory effect of the flavones quercetin and kaempferol in Chang Liver cells involves inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway. *European Journal of Pharmacology*, 557, 221-229.
- GARRED, P., MADSEN, H. O., HOFMANN, B. & SVEJGAARD, A. 1995. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *The Lancet*, 346, 941-943.
- GEERLING, B. J., BADART-SMOOK, A., VAN DEURSEN, C., VAN HOUWELINGEN, A. C., RUSSEL, M. G. V. M., STOCKBRÜGGER, R. W. & BRUMMER, R. J. M. 2000. Nutritional supplementation with N-3 fatty acids and antioxidants in patients with Crohn's disease in remission: Effects on antioxidant status and fatty acid profile. *Inflammatory Bowel Diseases*, 6, 77-84.
- GEETHANGILI, M. & TZENG, Y.-M. 2011. Review of pharmacological effects of *Antrodia camphorata* and its bioactive compounds. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- GERSTER, H. 1997. The potential role of lycopene for human health. *Journal of the American College of Nutrition*, 16, 109-126.
- 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.
- GONZALEZ-NICOLINI, V. & FUSSENEGGER, M. 2005. *In vitro* assays for anticancer drug discovery—a novel approach based on engineered mammalian cell lines. *Anti-Cancer Drugs*, 16, 223-228.
- 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.
- GORDON, S. 2016. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*, 44, 463-475.
- 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.

- GOSSÉ, F., GUYOT, S., ROUSSI, S., LOBSTEIN, A., FISCHER, B., SEILER, N. & RAUL, F. 2005. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 26, 1291-1295.
- 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.
- GRASSMANN, J., HIPPELI, S. & ELSTNER, E. F. 2002. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 471-478.
- GRIENDLING, K. K., SORESCU, D. & USHIO-FUKAI, M. 2000. NAD(P)H oxidase role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 86, 494-501.
- 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.
- GRINDE, B., HETLAND, G. & JOHNSON, E. 2006. Effects on gene expression and viral load of a medicinal extract from *Agaricus blazei* in patients with chronic hepatitis C infection. *International Immunopharmacology*, 6, 1311-1314.
- GÜLÇİN, İ. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 210-218.
- GÜLÇİN, I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- GÜNÇ ERGÖNÜL, P., AKATA, I., KALYONCU, F. & ERGÖNÜL, B. 2013. Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *The Scientific World Journal*, 1-4.
- HABTEMARIAM, S. & DAGNE, E. 2010. Comparative antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of sigmoidin A and eriodictyol. *Planta Medica*, 76, 589-594.
- 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.
- HALLIWELL, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, 344, 721-724.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. & CROSS, C. E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119, 598-620.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. 2015. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, USA, p. 888, ISBN-10: 019856869X
- HAMZA, A. A. & AMIN, A. 2007. *Apium graveolens* modulates sodium valproate-induced reproductive toxicity in rats. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307, 199-206.

- HAN, X.-Q., WU, X.-M., CHAI, X.-Y., CHEN, D., DAI, H., DONG, H.-L., MA, Z.-Z., GAO, X.-M. & TU, P.-F. 2011. Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Food Research International*, 44, 489-493.
- HANEKLAUS, M., O'NEILL, L. A. J. & COLL, R. C. 2013. Modulatory mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome in inflammation: recent developments. *Current Opinion in Immunology*, 25, 40-45.
- HARADA, T., MIURA, N. N., ADACHI, Y., NAKAJIMA, M., YADOMAE, T. & OHNO, N. 2002. IFN- γ induction by SCG, 1, 3- β -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.
- HASHIMOTO, T., NONAKA, Y., MINATO, K.-I., KAWAKAMI, S., MIZUNO, M., FUKUDA, I., KANAZAWA, K. & ASHIDA, H. 2002. Suppressive effect of polysaccharides from the edible and medicinal mushrooms, *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei*, on the expression of cytochrome P450s in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66, 1610-1614.
- HATSUGAI, M., KUROKAWA, M. S., KOURO, T., NAGAI, K., ARITO, M., MASUKO, K., SUEMATSU, N., OKAMOTO, K., ITOH, F. & KATO, T. 2010. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells are useful for differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology*, 45, 488-500.
- HE, X. & LIU, R. H. 2007. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4366-4370.
- HEHNER, S. P., BREITKREUTZ, R., SHUBINSKY, G., UNSOELD, H., SCHULZE-OSTHOFF, K., SCHMITZ, M. L. & DRÖGE, W. 2000. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *The Journal of Immunology*, 165, 4319-4328.
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R. & BOBILYA, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- HELENO, S. A., FERREIRA, I. C. F. R., CALHELHA, R. C., ESTEVES, A. P., MARTINS, A. & QUEIROZ, M. J. R. P. 2014. Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. *Food Research International*, 55, 170-175.
- 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: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342, 1007-1011.
- HEUNKS, L. M. A. & DEKHUIJZEN, P. N. R. 2000. Respiratory muscle function and free radicals: from cell to COPD. *Thorax*, 55, 704-716.
- HIRANO, T., HIGA, S., ARIMITSU, J., NAKA, T., SHIMA, Y., OHSHIMA, S., FUJIMOTO, M., YAMADORI, T., KAWASE, I. & TANAKA, T. 2004. Flavonoids such as luteolin, fisetin and apigenin are inhibitors of Interleukin-4 and Interleukin-13

- production by activated human basophils. *International Archives of Allergy and Immunology*, 134, 135-140.
- HOBBS, C. 2005. The Chemistry, Nutritional Value, immunopharmacology, and safety of the traditional food of medicinal split-gill fungus *Schizophyllum commune* Fr.: Fr.(Schizophyllaceae). A Literature Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7 127-140
- HOLBECK, S. L. 2004. Update on *in vitro* drug screen utilities. *European Journal of Cancer*, 40, 785-793.
- HOLMES, E. W., YONG, S. L., EIZNHAMER, D. & KESHAVARZIAN, A. 1998. Glutathione content of colonic mucosa (Evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis). *Digestive Diseases and Sciences*, 43, 1088-1095.
- HU, C. & KITTS, D. D. 2004. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264. 7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 265, 107-113.
- 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.
- HUNG, J. Y., CHANG, W. A., TSAI, Y. M., HSU, Y. L., CHIANG, H. H., CHOU, S. H., HUANG, M. S. & KUO, P. L. 2015. Tricetin, a dietary flavonoid, suppresses benzo (a) pyrene-induced human non-small cell lung cancer bone metastasis. *International Journal of Oncology*, 46, 1985-1993.
- ICHIKAWA, D., MATSUI, A., IMAI, M., SONODA, Y. & KASAHARA, T. 2004. Effect of various catechins on the IL-12p40 production by murine peritoneal macrophages and a macrophage cell line, J774. 1. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1353-1358.
- IKEKAWA, T., UEHARA, N., MAEDA, Y., NAKANISHI, M. & FUKUOKA, F. 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research*, 29, 734-735.
- ISRILIDES, C., KLETSAS, D., ARAPOGLOU, D., PHILIPPOUSSIS, A., PRATSINIS, H., EBRINGEROVA, A., HRIBALOVA, V. & HARDING, S. E. 2008. *In vitro* cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine*, 15, 512-519.
- ISHIKAWA, K., TAKENAGA, K., AKIMOTO, M., KOSHIKAWA, N., YAMAGUCHI, A., IMANISHI, H., NAKADA, K., HONMA, Y. & HAYASHI, J.-I. 2008. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutations Can Regulate Tumor Cell Metastasis. *Science*, 320, 661-664.
- IULIANO, L., MONTICOLO, R., STRAFACE, G., ZULLO, S., GALLI, F., BOAZ, M. & QUATTRUCCI, S. 2009. Association of cholesterol oxidation and abnormalities in fatty acid metabolism in cystic fibrosis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 477-484.
- JACKSON, S. H., DEVADAS, S., KWON, J., PINTO, L. A. & WILLIAMS, M. S. 2004. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nature Immunology*, 5, 818-827.
- 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.

- JAGTAP, S., MEGANATHAN, K., WAGH, V., WINKLER, J., HESCHELER, J. & SACHINIDIS, A. 2009. Chemoprotective mechanism of the natural compounds, epigallocatechin-3-O-gallate, quercetin and curcumin against cancer and cardiovascular diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1451-1462.
- JAHANSHAHI, G., MOTAVASEL, V., REZAIE, A., HASHTROUDI, A. A., DARYANI, N. E. & ABDOLLAHI, M. 2004. Alterations in antioxidant power and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in saliva of patients with inflammatory bowel diseases. *Digestive Diseases and Sciences*, 49, 1752-1757.
- JANSEN, R. J., ROBINSON, D. P., STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z., BAMLET, W. R., DE ANDRADE, M., OBERG, A. L., RABE, K. G., ANDERSON, K. E., OLSON, J. E. & SINHA, R. 2013. Nutrients from fruit and vegetable consumption reduce the risk of pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 44, 152-161.
- JEFFERY, E. H. & ARAYA, M. 2009. Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry Reviews*, 8, 283-298.
- JEONG, J. H., AN, J. Y., KWON, Y. T., RHEE, J. G. & LEE, Y. J. 2009. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106, 73-82.
- JEONG, W.-S., KIM, I.-W., HU, R. & KONG, A.-N. T. 2004. Modulation of AP-1 by natural chemopreventive compounds in human colon HT-29 cancer cell line. *Pharmaceutical Research*, 21, 649-660.
- JEONG, Y.-T., YANG, B.-K., JEONG, S.-C., KIM, S.-M. & SONG, C.-H. 2008. *Ganoderma applanatum*: a promising mushroom for antitumor and immunomodulating activity. *Phytotherapy Research*, 22, 614-619.
- 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.
- JOHNSON, E. J. 2002. The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care*, 5, 56-65.
- JOMOVA, K., VONDRAKOVA, D., LAWSON, M. & VALKO, M. 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345, 91-104.
- 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 Microbiology and Biotechnology*, 18, 1431-1438.
- KALÁČ, P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113, 9-16.
- 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.

- KAMIŃSKI, M. M., RÖTH, D., SASS, S., SAUER, S. W., KRAMMER, P. H. & GÜLOW, K. 2012. Manganese superoxide dismutase: a regulator of T cell activation-induced oxidative signaling and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823, 1041-1052.
- 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.
- KANCHEVA, V. D. 2009. Phenolic antioxidants—radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 1072-1089.
- KANG, H.-K., ECKLUND, D., LIU, M. & DATTA, S. K. 2009a. Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoid, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive Th1 and Th17 cells. *Arthritis Research & Therapy*, 11, R59. 1-13.
- KANG, N. J., LEE, K. W., SHIN, B. J., JUNG, S. K., HWANG, M. K., BODE, A. M., HEO, Y.-S., LEE, H. J. & DONG, Z. 2009b. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*, 30, 321-330.
- 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.
- KAULMANN, A. & BOHN, T. 2014. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research*, 34, 907-929.
- KAUR, C. & KAPOOR, H. C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.
- 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.
- KEUM, Y.-S., JEONG, W.-S. & KONG, A. N. T. 2004. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555, 191-202.
- KEY, T. J. 2011. Fruit and vegetables and cancer risk. *British Journal of Cancer*, 104, 6-11.
- KHAN, N., AFAQ, F., KHUSRO, F. H., MUSTAFA ADHAMI, V., SUH, Y. & MUKHTAR, H. 2012. Dual inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mammalian target of rapamycin signaling in human nonsmall cell lung cancer cells by a dietary flavonoid fisetin. *International Journal of Cancer*, 130, 1695-1705.

- 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.
- KHARE, C. P. 2008. *Indian medicinal plants: an illustrated dictionary*, Springer Science and Business Media. p. 900, ISBN 978-0-387-70637-5.
- KHLEBNIKOV, A. I., SCHEPETKIN, I. A., DOMINA, N. G., KIRPOTINA, L. N. & QUINN, M. T. 2007. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 1749-1770.
- KIHO, T., MATSUSHITA, M., USUI, S. & UKAI, S. 1998. Biological activities of (1→3)- β -d-glucans with reducing glucose side chains. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 570-572.
- KO, H.-J., SONG, A., LAI, M.-N. & NG, L.-T. 2011. Immunomodulatory properties of *Xylaria nigripes* in peritoneal macrophage cells of Balb/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 762-768.
- KOUSHIK, A., SPIEGELMAN, D., ALBANES, D., ANDERSON, K. E., BERNSTEIN, L., VAN DEN BRANDT, P. A., BERGKVIST, L., ENGLISH, D. R., FREUDENHEIM, J. L. & FUCHS, C. S. 2012. Intake of fruits and vegetables and risk of pancreatic cancer in a pooled analysis of 14 cohort studies. *American Journal of Epidemiology*, kws027.
- KOUTROUBAKIS, I. E., MALLIARAKI, N., DIMOULIOS, P. D., KARMIRIS, K., CASTANAS, E. & KOUROUMALIS, E. A. 2004. Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 49, 1433-1437.
- 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.
- KRUIDENIER, L. A. & VERSPAGET, H. W. 2002. Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous? *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16, 1997-2015.
- KUFE, D. W., POLLOCK, R. E., WEICHSELBAUM, R. R., BAST, R. C., GANSLER, T. S., HOLLAND, J. F. & FREI, E. 2003. *Holland-Frei cancer medicine*. ISBN-10: 1-55009-213-8
- 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.
- KWON, J., DEVADAS, S. & WILLIAMS, M. S. 2003. T cell receptor-stimulated generation of hydrogen peroxide inhibits MEK-ERK activation and I κ B serine phosphorylation. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 406-417.
- LAURSEN, J. B., SOMERS, M., KURZ, S., MCCANN, L., WARNHOLTZ, A., FREEMAN, B. A., TARPEY, M., FUKAI, T. & HARRISON, D. G. 2001. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*, 103, 1282-1288.

- LEE, J. S., CHO, J. Y. & HONG, E. K. 2009. Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Polymers*, 78, 162-168.
- LEE, J. S., KIM, S. G., KIM, H. K., LEE, T. H., JEONG, Y. I., LEE, C. M., YOON, M. S., NA, Y. J., SUH, D. S. & PARK, N. C. 2007. Silibinin polarizes Th1/Th2 immune responses through the inhibition of immunostimulatory function of dendritic cells. *Journal of Cellular Physiology*, 210, 385-397.
- LEONARD, B. & MAES, M. 2012. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 764-785.
- LEONCINI, E., EDEFONTI, V., HASHIBE, M., PARPINEL, M., CADONI, G., FERRARONI, M., SERRAINO, D., MATSUO, K., OLSHAN, A. F. & ZEVALLOS, J. P. 2015. Carotenoid intake and head and neck cancer: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *European Journal of Epidemiology*, 1-15.
- LEUNG, H. W. C., LIN, C. J., HOUR, M. J., YANG, W. H., WANG, M. Y. & LEE, H. Z. 2007. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2005-2013.
- LEUNG, M. Y. K., LIU, C., KOON, J. C. M. & FUNG, K. P. 2006. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters*, 105, 101-114.
- LEUSEN, J. H. W., VERHOEVEN, A. J. & ROOS, D. 1996. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Frontiers in Bioscience*, 1, d72-d90.
- LEVINE, A. P. & SEGAL, A. W. 2013. What is wrong with granulocytes in inflammatory bowel diseases? *Digestive Diseases*, 31, 321-327.
- LEY, B. M. 2008. Medicinal mushrooms for immune enhancement: *Agaricus blazei* Murill. BL Publications, Hanover, p. 40, ISBN: 1-890766-15-1.
- LEZO, A., BIASI, F., MASSARENTI, P., CALABRESE, R., POLI, G., SANTINI, B. & BIGNAMINI, E. 2013. Oxidative stress in stable cystic fibrosis patients: Do we need higher antioxidant plasma levels? *Journal of Cystic Fibrosis*, 12, 35-41.
- LI, F., LI, S., LI, H. B., DENG, G. F., LING, W. H., WU, S., XU, X. R. & CHEN, F. 2013a. 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. 2014a. Anticancer potential of *Hericium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers. *Journal of Ethnopharmacology*, 153, 521-530.
- LI, H., HORKE, S. & FÖRSTERMANN, U. 2013b. Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34, 313-319.
- LI, H., HORKE, S. & FÖRSTERMANN, U. 2014b. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 237, 208-219.

- LI, N., LIU, J.-H., ZHANG, J. & YU, B.-Y. 2008. Comparative evaluation of cytotoxicity and antioxidative activity of 20 flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3876-3883.
- LIANG, Y.-C., HUANG, Y.-T., TSAI, S.-H., LIN-SHIAU, S.-Y., CHEN, C.-F. & LIN, J.-K. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 20, 1945-1952.
- 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.
- LILIC, D. 2009. Immune response to infection. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, 10, 218-220.
- 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.
- LIN, N., SATO, T., TAKAYAMA, Y., MIMAKI, Y., SASHIDA, Y., YANO, M. & ITO, A. 2003. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 65, 2065-2071.
- LIN, Z.-B. 2005. Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmacological Sciences*, 99, 144-153.
- LIU, F., NG, T. B., WANG, H., FUNG, M. C. & OOI, V. E. C. 2005. Lectin from *Tricholoma mongolicum* S. Imai (Agaricomycetidae) mycelia stimulates gene expression of immunomodulating cytokines in mouse peritoneal macrophages and splenocytes. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7, 243-248.
- LIU, J., ZHANG, W., JING, H. & POPOVICH, D. G. 2010. Bog bilberry (*Vaccinium uliginosum* L.) extract reduces cultured Hep-G2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability, affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability. *Journal of Food Science*, 75, H103-H107.
- 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.
- LIU, R. H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517S-520S.
- LOS, M., DRÖGE, W., STRICKER, K., BAEUERLE, P. A. & SCHULZE-OSTHOFF, K. 1995. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *European Journal of Immunology*, 25, 159-165.
- LOZUPONE, F. & FAIS, S. 2015. Cancer cell cannibalism: A Primeval Option to Survive. *Current molecular medicine*, 15, 836-841.
- LU, X., CHO, H. J., LEE, H. S., CHUN, H. S., KWON, D. Y. & PARK, J. H. 2005. Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *The Journal of Nutrition*, 135, 2884-2890.

- LU, Y. & YEAP FOO, L. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68, 81-85.
- LUGASI, A. & HÓVÁRI, J. 2003. Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Food/Nahrung*, 47, 79-86.
- 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.
- MACKAY, C. R. 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nature Immunology*, 2, 95-101.
- MADLENER, S., ILLMER, C., HORVATH, Z., SAIKO, P., LOSERT, A., HERBACEK, I., GRUSCH, M., ELFORD, H. L., KRUPITZA, G., BERNHAUS, A., FRITZER-SZEKERES, M. & SZEKERES, T. 2007. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters*, 245, 156-162.
- MALOY, K. J. & POWRIE, F. 2011. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474, 298-306.
- MANACH, C., MAZUR, A. & SCALBERT, A. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16, 77-84.
- MANGELS, A. R., HOLDEN, J. M., BEECHER, G. R., FORMAN, M. R. & LANZA, E. 1993. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *Journal of the American Dietetic Association*, 93, 284-296.
- MANTOVANI, M. S., BELLINI, M. F., ANGELI, J. P. F., OLIVEIRA, R. J., SILVA, A. F. & RIBEIRO, L. R. 2008. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658, 154-161.
- 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.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, B., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. & TUÑÓN, M. J. 2005. Quercetin attenuates nuclear factor- κ B activation and nitric oxide production in interleukin-1 β -activated rat hepatocytes. *The Journal of Nutrition*, 135, 1359-1365.
- MASCI, A., COCCIA, A., LENDARO, E., MOSCA, L., PAOLICELLI, P. & CESA, S. 2016. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chemistry*, 202, 59-69.
- MASIHI, K. N. 2000. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. *International Journal of Immunopharmacology*, 22, 1083-1091.
- MATÉS, J. M., SEGURA, J. A., ALONSO, F. J. & MÁRQUEZ, J. 2008. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Archives of Toxicology*, 82, 273-299.

- MATÉS, J. M., SEGURA, J. A., ALONSO, F. J. & MÁRQUEZ, J. 2010. Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 1328-1341.
- 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.
- MEIRA, D. A., PEREIRA, P. C., MARCONDES-MACHADO, J., MENDES, R. P., BARRAVIERA, B., PELLEGRINO, J. J., REZKALLAH-IWASSO, M. T., PERACOLI, M. T., CASTILHO, L. M. & THOMAZINI, I. 1996. The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55, 496-503.
- MEYDANI, S. N., MEYDANI, M., BLUMBERG, J. B., LEKA, L. S., SIBER, G., LOSZEWSKI, R., THOMPSON, C., PEDROSA, M. C., DIAMOND, R. D. & STOLLAR, B. D. 1997. Vitamin E supplementation and *in vivo* immune response in healthy elderly subjects: a randomized controlled trial. *Jama*, 277, 1380-1386.
- 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.
- MILES, P. G. & CHANG, S.-T. 1997. *Mushroom biology: concise basics and current developments*, World Scientific.
- MILES, P. G. & CHANG, S.-T. 2004. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*, CRC press.
- MIN, D. B. & BOFF, J. M. 2002. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 1, 58-72.
- 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.
- MIRANDA, C. L., STEVENS, J. F., HELMRICH, A., HENDERSON, M. C., RODRIGUEZ, R. J., YANG, Y. H., DEINZER, M. L., BARNES, D. W. & BUHLER, D. R. 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 271-285.
- MIURA, N. N., ADACHI, Y., YADOMAE, T., TAMURA, H., TANAKA, S. & OHNO, N. 2003. Structure and biological activities of β -Glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Microbiology and Immunology*, 47, 173-182.
- MO, H., WINTER, H. C. & GOLDSTEIN, I. J. 2000. Purification and characterization of a Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 10623-10629.
- MORLEY, K. L., FERGUSON, P. J. & KOROPATNICK, J. 2007. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Letters*, 251, 168-178.
- MOSMAN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological 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.
- MURRAY, R., BENDER, D., BOTHAM, K. M., KENNELLY, P. J., RODWELL, V. & WEIL, P. A. 2012. *Harpers Illustrated Biochemistry 29/E*, McGraw Hill Professional.
- NACZK, M. & SHAHIDI, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- NAGAPRASHANTHA, L. D., VATSYAYAN, R., SINGHAL, J., FAST, S., ROBY, R., AWASTHI, S. & SINGHAL, S. S. 2011. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. *Biochemical Pharmacology*, 82, 1100-1109.
- NAVAB, M., ANANTHRAMAIAH, G. M., REDDY, S. T., VAN LENTEN, B. J., ANSELL, B. J., FONAROW, G. C., VAHABZADEH, K., HAMA, S., HOUGH, G. & KAMRANPOUR, N. 2004. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis the oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of lipid research*, 45, 993-1007.
- NAVAB, M., REDDY, S. T., VAN LENTEN, B. J., BUGA, G. M., HOUGH, G., WAGNER, A. C. & FOGELMAN, A. M. 2012. High-density lipoprotein and 4F peptide reduce systemic inflammation by modulating intestinal oxidized lipid metabolism novel hypotheses and review of literature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32, 2553-2560.
- NETO, C. C. 2007. Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 652-664.
- NGAI, P. H. K. & NG, T. B. 2004. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314, 988-993.
- NIKI, E. 1997. Free radicals, antioxidants, and cancer. *Food factors for Cancer prevention*. Springer.
- NICHOLLS, S. J. & HAZEN, S. L. 2005. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25, 1102-1111.
- NIJVELDT, R. J., VAN NOOD, E., VAN HOORN, D. E. C., BOELENS, P. G., VAN NORREN, K. & VAN LEEUWEN, P. A. M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.
- NOVOGRODSKY, A., RAVID, A., RUBIN, A. L. & STENZEL, K. H. 1982. Hydroxyl radical scavengers inhibit lymphocyte mitogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79, 1171-1174.
- NOWELL, P. C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), 23-28.

- 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-CALDENTY, 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.
- OHARA, Y., PETERSON, T. E. & HARRISON, D. G. 1993. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 2546.
- OHNO, N., FURUKAWA, M., MIURA, N. N., ADACHI, Y., MOTOI, M. & YADOMAE, T. 2001. Antitumor. β -Glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24, 820-828.
- OHNO, N., HARADA, T., MASUZAWA, S., MIURA, N. N., ADACHI, Y., NAKAJIMA, M. & YADOMAE, T. 2002. Antitumor activity and hematopoietic response of a β -glucan extracted from an edible and medicinal mushroom *Sparassis crispa* Wulf.: Fr.(Aphyllphoromycetidae). *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 β -glucan preparation, scg, extracted from a culinary–medicinal mushroom, *Sparassis crispa* Wulf.: Fr.(Aphyllphoromycetidae), and application to cancer patients. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5, 1-10.
- OHNO, S., SUMIYOSHI, Y., HASHINE, K., SHIRATO, A., KYO, S. & INOUE, M. 2013. Quality of life improvements among cancer patients in remission following the consumption of *Agaricus blazei* Murill mushroom extract. *Complementary Therapies in Medicine*, 21, 460-467.
- OKAMOTO, T., KODOI, R., NONAKA, Y., FUKUDA, I., HASHIMOTO, T., KANAZAWA, K., MIZUNO, M. & ASHIDA, H. 2004. Lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) suppresses expression of cytochrome P450 1A subfamily in the mouse liver. *Biofactors*, 21, 407-409.
- OLIVEIRA, R. J., MATUO, R., DA SILVA, A. F., MATIAZI, H. J., MANTOVANI, M. S. & RIBEIRO, L. R. 2007. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology in Vitro*, 21, 41-52.
- OLIVEIRA, R. J., RIBEIRO, L. R., DA SILVA, A. F., MATUO, R. & MANTOVANI, M. S. 2006. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicology in Vitro*, 20, 1225-1233.
- ONG, A. S. H. & TEE, E. S. 1992. Natural sources of carotenoids from plants and oils. *Methods in Enzymology*. 213, 142-167.

- 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.
- OWEN, R. W., GIACOSA, A., HULL, W. E., HAUBNER, R., SPIEGELHALDER, B. & BARTSCH, H. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36, 1235-1247.
- PAIVA, S. A. R. & RUSSELL, R. M. 1999. β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18, 426-433.
- PANDEY, M. & GUPTA, S. 2009. Green tea and prostate cancer: from bench to clinic. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 1, 13-25.
- 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.
- PARHAM, P. 2014. *The immune system*, Garland Science, p. 532, ISBN: 9780815345275.
- PARK, H.-H., LEE, S., SON, H.-Y., PARK, S.-B., KIM, M.-S., CHOI, E.-J., SINGH, T. S. K., HA, J.-H., LEE, M.-G. & KIM, J.-E. 2008. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Archives of Pharmacal Research*, 31, 1303-1311.
- PASSARDI, F., COSIO, C., PENEL, C. & DUNAND, C. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24, 255-265.
- PATEL, S. & GOYAL, A. 2012. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2,1, 1-15.
- PATTERSON, D. A., RAPOPORT, R., PATTERSON, M. A. K., FREED, B. M. & LEMPERT, N. 1988. Hydrogen peroxide—mediated inhibition of T-cell response to mitogens is a result of direct action on T cells. *Archives of Surgery*, 123, 300-304.
- PAVELKA, M. & ROTH, J. 2015. *Functional ultrastructure: atlas of tissue biology and pathology* 3rd edition, Springer, p. 402, ISBN: 978-3-7091-1830-6.
- PAVLICK, K. P., LAROUX, F. S., FUSELER, J., WOLF, R. E., GRAY, L., HOFFMAN, J. & GRISHAM, M. B. 2002. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 311-322.
- PIAZZON, A., VRHOVSEK, U., MASUERO, D., MATTIVI, F., MANDOJ, F. & NARDINI, M. 2012. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12312-12323.
- PIETTA, P.-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- PLUMB, G. W., LAMBERT, N., CHAMBERS, S. J., WANIGATUNGA, S., HEANEY, R. K., PLUMB, J. A., ARUOMA, O. I., HALLIWELL, B., MILLER, N. J. & WILLIAMSON, G. 1996. Are whole extracts and purified glucosinolates from cruciferous vegetables antioxidants? *Free Radical Research*, 25, 75-86.
- POKORNÝ, J. 2007. Are natural antioxidants better—and safer—than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 629-642.
- POPOV, S. V., MARKOV, P. A., NIKITINA, I. R., PETRISHEV, S., SMIRNOV, V. & OVODOV, Y. S. 2006. Preventive effect of a pectic polysaccharide of the common

- cranberry *Vaccinium oxycoccos* L. on acetic acid-induced colitis in mice. *World Journal of Gastroenterology: World Journal of Gastroenterology*, 12, 6646-6651.
- 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.
- PROTEGGENTE, A. R., PANNALA, A. S., PAGANGA, G., BUREN, L. V., WAGNER, E., WISEMAN, S., PUT, F. V. D., DACOMBE, C. & RICE-EVANS, C. A. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36, 217-233.
- QUANG, D. N., HASHIMOTO, T. & ASAKAWA, Y. 2006. Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances. *The Chemical Record*, 6, 79-99.
- RACEK, J. 2003. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění, Galén, Praha, p. 90, ISBN: 8072622315
- RAFFO, A., SINESIO, F., MONETA, E., NARDO, N., PEPARAI, M. & PAOLETTI, F. 2006. Internal quality of fresh and cold stored celery petioles described by sensory profile, chemical and instrumental measurements. *European Food Research and Technology*, 222, 590-599.
- RAHAL, A., KUMAR, A., SINGH, V., YADAV, B., TIWARI, R., CHAKRABORTY, S. & DHAMA, K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, 2014, 1-19.
- RAO, A. V. & RAO, L. G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207-216.
- RASO, G. M., MELI, R., DI CARLO, G., PACILIO, M. & DI CARLO, R. 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. *Life Sciences*, 68, 921-931.
- RAY, P. D., HUANG, B.-W. & TSUJI, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24, 981-990.
- REBOUL, E., RICHELLE, M., PERROT, E., DESMOULINS-MALEZET, C., PIRISI, V. & BOREL, P. 2006. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8749-8755.
- RECHNER, A. R., KUHNLE, G., BREMNER, P., HUBBARD, G. P., MOORE, K. P. & RICE-EVANS, C. A. 2002. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 220-235.
- REISS, R., JOHNSTON, J., TUCKER, K., DESESSO, J. M. & KEEN, C. L. 2012. Estimation of cancer risks and benefits associated with a potential increased consumption of fruits and vegetables. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4421-4427.
- REMANS, P. H. J., GRINGHUIS, S. I., VAN LAAR, J. M., SANDERS, M. E., PAPENDRECHT-VAN DER VOORT, E. A. M., ZWARTKRUIS, F. J. T., LEVARHT,

- E. W. N., ROSAS, M., COFFER, P. J. & BREEDVELD, F. C. 2004. Rap1 signaling is required for suppression of Ras-generated reactive oxygen species and protection against oxidative stress in T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 173, 920-931.
- REN, L., PERERA, C. & HEMAR, Y. 2012. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Food and Function*, 3, 1118-1130.
- REQUE, P. M., STEFFENS, R. S., JABLONSKI, A., FLÔRES, S. H., RIOS, A. D. O. & DE JONG, E. V. 2014. Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33, 111-116.
- REZAIIE, A., GHORBANI, F., ESHGHTORK, A., ZAMANI, M. J., DEHGHAN, G., TAGHAVI, B., NIKFAR, S., MOHAMMADIRAD, A., DARYANI, N. E. & ABDOLLAHI, M. 2006. Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor- β 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1091, 110-122.
- REZAIIE, A., PARKER, R. D. & ABDOLLAHI, M. 2007. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Digestive Diseases and Sciences*, 52, 2015-2021.
- RICE-EVANS, C., MILLER, N. & PAGANGA, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J. & PAGANGA, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- 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.
- RISTOFF, E. & LARSSON, A. 1998. Patients with genetic defects in the γ -glutamyl cycle. *Chemico-biological interactions*, 111, 113-121.
- ROMÁN, M. D., BOA, E. & WOODWARD, S. 2006. Wild-gathered fungi for health and rural livelihoods. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65, 190-197.
- ROP, O., MLCEK, J. & JURIKOVA, T. 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*, 67, 624-631.
- ROSS, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 801-809.
- ROTH, S. & DRÖGE, W. 1987. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cellular Immunology*, 108, 417-424.
- 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.

- RYTER, S. W., KIM, H. P., HOETZEL, A., PARK, J. W., NAKAHIRA, K., WANG, X. & CHOI, A. M. K. 2007. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 9, 49-89.
- SADLER, M. 2003. Nutritional properties of edible fungi. *Nutrition Bulletin*, 28, 305-308.
- SAKATA, K., HIROSE, Y., QIAO, Z., TANAKA, T. & MORI, H. 2003. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Letters*, 199, 139-145.
- SALA, A., RECIO, M. D. C., GINER, R. M., MÁÑEZ, S., TOURNIER, H., SCHINELLA, G. & RÍOS, J. L. 2002. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54, 365-371.
- 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.
- SAW, C. L. L., CINTRON, M., WU, T. Y., GUO, Y., HUANG, Y., JEONG, W. S. & KONG, A. N. T. 2011. Pharmacodynamics of dietary phytochemical indoles I3C and DIM: Induction of Nrf2-mediated phase II drug metabolizing and antioxidant genes and synergism with isothiocyanates. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 32, 289-300.
- SCALBERT, A. & WILLIAMSON, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130, 2073S-2085S.
- SCHMIELAU, J. & FINN, O. J. 2001. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Research*, 61, 4756-4760.
- SEELINGER, G., MERFORT, I., WÖLFLE, U. & SCHEMPP, C. M. 2008. Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules*, 13, 2628-2651.
- SEERAM, N. P. 2008. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 627-629.
- SEERAM, N. P., ADAMS, L. S., ZHANG, Y., LEE, R., SAND, D., SCHEULLER, H. S. & HEBER, D. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9329-9339.
- ŞENER, G., EKŞİOĞLU-DEMIRALP, E., ÇETİNER, M., ERCAN, F. & YEĞEN, B. Ç. 2006. β -glucan ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury via its antioxidant and immunomodulatory effects. *European Journal of Pharmacology*, 542, 170-178.
- 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.
- SHEN, H.-M. & LIU, Z.-G. 2006. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 928-939.

- SHEN, S.-C., LEE, W.-R., LIN, H.-Y., HUANG, H.-C., KO, C.-H., YANG, L.-L. & CHEN, Y.-C. 2002. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E 2 production. *European Journal of Pharmacology*, 446, 187-194.
- SHI, B. J., NIE, X.-H., CHEN, L.-Z., LIU, Y.-L. & TAO, W.-Y. 2007. Anticancer activities of a chemically sulfated polysaccharide obtained from *Grifola frondosa* and its combination with 5-Fluorouracil against human gastric carcinoma cells. *Carbohydrate Polymers*, 68, 687-692.
- SHI, M., YANG, Y., HU, X. & ZHANG, Z. 2014. Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue. *Food Chemistry*, 155, 50-56.
- SHIMIZU, M., DEGUCHI, A., JOE, A. K., MCKOY, J. F., MORIWAKI, H. & WEINSTEIN, I. B. 2004. EGCG inhibits activation of HER3 and expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 5, 69-78.
- SHIN, M. S., LEE, S., LEE, K. Y. & LEE, H. G. 2005. Structural and biological characterization of aminated-derivatized oat β -glucan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5554-5558.
- SHU, L., CHEUNG, K.-L., KHOR, T. O., CHEN, C. & KONG, A.-N. 2010. Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 483-502.
- SHU, L., KHOR, T. O., LEE, J.-H., BOYANAPALLI, S. S. S., HUANG, Y., WU, T.-Y., SAW, C. L. L., CHEUNG, K.-L. & KONG, A.-N. T. 2011. Epigenetic CpG demethylation of the promoter and reactivation of the expression of Neurog1 by curcumin in prostate LNCaP cells. *Association of Pharmaceutical Scientists*, 13, 606-614.
- SIES, H. 1985. Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. *Oxidative Stress*, 73-90.
- SIES, H. & MURPHY, M. E. 1991. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 8, 211-219.
- SINGLETARY, K. W., JUNG, K.-J. & GIUSTI, M. 2007. Anthocyanin-rich grape extract blocks breast cell DNA damage. *Journal of Medicinal Food*, 10, 244-251.
- SMITH, J. E., ROWAN, N. & SULLIVAN, R. 2002. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments, *Cancer Research UK London*, p. 256, ASIN: B001A3XY4K
- 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.
- SOLTYS, J., BOROSKOVÁ, Z., DUBINSKÝ, P., TOMASOVICOVÁ, O., AUER, H. & ASPÖCK, H. 1996. Effect of glucan immunomodulator on the immune response and larval burdens in mice with experimental toxocarosis. *Applied Parasitology*, 37, 161-167.

- SPITZ, D. R., AZZAM, E. I., LI, J. J. & GIUS, D. 2004. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23, 311-322.
- STEINMETZ, K. A. & POTTER, J. D. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 1027-1039.
- STEPHENS, N. G., PARSONS, A., BROWN, M. J., SCHOFIELD, P. M., KELLY, F., CHEESEMAN, K. & MITCHINSON, M. J. 1996. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *The Lancet*, 347, 781-786.
- STERNBERG, Z., CHADHA, K., LIEBERMAN, A., HOJNACKI, D., DRAKE, A., ZAMBONI, P., ROCCO, P., GRAZIOLI, E., WEINSTOCK-GUTTMAN, B. & MUNSCHAUER, F. 2008. Quercetin and interferon- β modulate immune response (s) in peripheral blood mononuclear cells isolated from multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 205, 142-147.
- STONER, G. D., BRUCE C. C. 2004. Chemoprevention by fruit phenolic compounds. *Cancer chemoprevention*. Humana Press, 2004. 419-435, ISBN: 978-1-61737-342-8
- 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.
- SU, C. A., XU, X. Y., LIU, D. Y., WU, M., ZENG, F. Q., ZENG, M. Y., WEI, W., JIANG, N. & LUO, X. 2013. Isolation and characterization of exopolysaccharide with immunomodulatory activity from fermentation broth of *Morchella conica*. *Daru*, 21,1:1.
- 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, J. & LIU, R. H. 2008. Apple phytochemical extracts inhibit proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells through cell cycle modulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11661-11667.
- SUN, T., POWERS, J. R. & TANG, J. 2007. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, 105, 101-106.
- SYLVESTER, P. W. & SHAH, S. J. 2005. Mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of vitamin E in mammary cancer cells. *Frontiers in Bioscience*, 10, 699-709.
- SZE, S. C. W., HO, J. C. K. & LIU, W. K. 2004. *Volvariella volvacea* lectin activates mouse T lymphocytes by a calcium dependent pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92, 1193-1202.
- SÁNCHEZ-MORENO, C., CANO, M. P., DE ANCOS, B., PLAZA, L., OLMEDILLA, B., GRANADO, F. & MARTÍN, A. 2003. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 454-460.
- TAKAKU, T., KIMURA, Y. & OKUDA, H. 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 131, 1409-1413.

- TAN, A. C., KONCZAK, I., SZE, D. M. Y. & RAMZAN, I. 2011. Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals. *Nutrition and Cancer*, 63, 495-505.
- TANG, W., LIU, J.-W., ZHAO, W.-M., WEI, D.-Z. & ZHONG, J.-J. 2006. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. *Life Sciences*, 80, 205-211.
- TANIDA, S., MIZOSHITA, T., MIZUSHIMA, T., SASAKI, M., SHIMURA, T., KAMIYA, T., KATAOKA, H. & JOH, T. 2011. Involvement of oxidative stress and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48, 112-116.
- TAUCHEN, J., MARSIK, P., KVASNICOVA, M., MAGHRADZE, D., KOKOSKA, L., VANEK, T. & LANDA, P. 2015. *In vitro* antioxidant activity and phenolic composition of Georgian, Central and West European wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 113-121.
- TERRY, P., GIOVANNUCCI, E., MICHELS, K. B., BERGKVIST, L., HANSEN, H., HOLMBERG, L. & WOLK, A. 2001. Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 525-533.
- THETSRIMUANG, C., KHAMMUANG, S., CHIABLAEM, K., SRISOMSAP, C. & SARNTHIMA, R. 2011. Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous* Lév. *Food Chemistry*, 128, 634-639.
- THIMM, J. C., BURRITT, D. J., DUCKER, W. A. & MELTON, L. D. 2000. Celery (*Apium graveolens* L.) parenchyma cell walls examined by atomic force microscopy: effect of dehydration on cellulose microfibrils. *Planta*, 212, 25-32.
- 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.
- TOHAMY, A. A., EL-GHOR, A. A., EL-NAHAS, S. M. & NOSHY, M. M. 2003. β -glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 541, 45-53.
- TORCHINSKY, M. B., GARAUDE, J., MARTIN, A. P. & BLANDER, J. M. 2009. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs TH17 cell differentiation. *Nature*, 458, 78-82.
- TRABER, M. G. & ATKINSON, J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 4-15.
- 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.
- TURNBULL, J. L., PATCHEN, M. L. & SCADDEN, D. T. 1999. The polysaccharide, PGG-glucan, enhances human myelopoiesis by direct action independent of and additive to early-acting cytokines. *Acta Haematologica*, 102, 66-71.
- TZIANABOS, A. O. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 523-533.

- UJIKI, M. B., DING, X.-Z., SALABAT, M. R., BENTREM, D. J., GOLKAR, L., MILAM, B., TALAMONTI, M. S., BELL, R. H., IWAMURA, T. & ADRIAN, T. E. 2006. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Molecular Cancer*, 5, 76, 1-8.
- VALDAMERI, G., TROMBETTA-LIMA, M., WORFEL, P. R., PIRES, A. R. A., MARTINEZ, G. R., NOLETO, G. R., CADENA, S., SOGAYAR, M. C., WINNISCHOFER, S. & ROCHA, M. E. M. 2011. Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells. *Chemico-Biological Interactions*, 193, 180-189.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M. & TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- VALKO, M., RHODES, C. J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. M. & MAZUR, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160, 1-40.
- VALVERDE, M. E., HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. & PAREDES-LÓPEZ, O. 2015. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, 2015, 1-14.
- 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.
- VAN DER VLIET, A., EISERICH, J. P., MARELICH, G. P., HALLIWELL, B. & CROSS, C. E. 1996. Oxidative stress in cystic fibrosis: Does it occur and does it matter? In: HELMUT, S. (ed.) *Advances in Pharmacology*. Academic Press, 37, 491-513.
- VANNUCCI, L., KRIZAN, J., SIMA, P., STAKHEEV, D., CAJA, F., RAJSIGLOVA, L., HORAK, V. & SAIIEH, M. 2013. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). *International Journal of Oncology*, 43, 357-364.
- VEERIAH, S., KAUTENBURGER, T., HABERMANN, N., SAUER, J., DIETRICH, H., WILL, F. & POOL-ZOBEL, B. L. 2006. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *Molecular Carcinogenesis*, 45, 164-174.
- VELIOGLU, Y. S., MAZZA, G., GAO, L. & OOMAH, B. D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
- VETVICKA, V. & VETVICKOVA, J. 2014. Immune-enhancing effects of Maitake (*Grifola frondosa*) and Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts. *Annals of Translational Medicine*, 2.
- VIDYA PRIYADARSINI, R., SENTHIL MURUGAN, R., MAITREYI, S., RAMALINGAM, K., KARUNAGARAN, D. & NAGINI, S. 2010. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human

- cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 649, 84-91.
- VISANJI, J. M., DUTHIE, S. J., PIRIE, L., THOMPSON, D. G. & PADFIELD, P. J. 2004. Dietary isothiocyanates inhibit Caco-2 cell proliferation and induce G2/M phase cell cycle arrest, DNA damage, and G2/M checkpoint activation. *The Journal of Nutrition*, 134, 3121-3126.
- VOLŠTÁTOVÁ, T., HAVLÍK, J., DOSKOČIL, I., GEIGEROVÁ, M. & RADA, V. 2015. Effect of hydrolyzed milk on the adhesion of lactobacilli to intestinal cells. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 46, 21-25.
- 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, H. X., NG, T. B., OOI, V. E., LIU, W. K. & CHANG, S. T. 1996. Actions of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum* on macrophages, splenocytes and life-span in sarcoma-bearing mice. *Anticancer Research*, 17, 419-424.
- 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- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 850-857.
- WANG, W., HEIDEMAN, L., CHUNG, C. S., PELLING, J. C., KOEHLER, K. J. & BIRT, D. F. 2000. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Molecular Carcinogenesis*, 28, 102-110.
- WANG, Y., ZHANG, L., LI, Y., HOU, X. & ZENG, F. 2004. Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a β -glucan from *Poria cocos* sclerotium. *Carbohydrate Research*, 339, 2567-2574.
- WASSER, S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 258-274.
- WASSER, S. P. & WEIS, A. L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 47-50.
- WHITE, C. R., DARLEY-USMAR, V., BERRINGTON, W. R., MCADAMS, M., GORE, J. Z., THOMPSON, J. A., PARKS, D. A., TARPEY, M. M. & FREEMAN, B. A. 1996. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 8745-8749.
- WILLIAMS, M. S. & KWON, J. 2004. T Cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 1144-1151.
- WILLIAMSON, G. & CLIFFORD, M. N. 2010. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, 104, S48-S66.
- WITKO-SARSAT, V., RIEU, P., DESCAMPS-LATSCHA, B., LESAVRE, P. & HALBWACHS-MECARELLI, L. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation*, 80, 617-653.

- WOLFE, K., WU, X. & LIU, R. H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 609-614.
- WON, D. P., LEE, J. S., KWON, D. S., LEE, K. E., SHIN, W. C. & HONG, E. K. 2011. Immunostimulating activity by polysaccharides isolated from fruiting body of *Inonotus obliquus*. *Molecules and Cells*, 31, 165-173.
- WOOD, L. G., FITZGERALD, D. A., LEE, A. K. & GARG, M. L. 2003. Improved antioxidant and fatty acid status of patients with cystic fibrosis after antioxidant supplementation is linked to improved lung function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 150-159.
- WOODWARD, G., KROON, P., CASSIDY, A. & KAY, C. 2009. Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5271-5278.
- 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.
- WUNDERLICH, R., ERNST, A., RÖDEL, F., FIETKAU, R., OTT, O., LAUBER, K., FREY, B. & GAJPL, U. S. 2015. Low and moderate doses of ionizing radiation up to 2 Gy modulate transmigration and chemotaxis of activated macrophages, provoke an anti-inflammatory cytokine milieu, but do not impact upon viability and phagocytic function. *Clinical and Experimental Immunology*, 179, 50-61.
- XU, X., YASUDA, M., NAKAMURA-TSURUTA, S., MIZUNO, M. & ASHIDA, H. 2012. β -Glucan from *Lentinus edodes* inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- α production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated murine RAW 264.7 macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 871-878.
- XU, X.-F., CAI, B.-L., GUAN, S.-M., LI, Y., WU, J.-Z., WANG, Y. & LIU, B. 2011. Baicalin induces human mucoepidermoid carcinoma Mc3 cells apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Investigational New Drugs*, 29, 637-645.
- YAMAJI, T., INOUE, M., SASAZUKI, S., IWASAKI, M., KURAHASHI, N., SHIMAZU, T. & TSUGANE, S. 2008. Fruit and vegetable consumption and squamous cell carcinoma of the esophagus in Japan: the JPHC study. *International Journal of Cancer*, 123, 1935-1940.
- YAMAMOTO, K., KIMURA, T., SUGITACHI, A. & MATSUURA, N. 2009. Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of β -1, 3-D-Glucan Purified from Hanabiratake, *Sparassis crispa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 259-263.
- YAN, M. H., WANG, X. & ZHU, X. 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 90-101.
- YANG, C., GUNDALA, S. R., MUKKAVILLI, R., VANGALA, S., REID, M. D. & ANEJA, R. 2015. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola* (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis*, 36, 656-665.
- 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.

- YAO, H.-Y., ZHANG, L.-H., SHEN, J., SHEN, H.-J., JIA, Y.-L., YAN, X.-F. & XIE, Q.-M. 2011. Cytoporus polysaccharide prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury associated with down-regulating Toll-like receptor 2 expression. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 1267-1274.
- YI, W., FISCHER, J., KREWER, G. & AKOH, C. C. 2005. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7320-7329.
- YIN, H., WANG, Y., WANG, Y., CHEN, T., TANG, H. & WANG, M. 2010. Purification, characterization and immuno-modulating properties of polysaccharides isolated from *Flammulina velutipes* mycelium. *American Journal of Chinese Medicine*, 38, 191-204.
- 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.
- YU, C. S., LAI, K. C., YANG, J. S., CHIANG, J. H., LU, C. C., WU, C. L., LIN, J. P., LIAO, C. L., TANG, N. Y. & WOOD, W. G. 2010. Quercetin inhibited murine leukemia WEHI-3 cells *in vivo* and promoted immune response. *Phytotherapy Research*, 24, 163-168.
- 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.
- YURI, C. H., ESTRADA, A., VAN KESSEL, A., GAJADHAR, A., REDMOND, M. & LAARVELD, B. 1998. Immunomodulatory effects of oat β -Glucan administered intragastrically or parenterally on mice infected with *Eimeria vermiformis*. *Microbiology and Immunology*, 42, 457-465.
- ZAMOCKY, M., FURTMÜLLER, P. G. & OBINGER, C. 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10, 1527-1548.
- ZHANG, L., LI, X., XU, X. & ZENG, F. 2005. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydrate Research*, 340, 1515-1521.
- ZHANG, W.-Y., LIU, H.-Q., XIE, K.-Q., YIN, L.-L., LI, Y., KWIK-URIBE, C. L. & ZHU, X.-Z. 2006. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] suppresses the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-treated monocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 508-515.
- 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.
- ZHENG, W. & WANG, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165-5170.
- 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.

- ZIADY, A. G. & HANSEN, J. 2014. Redox balance in Cystic Fibrosis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 52, 113-123.
- ZOU, W. & CHEN, L. 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 8, 467-477.
- ŽITŇANOVÁ, I., KORYTÁR, P., ARUOMA, O. I., ŠUSTROVÁ, M., GARAIOVÁ, I., MUCHOVÁ, J., KALNOVIČOVÁ, T., PUESCHEL, S. & ĎURAČKOVÁ, Z. 2004. Uric acid and allantoin levels in Down syndrome: antioxidant and oxidative stress mechanisms? *Clinica Chimica Acta*, 341, 139-146.

Seznam tabulek a obrázků

Tabulka 1: Přehled některých fenolových sloučenin a jejich biologických účinků.

Tabulka 2: Polysacharidy z hub a jejich imunomodulační aktivita.

Tabulka 3: Struktura, zdroj a biologická aktivita β -glukanů.

Tabulka 4: Ovocné a zeleninové džusy - obsah fenolových sloučenin a antioxidační aktivita.

Tabulka 5: Ovocné a zeleninové džusy - produkce NO s cytotoxicitou na buněčné linii RAW264.7.

Tabulka 6: Antioxidační aktivita metanolových extraktů ovoce a zeleniny.

Tabulka 7: Produkce NO metanolových extraktů ovoce a zeleniny.

Tabulka 8: Cytotoxické vlastnosti extraktu Polyporales a jejich vliv na fagocytární reakci izolovaných neutrofilů.

Tabulka 9: Obsah β -glukanů a celkových fenolových látek, v testovaných etanolových extraktech hub z řádu Polyporales.

Obr. 1: Fagocytární vychytávání exogenních částic

Obr. 2: Struktura β -1,3 glukanů z hub s postranními β -1,6 řetězci

Obr. 3: Antioxidační aktivita džusů

Obr. 4a: Produkce NO (%) u džusů na buňkách myších makrofágu buněčné linie RAW264.7, vystavených 1 μ g/ml LPS (100%)

Obr. 4b: Produkce NO (%) u džusů na buňkách myších makrofágu buněčné linie RAW264.7, vystavených 1 μ g/ml LPS (100%)

Obr. 5: Vzájemná korelace výsledků zvolených metod TPC + ORAC a TPC + NO

Obr. 6: Antioxidační aktivita metanolových extraktů

Obr. 7: Produkce NO (%) u metanolových extraktů na buňkách myších makrofágu buněčné linie RAW264.7, vystavených 1 μ g/ml LPS (100%)

Obr. 8: Vzájemná korelace výsledků zvolených metod ORAC a DPPH u extraktů z ovoce a zeleniny

Obr. 9: Typická křivka relativní luminiscence

Obr. 10: Vzájemná korelace výsledků hub

Obr. 11: Antiproliferační aktivity etanolového extraktu *S. crispa*

Obr. 12: Antiproliferační aktivita standartního etanolového extraktu *L. edodes*

Obr. 13: Antiproliferační aktivita standartního etanolového extraktu *G. lucidum*