JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

Sekundární sirné metabolity houževnatce jedlého

Mgr. Kristýna Kupcová

2017

Školitel: **doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.**
Zemědělská fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucímu disertační práce doc. Ing Romanu Kubcovi, Ph.D., který mě trpělivě vedl, Mgr. Ivetě Štefanové, která vytvořila pohodové pracovní prostředí, Ing. Petře Kučerové, Ph.D., která mi pomáhala i radila, a své rodině, která dobře ví proč.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 26. 11. 2016

SOUHRN

Tato disertační práce se zabývá detailním studiem sirných sloučenin druhé nejpěstovanější houby na světě − houževnatce jedlého (*Lentinula edodes*, Berk., Pegler). Houževnatec jedlý je známý především pod lidovým názvem shiitake, pochází z Japonska a první zmínky o něm se datují do doby před více než 2000 lety. Bývá často označován za houbu dlouhověkosti, elixír života či za královnu mezi houbami, a to z důvodů (ať už domnělých či vědecky podložených) pozitivních účinků na lidské zdraví. Pravidelná konzumace shiitake pomáhá snižovat vysoký krevní tlak i hladinu cholesterolu v krvi, posilovat imunitu a působí i preventivně proti některým typům nádorového bujení a alergiím. Dalším dobrým důvodem ke konzumaci této kulinářsky vysoce ceněné houby je typická jemně česnekovitá chuť a vůně. Nositeli těchto žádoucích organoleptických vlastností jsou rozmanité sirné sloučeniny. Jejich společným prekurzorem je lentiniková kyselina, sirný dipeptid, který se při narušení pletiva této houby rozkládá sledem po sobě jdoucích enzymově katalyzovaných reakcí na široké spektrum senzoricky aktivních sirných sloučenin.

Jedním z cílů této disertační práce bylo studium mechanismu vzniku senzoricky/ biologicky aktivních sirných sloučenin houževnatce jedlého za pomoci moderních analytických technik (DART−HRMS, HPLC−HRMS, GC−MS) a následné potvrzení (či vyvrácení) dosud jen teoreticky navrženého způsobu rozkladu lentinikové kyseliny.

Dalšími cíly bylo testovat biologické vlastnosti nejvýznamnější sirné sloučeniny vznikající při zpracování této houby – lenthioninu (1,2,3,5,6-pentathiepanu). Hlavní pozornost byla zaměřena na jeho antimikrobiální, protirakovinnou a protizánětlivou aktivitu, jakož i jeho antioxidační vlastnosti. Těmto testům byly též podrobeny vodné extrakty čerstvých i kulinárně zpracovaných plodnic shiitake (vařením, pražením a sušením).

Výsledkem disertační práce bylo mimo jiné zjištění, že jak hlavní sirná sloučenina izolovaná ze shiitake (lenthionin), tak i kulinárně zpracované plodnice skutečně vykazují celou řadu pozitivních biologických vlastností a mohou být nositeli výše zmíněných zdravotních benefitů pozorovaných při pravidelné konzumaci této houby.

Klíčová slova: *Lentinula edode*s, shiitake, houževnatec jedlý, lenthionin, lentiniková kyselina.

SUMMARY

This thesis deals with a detailed study of sulfur compounds of the second most commonly grown mushroom in the world − shiitake (*Lentinula edodes*, Berk., Pegler). Shiitake is native to Japan and the first mention of it dates more than 2000 years ago. It is often described as a longevity elixir of life or the queen of mushrooms thank to its benefitial effects on human health (alleged or scientifically based). Regular consumption of shiitake helps reduce a high blood pressure and blood cholesterol levels, boosts immunity and prevents some types of cancer and allergies. Another good reason to consume this highly prized culinary mushroom is its typical delicate garlicky flavor and aroma. The characteristic scent of this mushroom is due to various sulfur compounds. Their common precursor is lentinic acid, a sulfur dipeptide that is cleaved by a sequence of successive enzymatically catalyzed reactions into a wide variety of biologically active sulfur compounds during disruption of the fungal tissue.

One of the main aims of this dissertation was the study of formation pathways that lead to biologically active sulfur compounds in shiitake mushrooms using modern analytical techniques (DART−HRMS, HPLC−HRMS, GC−MS), and its subsequent confirmation (or refutation) of the previously proposed pathways.

Another goal of this thesis was to test biological properties of the most important sulfur compound formed during culinary processing of this fungus − lenthionine (1,2,3,5,6-pentathiepane). The attention was focused on evaluation of its antimicrobial, anti-cancer and anti-inflammatory activity as well as its antioxidant properties. These assays were also performed with aqueous extracts of raw and culinary processed shiitake mushrooms (boiled, roasted, or dried).

Results described in this dissertation, among other things, revealed that both lenthionine and culinary processed fruiting bodies of shiitake exhibit a number of positive biological properties and may be holders of the aforementioned health benefits observed in connection with regular consumption of this fungus.

Key words: *Lentinula edodes*, shiitake, lenthionine, lentinic acid.

OBSAH

1. ÚVOD 1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED 3
2.1 KLASIFIKACE HOUŽEVNATCE JEDLÉHO 3
2.2 CHARAKTERISTIKA 3
2.2.1 Popis 3
2.2.2 Historické aspekty pěstování houževnatce jedlého 4
2.2.3 Kultivace 5
2.2.4 Produkce 5
2.2.5 Kulinářské úpravy 6
2.2.6 Shiitake jako přírodní lék 7
2.3 SENZORICKY AKTIVNÍ SLOUČENINY *LENTINULA EDODES* 8
2.3.1 Kyselina lentiniková 8
2.3.2 Enzymově katalyzovaný rozklad lentinikové kyseliny 10
2.3.3 γ-Glutamyltransferáza 11
2.3.4 C−S lyáza 13
2.3.5 Sirné sloučeniny 13
2.3.6 Ostatní sloučeniny 15
2.4. BIOLOGICKÉ VLASTNOSTI *LENTINULA EDODES* 15
2.4.1 Shiitake jako antioxidant 15
2.4.2 Antimikrobiální aktivita shiitake 18
2.4.3 Imunostimulační účinky 21
2.4.4 Protinádorová a antikarcinogenní aktivita 22
2.4.5 Hypolipidemická aktivita shiitake 23
2.4.6 Antidiabetická aktivita 25
2.4.7 Toxicita a vedlejší efekty shiitake 25
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE 27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 28
4.1 ZÍSKÁVÁNÍ VZORKU HOUŽEVNATCE JEDLÉHO 28
4.2 CHEMIKÁLIE 28
4.3 PŘÍSTROJE 30
4.4 ANALYTICKÉ METODY 31
4.5 IZOLACE SENZORICKY AKTIVNÍCH LÁTEK METODOU PŘÍMÉ EXTRAKCE 34
4.6 IZOLACE LENTINIKOVÉ KYSELINY 34
4.7 IZOLACE γ-GLUTAMYLTRANSFERÁZY A C−S LYÁZY 35
4.8 SYNTÉZA LENTHIONINU 36
4.9 MONITOROVÁNÍ ROZKLADU LENTINIKOVÉ KYSELINY 37
4.10 TEPELNÉ ÚPRAVY SHIITAKE A PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ 38
4.11 PŘÍPRAVA VODNÉHO EXTRAKTU Z ČERSTVÝCH PLODNIC SHIITAKE 39
4.12 TESTOVÁNÍ POTENCIÁLNÍHO CYTOTOXICKÉHO ÚČINKU NA BUNĚČNÝCH LINIÍCH HELA, PATU A HEPG2 40
4.12.1 Kultivace buněčných linií HeLa, PaTu a HepG2 40
4.12.2 Inkubace buněk na mikrotitrační destičce 40
4.12.3 Příprava expozičního roztoku pro testování lenthioninu 41
4.12.4 Ředění a multiplikace 41
4.12.5 MTT test 42
4.12.6 Časosběrná mikroskopie 43
4.12.7 Frakcionace vodného extraktu pomocí HPLC 44

4.13 TESTOVÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY 44
4.13.1 Mikrobiální kultury 44
4.13.2 Příprava živných bujónů a agarů 45
4.13.3 Podmínky kultivace 45
4.13.4 Mikrodiluční metoda 45
4.14 MĚŘENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY 46
4.14.1 Metoda DPPH 46
4.14.2 Metoda ABTS 47
4.15 MĚŘENÍ PROTIZÁNĚTLIVÉ AKTIVITY 47
5. VÝSLEDKY A DISKUZE 49
5.1 SIRNÉ LÁTKY VZNIKAJÍCÍ V HOUŽEVNATCI JEDLÉM 49
5.1.1 Identifikace hlavních těkavých sirných sloučenin *L. edodes* 49
5.1.2 Studium mechanismu tvorby sirných látek v houževnatci jedlém 51
5.2 SLEDOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY LENTHIONINU A VODNÝCH EXTRAKTŮ SHIITAKE 57
5.2.1 Cytotoxická aktivita lenthioninu a vodných extraktů shiitake 57
5.2.2 Antimikrobiální aktivita lenthioninu a vodných extraktů shiitake 69
5.2.3 Antioxidační aktivita lenthioninu a vodných extraktů shiitake 71
5.2.4 Protizánětlivá aktivita lenthioninu a vodných extraktů shiitake 75
6. ZÁVĚR 78
7. SEZNAM ZKRATEK 80
8. CITOVANÁ LITERATURA 83
9. SEZNAM PŘÍLOH 97

1. ÚVOD

„*Nemají pupeny, listy, ani květy… A přesto mají plody. Výborná potrava, dokonce lék. Dokonalý výtvor přírody.*“ (staré čínské přísloví)

Houby jsou svými příznivými účinky na lidský organismus známé po celá tisíciletí. Již od starověku byly využívány nejen jakožto poměrně dostupný a výživově hodnotný zdroj potravy, ale také pro své léčivé účinky – ať už k prevenci či k léčbě samotné – v tradiční asijské medicíně. Řada z nich proslavila japonskou a čínskou kuchyni po celém světě. Pokrmy asijské kuchyně totiž musí nejen příjemně vonět, mít výraznou a delikátní chuť (umami) a pěkně vypadat, ale zároveň by měly mít příznivý účinek na zdraví konzumenta (1). Čínská kuchyně je totiž velmi úzce spjata s tradiční čínskou medicínou a dokonce s filozofií. Existuje celá řada medicinálních hub, jež mají zdraví posilující, regulační či léčivé účinky na různé oblasti lidského organismu poškozeného nezdravým prostředím, dědičností či nevhodným životním stylem. Tento poklad čínské medicíny patří mezi nejstarší přírodní léčiva vůbec. Další nezpochybnitelnou výhodou užívání jedlých hub je poměrně nízké riziko nežádoucích účinků při jejich konzumaci, a to i při poměrně vysokém dávkování (2). Teprve v relativně nedávné době si tohoto téměř nevyužívaného zdroje biologicky aktivních látek povšimla i západní civilizace a odstartovala seriózní výzkum, v jehož rámci se objevování možností jejich maximálního využití stalo velkou výzvou.

Počet lidí využívajících alternativní či komplementární medicínu k posílení svého zdraví či jako doplňkovou léčbu ke konvenční medicíně rok od roku roste (3). V tradiční čínské medicíně je nyní využíváno preventivních a léčivých účinků více než 270 druhů hub (4), přičemž mezi čtyři nejpopulárnější patří shiitake (houževnatec jedlý, *Lentinula edodes*) (5). Přímo v Japonsku, odkud dle dostupných indicií pochází, je nejžádanější jedlou houbou (6) a podle tamějších obyvatel „doplňuje energii, vyživuje krev, rozpouští vlhkost a hlen“. Právě pro tyto účinky se hojně používá k terapii osteoporózy a revmatických chorob. Shiitake vykazuje, ostatně jako většina medicinálních hub, celou řadu dalších účinků na lidský organismus, ať už domnělých či vědecky podložených. Napomáhá posilovat imunitu, snižuje hladinu cholesterolu v krvi, působí protizánětlivě, antiviroticky a antibakteriálně.

Shiitake je hned po pečárce dvouvýtrusé (*Agaricus bisporus*) nejpěstovanější houbou, a zaujímá tak druhé místo v celosvětovém objemu produkce a spotřeby mezi

houbami. Vzhledem ke značnému hospodářskému významu této houby, jakož i jejím nesporným (a léty ověřeným) pozitivním účinkům na lidské zdraví, je tudíž s podivem, že je doposud známo pouze relativně málo metabolitů zodpovědných za její biologickou aktivitu.

Tato disertační práce je věnována studiu houževnatce jedlého, konkrétně studiu jeho biologicky a senzoricky aktivních sirných sloučenin, z nichž pouze velmi malá část byla dosud vědecky prozkoumána. Zdá se totiž poměrně pravděpodobné, že některé z nich mohou mít pozitivní účinky na lidské zdraví.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Klasifikace houževnatce jedlého

Houževnatec jedlý je po celém světě oblíbená a vysoce ceněná houba. Její lidový název shiitake je odvozen z japonských slov „*shii*“, což je výraz pro strom rodu *Pasania spp*. z čeledi bukovité (*Fagaceae*), a „*take*“, znamenající houba. Název shiitake je celosvětově nejpoužívanější, lze se však setkat i s výrazy odvozenými, jako jsou šii-také, šiitake či šitake. Ve Spojených státech amerických je běžně známa pod jménem „*black forest mushroom*“ (v překladu „černá lesní houba“), ve Francii jako „*lectin*“ a v Číně pod názvy „*xiang-gu*“ („vonná houba“), „*dong-gu*“ („zimní houba“) či „*hua-gu*“ („kvetoucí či pestrobarevná houba“) (7).

Lokálních výrazů pro tuto houbu je velké množství, což jen podtrhuje potřebu existence univerzálního názvu. Současným vědeckým výrazem pro ni je *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. Na základě makro i mikromorfologických studií i DNA rozborů byla *L. edodes* zařazena do rodu *Lentinula*, čeledi Marasmiaceae (špičkovité), řádu Agaricales (pečárkotvaré), třídy Agaricomycetes (stopkovýtrusé) a říše Fungi (houby) (8).

Po dlouhou dobu byla shiitake známa pod jménem *Lentinus edodes* (Berk.) Singer. V roce 1975 byla Peglerem přesunuta z rodu *Lentinus* do rodu *Lentinula*, a to na základě mikroskopických studií hyf. Původní označení *Lentinus edodes* se však stále i ve vědecké komunitě běžně používá (7). Další dříve užívaná vědecká synonyma jsou *Agaricus edodes* Berk., *Armillaria edodes* (Berk.) Sacc., *Collybia shiitake* J. Schröt., *Cortinellus shiitake* (J. Schröt.), *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Lentinus mellianus* Lohwag, *Lentinus tonkinensis* Pat., *Lepiota shiitake* (J. Schröt.) Tanaka, *Mastoleucomyces edodes* (Berk.) Kuntze či *Tricholoma shiitake* (J. Schröt.) Lloyd (8).

2.2 Charakteristika

2.2.1 Popis

L. edodes má v počátečních fázích růstu uzavřený klobouk hnědošedé barvy, který při pěstování v dobře osvětlených prostorách bývá zbarvený do červenohněda. Povrch klobouku je suchý, často pokrytý bílými či hnědými šupinami (obr. 1). Jeho okraj je podvinutý, zdobený zbytky plachetky, jejíž rezidua bývají patrná i na třeni. U starších plodnic je klobouk prohloubený a dosahuje průměru 7–8 cm. Lupeny jsou husté, světlé až

dožluta. Třeň je 4–7 cm dlouhý, 8–12 mm silný, masitý a velmi pevný, nahnědlé barvy, často s podélnými rýhami. Dužina *L. edodes* má jemně česnekovitou chuť (9).

Existuje více typů shiitake, dva nejznámější jsou *donko* a *koshin*. Více ceněný je (na aroma bohatší typ) *donko* neboli „zimní houba“, který má uzavřený masitější klobouk a snáze přečká i kruté zimy (obr. 1a). Typ *koshin* (obr. 1b), zvaný též „květinová houba“, má klobouk otevřený s od středu výrazně popraskaným povrchem, čímž připomíná květinu.

Obr. 1: Plodnice *L. edodes*: a) typ *koshin*, b) typ *donko*.

2.2.2 Historické aspekty pěstování houževnatce jedlého

První milník je spjat se jménem Wu San Kang, zemědělcem z provincie Zhejiang v Číně, který si na počátku 12. století povšiml velkých a chutných plodnic shiitake na popadaných stromech. Začal tedy stromy kácet, avšak k jeho zklamání houby na poražených stromech nerostly. Ve vzteku začal porážet další a k jeho údivu se na nich houby objevily ve velikém množství. Tato událost se stala počátkem tzv. metody šokem – kácení stromů a následné bití do polen se při pěstování shiitake používá dodnes. O sto let později předali čínští zemědělci své zkušenosti japonským obyvatelům, kteří shiitake pojmenovali a zasloužili se o její rozšíření směrem na východ.

Druhým milníkem v historii kultivace shiitake se stal rok 1936, kdy japonský zemědělec Kitajima přečistil a uchoval jednodruhovou nekontaminovanou houbovou

kulturu, použitelnou k inokulaci polen. Přístup k čisté kultuře dal kontrolu nad produkcí shiitake do rukou zemědělcům.

Za třetí milník je považováno objevení možnosti kultivace shiitake na pilinovém substrátu. V Číně lze tuto metodu vysledovat až k 70. létům 20. století, čímž se otevírá možnost pěstování shiitake v mnohem větším měřítku, než je možné na polenech (7, 10).

2.2.3 Kultivace

Shiitake patří mezi saprofytické houby tzv. bílého hnití, které degradují dřevinné substráty obsahující jinak těžko rozložitelný lignin. Díky těmto schopnostem se kmeny stromů či piliny mohou využívat jako substráty pro pěstování této houby (7, 11).

Shiitake mohou být pěstovány na přírodních polenech i synteticky. Umělý způsob spočívá v jejich pěstování na směsi z pilin, případně doplněných o proso či otruby. Tímto způsobem produkce lze dosáhnout 3–4× větších výnosů, a to za pouhou desetinu doby v porovnání s původním postupem (10). Shiitake se pěstují v ekologických domech (ať už přirozeně nebo uměle) umožňujících úpravu vlhkosti, teploty a světla tak, aby byly výtěžky maximální. Udržování ideálních podmínek pro jejich růst je samozřejmě finančně náročnější než kultivace ve volné přírodě, ale vysoký výtěžek, výrazně zkrácená doba (potřebná na kompletní životní cyklus plodiny) a možnost celoroční dodávky hub tuto ztrátu bohatě vynahradí.

Pěstování shiitake na polenech v lese vyžaduje méně práce a péče, takové plodnice jsou zároveň více aromatické a mají silnější klobouk. Přirozená kultivace má také výrazně menší negativní vliv na životní prostředí a navíc shiitake pěstované na polenech obsahují mnohem více polysacharidů, včetně lentinanu (**II**) (obr. 9) – polysacharidu s významnými protinádorovými vlastnostmi, než shiitake pěstované na umělém substrátu (12).

2.2.4 Produkce

Světové produkci hub stále více dominují druhy, které mají kromě atraktivních senzorických vlastností a dobré stravitelnosti i léčivé účinky. *L. edodes* je (z hlediska celosvětové produkce) druhá nejvýznamnější jedlá houba (hned po *Agaricus bisporus*). Kromě skvělé chuti a lákavého aroma je její konzumace spojena s celou řadou pozitivních biologických vlastností. Ačkoli je kultivace shiitake známa několik století, v potravinářském průmyslu se její produkce začala masivněji prosazovat až v Japonsku po druhé světové válce. Po dlouhou dobu pak bylo Japonsko největší světový producent této

houby, následované Čínou, Tchai-wanem a Jižní Koreou. V roce 1974 dosáhla celková produkce shiitake 143 000 tun, přičemž Japonsko se na ní podílelo téměř 95 %. Ještě v roce 1983 zajišťovalo Japonsko více než 82 % celkové světové produkce shiitake, zatímco produkce v Číně v této době představovala pouze 9 %. Ovšem během následujících čtyř let pěstování *L. edodes* v Číně převýšilo produkci v Japonsku a od té doby je Čína největším světovým producentem, spotřebitelem i exportérem této houby. Např. v roce 2002 byly v Číně vypěstovány 2 miliony tun shiitake (v témže roce dosáhla celosvětová produkce úctyhodných 7,5 milionu tun shiitake) (7, 10).

Kultivace *L. edodes*, původně omezená oblastí severovýchodní Asie, se postupně rozšířila i do Spojených států amerických, Kanady, Austrálie, Brazílie i mnoha evropských zemí. Vzhledem k jejím kulinářským a léčebným kvalitám bude zřejmě tento trend pokračovat i v mnoha dalších státech (13). V Jižní Koreji, stejně jako v Japonsku, převažuje způsob pěstování shiitake na polenech, tedy přirozeným způsobem. Na druhou stranu se v Číně, jakožto hlavním producentu shiitake, využívá především kultivace na pilinách (13).

2.2.5 Kulinářské úpravy

V dřívějších dobách nebyly houby konzumovány jako součást běžného jídla, ale jakožto lahůdky s přitažlivou chutí a vůní se často přidávaly do pokrmů formou koření. Římané blahořečili houby jako pochoutky bohů a Číňané je považovali za elixír života (14).

Shiitake se pyšní velmi lahodnou kořeněnou chutí a výrazným aroma. Má všestranné využití především v orientální (ale nyní i evropské) kuchyni a z výživového hlediska jde o velmi cennou potravinu. Díky své nízké energetické hodnotě a vysokému obsahu řady výživově cenných látek, polysacharidů, bílkovin, vitaminů a stopových prvků je zvláště vhodná i při redukčních, makrobiotických, vegetariánských nebo veganských dietách.

Mezi shiitake rostoucími na polenech (ať už pěstovanými či volně rostoucími v lese) a na pilinových substrátech jsou rozdíly nejen v obsahu živin, ale i v intenzitě aroma. Z obou srovnání vychází vítězně plodnice kultivované přirozeně na polenech (15).

Důvodem charakteristické umami chuti shiitake je především glutamát sodný spolu s 5′-nukleotidy, volnými aminokyselinami, organickými kyselinami, cukry a

nízkomolekulárními proteiny, jejichž vzájemný poměr je důvodem poměrně variabilní chuti shiitake (15).

V České republice lze shiitake zakoupit v mnoha běžných potravinových řetězcích, a to čerstvé, sušené či ve formě prášku. Ke konzumaci se využívají téměř výhradně pouze plodnice, které lze upravit všemi tradičními způsoby – lze je vařit, dusit, smažit, pražit, fritovat, grilovat, zapékat a dokonce i udit či nakládat (obr. 2) (16, 17).

Obr. 2: Shiitake a) vařené b) smažené c) pečené d) fritované.

2.2.6 Shiitake jako přírodní lék

Svými léčivými účinky na lidské zdraví jsou shiitake proslulé. Stará japonská legenda hovoří o tom, že tamější divoce žijící opice nikdy netrpěly rakovinou, vysokým krevním tlakem a ani diabetem, neboť pravidelně jedly plodnice houževnatce jedlého (16). V dobách dynastie Ming (1368−1644) lidé věřili, že je konzumace shiitake udrží vitální a mladé. Bylo dokonce nařízeno, že tento „elixír života“ smí konzumovat pouze císař a jeho rodina a jejich sběr byl střežen vybranými samuraji. V této době se shiitake

nazývaly potravou císařů (16, 18). Ze 17. století jsou dochovány záznamy týkající se shiitake, kde se uvádí, že „zvyšují životní energii, odhánějí hlad a léčí nachlazení“ (15).

Shiitake patří mezi téměř ideální součást lidské stravy, protože jsou cennými zdroji bílkovin, minerálních látek i vlákniny a obsahují jen málo tuku a jednoduchých sacharidů. Nadto tato asijská houba obsahuje velké množství nejrůznějších zdraví prospěšných látek.

Houževnatec jedlý obsahuje v čerstvém stavu přibližně 90 % vody; zastoupení hlavních živin v sušených shiitake je uvedeno v tab. 1.

Ve vodě rozpustné polysacharidy činí 1–5 % sušiny houby shiitake, jedná se zejména o různé (1-4)- a (1-6)-α-D-glukany, heterogalaktany, heteromannany či xyloglukany. Volné mastné kyseliny tvoří kolem 3 % z celkového množství lipidů, přičemž nejvyšší zastoupení má kyselina linolová (73 rel. %) a kyselina palmitová (15 %).

Tab. 1: Průměrný obsah hlavních živin, vody a energie ve 100 g sušených shiitake.

	proteiny	lipidy	sacharidy	voda	energie (kJ)
obsah	22,8 g	2,1 g	64,4 g	4,7 g	1721

Shiitake též obsahují řadu vitaminů (mezi nejhojněji zastoupené patří vitaminy B_1, B_2, B_3, C a D_2), jakož i minerálních látek (např. K, Ca, Mg, P, Cd, Zn, Cu, Fe, Mn či Ni) (15, 16, 19, 20).

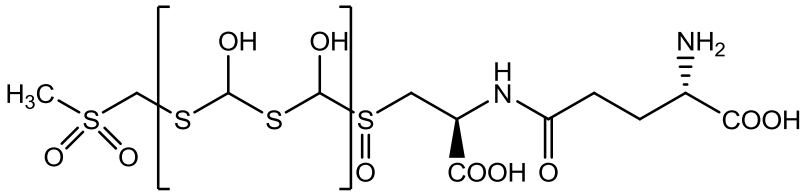
K léčebným účelům se do pokrmů přidávají čerstvé či sušené plodnice, přičemž doporučená denní dávka zpravidla činí 60−160 g čerstvých (což odpovídá 6−16 g sušených) shiitake (17).

2.3 Senzoricky aktivní sloučeniny *Lentinula edodes*

2.3.1 Kyselina lentiniková

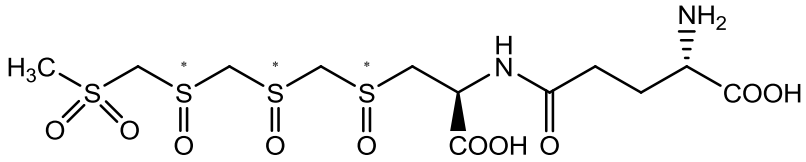
Čerstvé i sušené plodnice *L. edodes* mají jen lehce česnekovité, nevýrazné aroma. Vůně pro shiitake typická se uvolní až po rozmačkání čerstvých či po namočení sušených plodnic. Yasumoto a kol. (21) tento jev vysvětlili existencí netěkavého prekurzoru, který se při narušení buněk pletiva houby enzymaticky rozkládá za vzniku látek zodpovědných za výrazné aroma této houby. Tento netěkavý prekurzor byl poté skutečně izolován, a to extrakcí methanolem, opakovanou iontově výměnnou chromatografií a následnou krystalizací. Izolovaná látka byla pojmenována triviálním názvem lentiniková kyselina.

Jedná se o bílou krystalickou sloučeninu s bodem tání 157−158 °C, relativní molekulovou hmotností 482,6 Da a sumárním vzorcem $C_{12}H_{22}N_2O_{10}S_4$. Hydrolytické štěpení této látky odhalilo její dipeptidovou strukturu sestávající z glutamové kyseliny a *S*-substituovaného derivátu cysteinsulfoxidu. Enzymově katalyzovaným štěpením byla potvrzena L-konfigurace na *α*-uhlících obou aminokyselin. Struktura lentinikové kyseliny navržená Yasumotem a kol. je uvedena na obr. 3 (21), přičemž autoři poznamenali, že část uvedená v hranatých závorkách je pouze spekulativní.



Obr. 3: Struktura lentinikové kyseliny navržená Yasumotem a kol. (21).

Na stanovení přesné struktury tohoto dipeptidu, konkrétně části uvedené v hranaté závorce, bylo třeba počkat ještě dalších pět let. Teprve v roce 1976 byla struktura lentinikové kyseliny určena správně, díky čemuž tato látka mohla být pojmenována také systematickým názvem, který zní 2-(*γ*-glutamylamino)-4,6,8,10,10-pentaoxo-4,6,8,10-tetrathioundekanová kyselina (obr. 4). Ovšem absolutní konfigurace třech sulfoxidových skupin lentinikové kyseliny zůstává i v současnosti stále neznámá (22).



Obr. 4: Struktura lentinikové kyseliny navržená Höflem a kol. (22).

Není bez zajímavosti, že kromě shiitake byla lentiniková kyselina objevena také v několika dalších druzích stopkovýtrusých hub, a to v zástupcích rodů *Micromphale* a *Collybia* (23). Konkrétně se jedná o *Micromphale perforans* (Hoffm.) Antonín & Noordel. (špička provrtaná, obr. 5a), *Collybia hariolorum* (Bull.) Quél. (penízovka věštecká, obr. 5b), *Micromphale foetidum* (Sowerby) Singer (špička odporná, obr. 5c), *Collybia impudica* (Fries) Singer (penízovka nestoudná, obr. 5d) a *Micromphale cauvetii*

(Maire & Kühner) ex Hora (penízovka smrdutá, obr. 5e). Ve všech těchto (nejedlých) houbách drobného vzrůstu byla detekována lentiniková kyselina spolu s jedním ze svých diastereomerů lišícím se absolutní konfigurací na některé ze tří chirálních sulfoxidových skupin. Tento stereoizomer byl pojmenován epilentiniková kyselina (23).

Obr. 5: a) *Micromphale perforans*, b) *Collybia hariolorum*, c) *Micromphale foetidum*, d) *Collybia impudica*, e) *Micromphale cauvetii*.

2.3.2 Enzymově katalyzovaný rozklad lentinikové kyseliny

Na počátku 80. let minulého století bylo zjištěno, že obsah lentinikové kyseliny v extraktu z homogenizovaných shiitake klesá, zatímco se rozvíjí výrazné houbové aroma. Tento inverzní vztah mezi obsahem lentinikové kyseliny a intenzitou shiitake aroma naznačuje, že během narušení pletiva *L. edodes* dochází k rozkladu lentinikové kyseliny, jehož výsledkem je vytvoření lenthioninu (**III**), hlavní aromatické složky shiitake, a dalších sirných sloučenin (obr. 6) (24).

Tvorbu senzoricky aktivních aromatických sloučenin lze rozdělit do dvou hlavních fází. Úvodním krokem je rozklad lentinikové kyseliny katalyzovaný nejprve *γ*-glutamyltransferázou (GGT) za vzniku deglutamyllentinikové kyseliny a poté její rozklad *S*-alkylcysteinsulfoxid lyázou (C−S lyázou) na kyselinu pyrohroznovou, amoniak

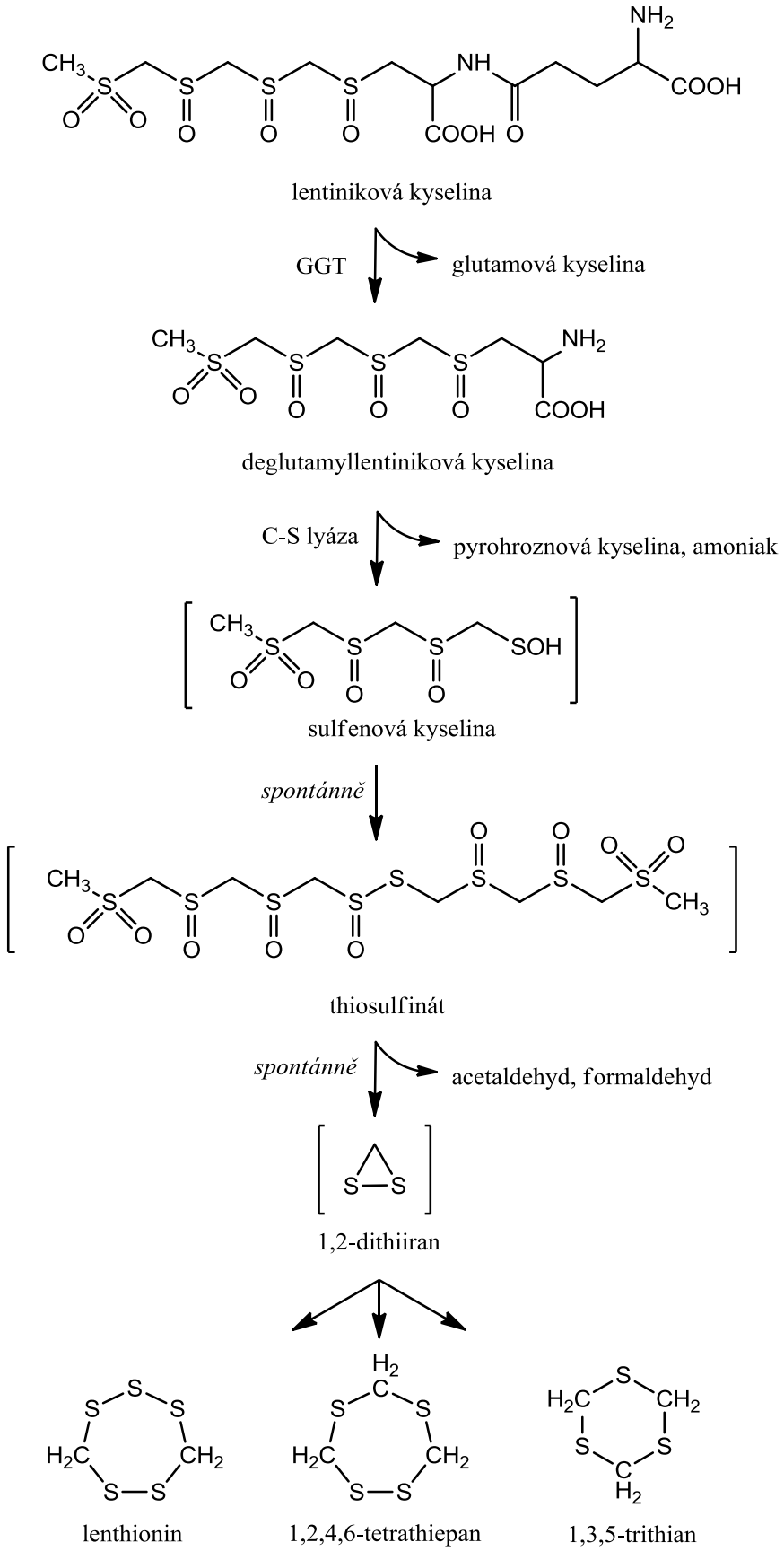
a 1,2-dithiiran (24, 25). Kyseliny glutamová, pyrohroznová, amoniak a rozličné sirné sloučeniny byly při rozkladu lentinikové kyseliny detekované již v roce 1975 (25).

Druhým krokem by měla být spontánní polymerizace nestabilního 1,2-dithiiranu na široké spektrum cyklických i lineárních sirných sloučenin (23, 26, 27). Celé schéma je naznačeno na obr. 6. Navržený mechanismus se nápadně podobá tvorbě allicinu z allinu v česneku (28). Nicméně výše popsaný mechanismus pro enzymově katalyzovaný rozklad lentinikové kyseliny dosud nebyl potvrzen detekcí žádného ze sirných meziproduktů (např. thiosulfinátu nebo 1,2-dithiiranu) a zřejmě i velká část výsledných sirných metabolitů zůstává stále utajena.

2.3.3 *γ*-Glutamyltransferáza

γ-Glutamyltransferáza (GGT, EC 2.3.2.2) je extracelulární enzym organismů, který katalyzuje odstranění *γ*-glutamylové části z glutathionu či jiných *γ*-glutamylových sloučenin a následně pak její přenesení na aminokyseliny či peptidy (29). Tento enzym se u shiitake vyskytuje v největším množství pod povrchem klobouků plodnic. Při narušení pletiva houby se nastartuje reakce přeměny lentinikové kyseliny na deglutamyl-lentinikovou kyselinu. Po této reakci následuje rozklad deglutamyllentinikové kyseliny katalyzovaný C−S lyázou za vzniku celé řady cyklických sirných sloučenin, doprovázený rozvinutím typického česnekového aroma (30). Bylo zjištěno, že odstranění *γ*-glutamylové části z kyseliny lentinikové je nejpomalejší proces ve výše popsaném sledu reakcí vedoucích k tvorbě sirných senzoricky aktivních sloučenin (27).

Také u shiitake má GGT dvě různé funkce. První je katalýza hydrolýzy *γ*-glutamylové části lentinikové kyseliny, vedoucí ke vzniku deglutamyllentinikové kyseliny. Druhou funkcí je katalýza transpeptidázové reakce (30). GGT přítomná v plodnicích *L. edodes* je složena ze dvou podjednotek o relativních molekulových hmotnostech 28, resp. 60 kDa (31). Optimální hodnota pH pro její enzymovou aktivitu byla stanovena na pH 9,0 (27).



Obr. 6: Enzymově katalyzovaný rozklad lentinikové kyseliny (34).

2.3.4 C−S lyáza

C−S lyáza (EC 4.4.1.4) je druhým z enzymů, za jehož katalýzy vznikají ze senzoricky neutrální lentinikové kyseliny výrazně senzoricky aktivní lineární i cyklické sirné sloučeniny. Skládá se ze dvou identických podjednotek o velikosti 46 kDa (32). Předpokládá se, že se tento enzym účastní tvorby sulfenové kyseliny z kyseliny deglutamyllentinikové, jak je naznačeno na obr. 6. Tato sulfenová kyselina pravděpodobně vzápětí velmi rychle kondenzuje za vzniku příslušného thiosulfinátu (ačkoliv jeho tvorba nebyla doposud potvrzena). Vedlejšími produkty této reakce jsou kyselina pyrohroznová a amoniak. Další kroky vedoucí k tvorbě sirných heterocyklických sloučenin jsou pravděpodobně již spontánní, tedy probíhají bez přispění dalších enzymů. Optimální hodnota pH pro enzymovou aktivitu C−S lyázy byla stanovena na pH 8,7 (33).

2.3.5 Sirné sloučeniny

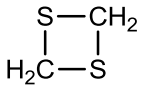
Nezaměnitelné aroma shiitake se rozvine až při namočení sušených shiitake do vlažné vody nebo při krájení či jiném způsobu homogenizace čerstvých hub, což velmi úzce souvisí s enzymově katalyzovaným rozkladem lentinikové kyseliny vedoucím k tvorbě mimořádně pestré škály sirných sloučenin (obr. 6). Jak již bylo uvedeno, při spontánním rozkladu 1,2-dithiiranu vzniká celá řada lineárních i cyklických sirných sloučenin, z nichž nejvýznamnější jsou zakresleny na obr. 7. Tyto dosud známé těkavé sirné sloučeniny lze rozdělit podle počtu uhlíků na jednouhlíkaté, dvouuhlíkaté, tříuhlíkaté a šestiuhlíkaté. Dvouuhlíkaté a tříuhlíkaté mohou být jak cyklické, tak i lineární. Mezi tři nejvýznamnější aromatické sirné sloučeniny (obvykle vznikající až v pozdějších fázích po homogenizaci) patří 1,2,4-trithiolan, 1,2,4,5-tetrathian a zejména 1,2,3,5,6-pentathiepan (15, 35). Poslední z těchto cyklických sloučenin byla triviálně pojmenována lenthionin (**III**) a je ze všech dosud popsaných těkavých sirných látek *L. edodes* nejvýznamnější (obr. 7) (36). Obsah lenthioninu ve zpracovaných plodnicích bývá velmi vysoký (až 100 ppm), přičemž závisí na mnoha faktorech, zejména na obsahu lentinikové kyseliny a způsobu zpracování (24).

1C:

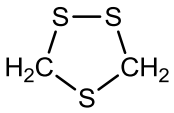
CH_3SH	$HSCH_2SH$	CH_3SSH	CS2
methanthiol	hydrogen(methyl)disulfid	methandithiol	sirouhlík

2C:

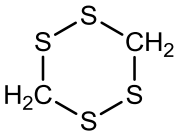
CH_3SSCH_3	CH_3SSSCH_3	$CH_3SSSSCH_3$	CH_3SCH_2SSH
dimethyldisulfid	dimethyltrisulfid	dimethyltetrasulfid	methylthiomethyl-(hydrogen)disulfid



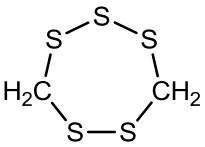
1,3-dithietan



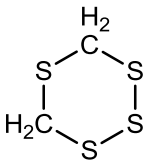
1,2,4-trithiolan



1,2,4,5-tetrathian



lenthionin

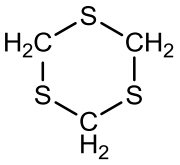


1,2,3,5-tetrathian

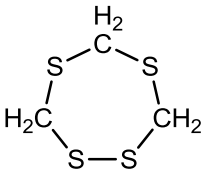
3C:

$CH_3SSCH_2SSCH_3$

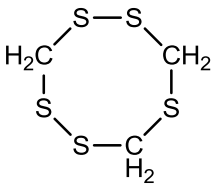
2,3,5,6-tetrathiaheptan



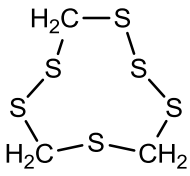
1,3,5-trithian



1,2,4,6-tetrathiepan



1,2,4,5,7-pentathiokan



1,2,3,5,6,8-hexathionan

6C:

$CH_3SSCH_2SCH_2CH_2SCH_2SSCH_3$

2,3,5,8,10,11-hexathiadodekan

Obr. 7: Struktura sekundárních sirných metabolitů identifikovaných v shiitake (26).

2.3.6 Ostatní sloučeniny

Čerstvé, mechanicky nenarušené plodnice vykazují jenom poměrně nevýrazné houbové aroma, za které jsou primárně zodpovědné zejména okt-1-en-3-ol, okten-2-ol a oktan-1-ol spolu s ethyl-acetátem (35). Tyto osmiuhlíkaté alkoholy pravděpodobně vznikají oxidací linolenové kyseliny, obdobně jako je tomu v ostatních druzích hub.

Samostatnou a nyní velmi pozorně sledovanou kapitolou je také abnormálně vysoký obsah formaldehydu v sušených plodnicích shiitake. Ačkoli je formaldehyd běžným produktem metabolismu a je též přítomen v mnoha kosmetických produktech i v celé řadě potravin (především v sušených a mražených) (37), jedná se o mutagen a potenciální karcinogen, který působí toxicky především v oblasti dýchacích cest. Obsah tohoto aldehydu v potravinách je v mnoha státech monitorován − např. v USA je maximální tolerovatelný denní příjem limitován hodnotou 0,2 mg/kg tělesné hmotnosti (38). V sušených plodnicích *L. edodes* byly zaznamenány mimořádně vysoké koncentrace (119−494 mg/kg) formaldehydu (39). V čerstvých shiitake je obsah formaldehydu výrazně nižší, přičemž jeho obsah závisí především na způsobu pěstování hub. Nejnižší obsah byl zaznamenán u shiitake pěstovaných ve skleníku (15 mg/kg), nejvyšší pak v případě přikrytí substrátu půdou (22 mg/kg). Při pěstování shiitake nebyly (co se obsahu formaldehydu týká) monitorovány statisticky významné rozdíly při použití pilinových substrátů z různých druhů dřevin ani při pěstování různých odrůd shiitake (40).

2.4. Biologické vlastnosti *Lentinula edodes*

2.4.1 Shiitake jako antioxidant

Během oxidačních reakcí se často tvoří volné radikály, které následně mohou nastartovat sled reakcí, jež končí odumřením buňky. Antioxidanty tento sled reakcí mohou ukončit odstraněním reaktivních radikálových meziproduktů a inhibovat další oxidační reakce tím, že se samy oxidují. Nadměrná produkce volných radikálů a peroxidace lipidů *in vivo* jsou známé příčiny stárnutí a celé řady dalších onemocnění, jako jsou např. ateroskleróza, cukrovka, rakovina, cirhóza či chronické záněty (42, 43). Konzumace potravin bohatých na látky s antioxidační aktivitou tedy působí blahodárně na zdraví organismu.

Přírodní produkty proti stárnutí se často využívají také jako podpůrné prostředky v lékařství (např. v onkologii a imunologii) či ve farmaceutickém a kosmetickém

průmyslu. I vyšší houby mohou být bohatým zdrojem bioaktivních metabolitů vykazujících antioxidační aktivitu (44). Dosud bylo navrženo několik mechanismů, jimiž mohou metabolity hub působit proti oxidačnímu stresu. Jedná se o: a) přímý antioxidační efekt k udržení takové úrovně antioxidantů, která je nutná k prevenci produkce volných radikálů, b) nepřímý antioxidační efekt pomocí vyvolání a následné regulace enzymů hostitelského obranného systému (např. SOD nebo GPx) nebo c) eliminaci již vytvořených radikálů (5). Předpokládá se, že látky s antioxidační aktivitou obsažené v shiitake zřejmě kombinují všechny tyto typy mechanismů (45, 46).

V roce 2003 byl poprvé vědecky podložen vztah mezi antioxidační aktivitou a celkovým obsahem fenolických látek v methanolových a vodných extraktech ze shiitake, ačkoli se v tomto případě bezpochyby antioxidační aktivita zvyšovala i díky přítomnosti *β*-karotenu a tokoferolů používaných k analýze (46). Stejná pracovní skupina se později zabývala i peroxidací lipidů (resp. její terminací). Autoři zjistili, že nízkomolekulární frakce z vodného extraktu shiitake vykazovala nejvyšší aktivitu proti peroxidaci lipidů. Nebylo překvapením, že ve stejné nízkomolekulární frakci byl nalezen také nejvyšší obsah fenolických látek (45).

Vztahem mezi tepelnou úpravou hub shiitake, jejich antioxidační aktivitou a obsahem polyfenolů se v roce 2006 zabývali Choi a spol. (47). Syrové houby zahřívali v autoklávu při různých teplotách a po různou dobu a následně metodami hodnotícími eliminaci syntetických radikálů, a to DPPH [využívá stabilní radikál 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl] a ABTS [využívá 2,2′-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát), který případný antioxidant zháší], testovali jejich antioxidační aktivitu. Celkový obsah fenolických látek v shiitake vzrůstal spolu s rostoucí teplotou i dobou, po kterou byly houby v autoklávu umístěny. Stejná přímá úměra byla prokázána i ve vztahu k antioxidační aktivitě. Nabízí se vysvětlení, že při tepelné úpravě dochází k popraskání buněčných stěn, díky čemuž se polyfenoly z buněčného pletiva oproti čerstvým tepelně neopracovaným shiitake snáze vyluhují. Další možností je tepelný rozklad polyfenolických látek a současně vytvoření nových sloučenin majících ještě vyšší antioxidační aktivitu (47, 48).

V roce 2007 byla testována antioxidační aktivita extraktů ze shiitake získaných za pomoci různých organických rozpouštědel. Opět byla použita metoda DPPH a testovaný dichlormetanový extrakt antioxidační aktivitu jednoznačně vykazoval (49).

Většina studií zaměřených na prozkoumání antioxidační aktivity shiitake monitoruje vlastnosti extraktů (vodných či získaných organickými rozpouštědly) nebo

skupiny látek, nikoli konkrétní sloučeniny. Strukturu některých látek vykazujících antioxidační aktivitu se ale již podařilo přesně určit. Z fenolických sloučenin jsou to např. *p*-hydroxybenzoová kyselina (50), 3,4-dihydroxybenzoová kyselina (50, 51), gallová kyselina (51), skořicová kyselina (50), katechin (51) či γ-tokoferol (44).

Farmakologický efekt podávání polysacharidické frakce ze shiitake byl také testován *in vivo* na myších. Výsledky měření prokázaly významné zvýšení antioxidační enzymové aktivity. Podávání této frakce prokazatelně snížilo nárůst oxidativního stresu vyvolaného na tuky bohatou stravou (52).

Na myších byly též testovány antioxidační vlastnosti methanolového extraktu z *L. edodes*. Byl jim podáván paracetamol, který působí (ve vyšším než doporučeném množství) toxicky na jaterní buňky, a jedné skupině myší následně i extrakt ze shiitake. Ze studie lze vyčíst, že extrakty ze shiitake mohou ochránit jaterní buňky před jejich poškozením paracetamolem právě díky antioxidační aktivitě, neboť škodlivé efekty u testované skupiny myší byly podstatně nižší než u skupiny kontrolní (53).

Shiitake je tedy prokazatelně významným zdrojem látek s antioxidační aktivitou. Konzumace shiitake vykazuje významné pozitivní účinky na lidské zdraví, ať už jako antioxidant nebo jako součást prevence proti patologickým změnám, čehož využívá nepřeberné množství firem vyrábějících výživové doplňky (obr. 8) (5).

Obr. 8: Komerční produkty ze shiitake deklarující antioxidační aktivitu.

2.4.2 Antimikrobiální aktivita shiitake

Antimikrobiální účinky zahrnují aktivitu antibakteriální, antimykotickou, antiparazitickou a antivirální. Nejrůznější organické i vodné extrakty *L. edodes* vykazují široké spektrum antimikrobiálních vlastností. Bylo prokázáno, že působí proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, kvasinkám, houbám, dermatofytům a fytopatogenům (54).

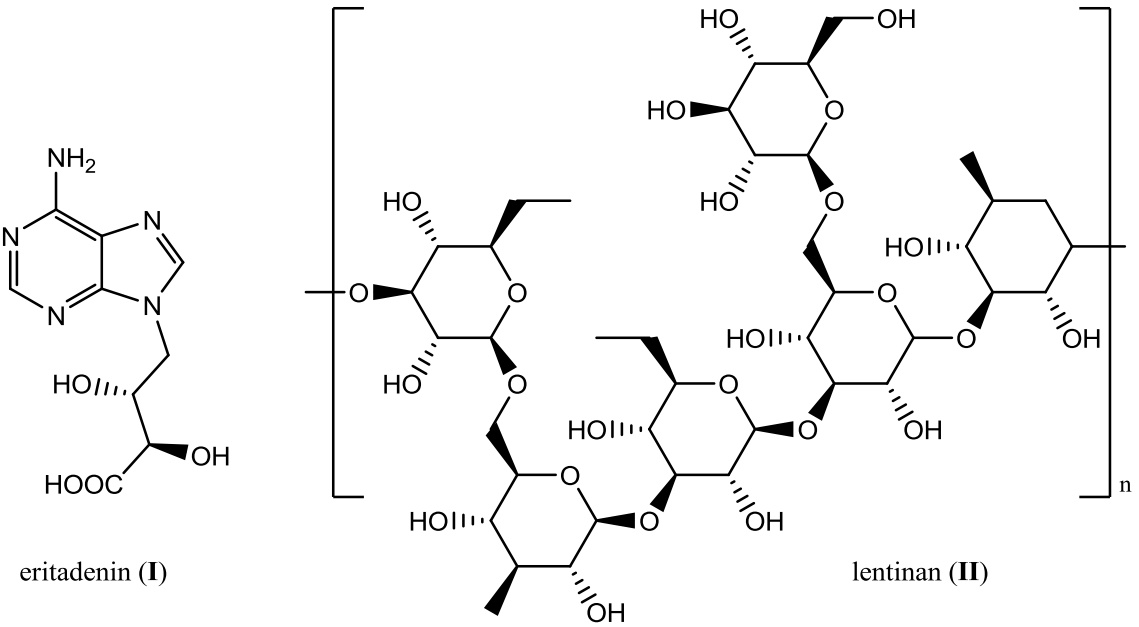
Antivirální vlastnosti

Goulet a spol. byli mezi prvními, kteří poukázali na antivirální látky vyskytující se v houbách (55). Že proti běžné chřipce působí konzumace *L. edodes*, lidé věřili celá staletí. Teprve nedávno však byly tyto domněnky potvrzeny také vědecky. Shiitake vykazuje vyšší aktivitu proti chřipce než např. amantadin hydrochlorid, což je běžná složka léčiv proti chřipce (15, 56). Nejefektivnější extrakt byl získán ze spor hub, nikoli z plodnic či mycelia (57). Předpokládá se, že antivirální aktivita tohoto extraktu je důsledkem přítomnosti dvoušroubovice RNA pocházející z částic podobných viru (58, 59). Tato molekula RNA zvyšuje produkci interferonů, glykoproteinů produkovaných především buňkami imunitního systému, které se podílejí na antivirové odpovědi imunitního systému (60). Dosud byly popsány tři různé tvary těchto viru podobných částic – vláknité, tyčinkovité a kulovité (61). Kulovité a vláknité částice se podařilo přečistit a následně bylo zjištěno, že jejich přítomnost rapidně zvyšuje produkci interferonů v ledvinových buňkách králíků *in vitro* (62). Částice kulovitého tvaru jsou ještě efektivnější v boji proti virovým onemocněním a významně snižují úmrtnost myší napadených některými typy virů (59) a dokonce i nádory (63). Bylo zjištěno, že extrakt z houževnatce působí dokonce i proti virům dětské obrny (54).

Pravděpodobně nejprozkoumanějším antivirotikem ze shiitake je polysacharid lentinan (**II**) (obr. 9). Lentinan a jeho deriváty jsou účinné proti nejrůznějším druhům virálních infekcí, dokonce dokáží výrazně zpomalit výskyt symptomů doprovázejících onemocnění AIDS (64). Důležitá úloha lentinanu spočívá v mobilizaci protilátek v organismu, kde dokáže potlačit i bakteriální infekce odolné vůči běžným antibiotikům (65). Mnoho pacientů s AIDS či rakovinou umírá v důsledku infekce vedoucí ke kolapsu imunitního systému, proto je důležité je před infekcemi chránit (66, 67). Azidothymidin (antiretrovirotikum, které brání množení viru HIV v napadeném organismu) v kombinaci s lentinanem vykazuje násobně vyšší účinnost v boji proti propuknutí nemoci AIDS než

bez něj. Lentinan navíc pomáhá inhibovat replikaci HIV viru a buněčnou fúzi (65, 68). Též byly zkoumány účinky sulfatovaného lentinanu a dalších polysacharidů z houževnatce jedlého, které se v boji proti HIV také velmi osvědčily (69).

Neméně důležitými antivirálními složkami shiitake jsou např. LEM [extrakt z mycelia *L. edodes*, složený ze 44 % sacharidů (převážně xylosy, arabinosy a glukosy) a 25 % proteinů (70, 71, 72)], který velmi účinně působí proti infekci herpes viru, osvědčil se ale také i při léčbě AIDS, neboť stejně jako lentinan (**II**) zabraňuje infekci T-lymfocytů, čímž zesiluje účinky azidothymidinu. Mechanismus působení extraktu z mycelia shiitake není dosud zcela známý, ale je velmi pravděpodobné, že aktivuje makrofágy a stimuluje produkci IL-1 (68). Z mycelia *L. edodes* byla získána celá řada dílčích frakcí i individuálních sloučenin, které si antivirotické vlastnosti pozorované u LEM zachovaly. Zmínit lze např. JLS-18 (ve vodě rozpustný extrakt LEM), který je významný při léčbě hepatitidy B i AIDS, navíc působí proti herpes viru (64, 65, 73), EP3 a EPS4, což jsou ve vodě rozpustné ligniny mající též antivirální efekt (64, 73), či KS-2, *α*-mannanový peptid, který pacientovi poskytuje díky zvýšené aktivitě interferonů ochranný i léčebný efekt (74). Další zdraví prospěšnou látkou v houbách shiitake (opět izolovanou z mycelia) je eritadenin (**I**) (obr. 9), který též vykazuje vysoké antivirální vlastnosti, které se využívají např. v boji proti AIDS (1, 75).



eritadenin (**I**) lentinan (**II**)

Obr. 9: Biologicky aktivní sloučeniny *L. edodes* − eritadenin (**I**) a lentinan (**II**).

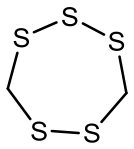
Antimykotické vlastnosti

Nejznámější z antifungicidních látek izolovaných z plodnic *L. edodes* je lentin. Tento protein inhibuje růst houbových mycelií různých druhů hub, např. *Physalospora piricola*, *Botrytis cinerea* a *Mycosphaerella arachidicola*. Nadto inhibuje HIV-1 reverzní transkriptázu a proliferaci leukemických buněk (76).

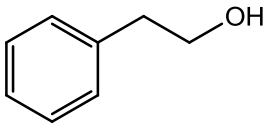
Další významnou sloučeninou *L. edodes* je lenthionin (**III**) (obr. 10), u kterého se podařilo již v 70. letech 20. století prokázat antifungicidní aktivitu vůči *Glomerella cingulata*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* a *Trichophyton rubrum* (77).

Antibakteriální vlastnosti

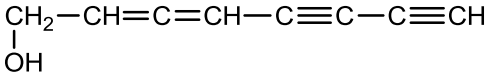
Vzhledem k neustále se zvyšující rezistenci bakteriálních kmenů vůči běžně používaným antibiotikům se objev antibakteriálních schopností shiitake zdál být velmi slibný. Ze všech biologických vlastností *L. edodes* je tato oblast nejdéle (a zřejmě i nejlépe) prozkoumána. Nejvýznamnější sloučeninou houževnatce jedlého vykazující antibakteriální aktivitu je bezesporu lenthionin (**III**). Ten byl již v 70. letech 20. století testován na antimikrobiální vlastnosti nejen vůči nižším houbám, ale i vůči řadě bakterií (např. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* či *Proteus vulgaris*). Lenthionin proti všem těmto bakteriálním kmenům aktivitu vykazoval (77, 78). Ještě silnější antibakteriální efekt vůči *B. subtilis*, *S. aureus* a *E. coli* byl zaznamenán u jiné polysirné sloučeniny – u bis[(methylsulfonyl)methyl]disulfidu (**VI**) (obr. 10) (79). S pozitivními výsledky byl v relativně nedávné době testován na antimikrobiální aktivitu také celkový extrakt LEM, a to ve vztahu k *B. subtilis* (80), *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* a *Bacillus megaterium* (79). Látkou zodpovídající za inhibici výše uvedených bakteriálních kmenů byl opět lenthionin (79). Mezi další sloučeniny s antimikrobiálními vlastnostmi izolované z *L. edodes* patří také 2-fenylethanol (**IV**) a lentinamicin (**V**) (obr. 10) (80).



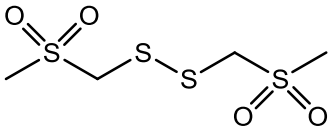
lenthionin (**III**)



2-fenylethanol (**IV**)



lentinamicin (**V**)



bis[(methylsulfonyl)methyl]disulfid (**VI**)

Obr. 10: Biologicky aktivní sloučeniny *L. edodes* – lenthionin (**III**), 2-fenylethanol (**IV**), lentinamicin (**V**) a bis[(methylsulfonyl)methyl]disulfid (**VI**).

2.4.3 Imunostimulační účinky

L. edodes patří mezi houby zvyšující obranyschopnost organismu, tzv. imunomodulátory. Plodnice i mycelium shiitake jsou schopné zvýšit proliferaci kmenových buněk brzlíku (budoucích T-lymfocytů) i se přímo účastnit jakožto stimulátory mitotického buněčného dělení T-lymfocytů (71). Nejvýznamnějším imunostimulátorem obsaženým v *L. edodes* je zřejmě lentinan (**II**) (obr. 9). Tento polysacharid výrazně zvyšuje aktivitu imunitního systému stimulací T-lymfocytů i makrofágů, čímž zodpovídá za protinádorovou aktivitu shiitake (54). Působí preventivně i proti celé řadě běžných i méně běžných onemocnění právě tím, že zvyšuje imunitu organismu – např. proti malárii (81) či žaludečním vředům (82). Byl dokonce testován proti AIDS na HIV pozitivních pacientech s velmi dobrými výsledky, díky čemuž jsou nyní extrakty shiitake součástí doplňkové léčby AIDS (83). Imunomodulační funkci mají i jiné sloučeniny *L. edodes*, např. mannoglukan, glukan a jiné polysacharidy (54).

Další imunoaktivní substancí získanou frakcionací LEM je EP3. Frakce EP3 je složena především z ligninu (80 % ligninu, 10 % sacharidů a 10 % proteinů), přičemž její aktivní složkou je právě ve vodě rozpustný lignin obsahující četné karboxylové skupiny (73, 15).

2.4.4 Protinádorová a antikarcinogenní aktivita

Protinádorové efekty hub byly zkoumány již v 50. letech minulého století (84), přičemž u shiitake patří tato aktivita mezi vůbec nejvýznamnější a byla dosud nejpodrobněji prozkoumána (75). Dosud identifikované sloučeniny shiitake s protinádorovými vlastnostmi jsou polysacharidy (84, 85) obsažené v buněčných stěnách. Nicméně nejznámější polysacharidy z buněčných stěn hub – chitin a celulosa – protinádorové schopnosti nemají (86). Polysacharidy vykazující protinádorovou aktivitu se vyskytují v plodnicích i myceliích shiitake (87). Nejznámějším i nejdéle objeveným protinádorovým polysacharidem izolovaným ze shiitake je lentinan (**II**) (obr. 9) (85, 88). Poprvé jej izolovali, pojmenovali a testovali Chihara se spolupracovníky již na přelomu 60. a 70. let 20. století, přičemž po jeho aplikaci myším pozorovali významné celkové zbrždění rozvoje rakoviny a doprovodných symptomů (85, 88). Jedná se o *β*-D-glukan s molekulovou hmotností okolo 500 kDa složený z *β*-(1→3)-D-glukopyranosových jednotek, na které jsou navázány ještě boční řetězce vazbou *β*-(1→6) (89, 90, 91). První návrhy jeho struktury vycházející z krystalografických studií předpokládaly, že terciární strukturu molekuly tvoří tři řetězce, které se vzájemně ovíjí a vytváří pravotočivý helix (92). Později se ukázalo, že jak hlavní řetězec, tak i postranní řetězce tvoří jednoduché šroubovice, které mají tendenci se spojovat (93). Předpokládá se, že právě konfigurace glukosových molekul v helixové struktuře je pro biologickou aktivitu lentinanu klíčová (94, 95, 96, 97). Lentinan vykazuje významnou protinádorovou aktivitu, která spočívá v aktivaci imunitního systému hostitele následovně: *β*-D-glukan se naváže na povrch lymfocytu či specifického sérového proteinu, který aktivuje makrofágy, T-lymfocyty či jiné efektorové buňky. Dochází ke zvýšené produkci protilátek, interleukinů (IL-1 a IL-2) a interferonů vedoucí k aktivaci efektorových buněk, jejímž výsledkem je karcinostatický efekt (98, 99, 100, 101). Imunitní odezva je tedy celý komplex reakcí vyvolaných několika typy buněk (2). Na rozdíl od syntetických chemoterapeutik nejsou žádné vedlejší účinky spojené s aplikací lentinanu běžné (15). Lentinan navíc slouží i k prevenci proti chemické a virální onkogenezi a též proti tvorbě metastáz (102, 103, 104), nicméně prozatím je těžké určit, zda pravidelný příjem *L. edodes* může mít stoprocentní preventivní účinek proti rakovině (54). Protinádorová aktivita byla jednoznačně vyšší u lentinanu než u polysacharidů jiných druhů hub, lišejníků a vyšších rostlin (105, 106), avšak nepůsobí proti všem typům nádorů (107). S pozitivním výsledkem byl dosud lentinan testován proti myšímu sarkomu 180 (84, 85) a rakovině žaludku a střeva (108,

109). Naopak vodný extrakt ze shiitake (obsahující lentinan) se v léčbě rakoviny prostaty ukázal být prakticky neefektivním (66).

Až do 80. let 20. století byly testovaným zvířatům aplikovány preparáty z hub intravenózně, neboť podávání lentinanu a dalších polysacharidů jinou než touto formou bylo zcela neefektivní. V pozdějších studiích byla zvířata krmena shiitake rozemletými na prášek, přičemž se ukázalo, že růst jejich nádorů byl (v závislosti na typu nádoru) inhibován z 58 resp. 79 % (110). Pokud byly z pomletých hub před jejich aplikací odstraněny lipidy či polysacharidy, růst nádorů byl značně rychlejší (inhibice z 57 resp. 39 %) (62).

Nejen v Japonsku se lentinan často používá k podpoře imunity u pacientů s rakovinou během chemoterapií, radioterapií a operací, kdy prokazatelně prodlužuje život, zlepšuje jeho kvalitu a obnovuje imunitu (108, 111). K dosažení znatelné účinnosti léčby je pochopitelně velmi důležité správné načasování a dávkování (112). Míra inhibice značně roste, pokud jsou shiitake podávány pravidelně po delší časový úsek (62).

Obdobně jako lentinan (**II**) – tedy aktivací hostitelského imunitního systému – působí i (převážně) *α*-mannanový peptid KS-2 získaný z LEM. KS-2 např. potlačuje růst hrudního (Ehrlichova) karcinomu i sarkomu 180 u myší, a to při orálním i intraperitoneálním podání (86, 113).

Glykoproteiny LAP či LEM, získané extrakcí mycelia *L. edodes* (114), potlačují karcinogenezi inhibicí růstu jaterních nádorových buněk u myší, a to opět aktivací imunitního systému (15, 54, 72). V kombinaci s chemoterapeutiky vykazují extrakty z mycelia shiitake velmi dobré výsledky také při léčbě rakoviny střev (115). Tyto účinné látky však bude zřejmě možno využít i ke zvýšení imunity obecně, stejně jako k léčbě hepatitidy B či k inhibici růstu rakovinných buněk (15).

2.4.5 Hypolipidemická aktivita shiitake

Kardiovaskulární onemocnění jsou v ekonomicky vyspělých zemích jednou z hlavních příčin úmrtí. Souvislost mezi nimi a vysokou hladinou cholesterolu v krvi je dobře známa. První výzkum, zabývající se shiitake v souvislosti s ovlivněním hladiny cholesterolu v krvi, prokázal u myší její výrazné snížení. Pokusné myši byly po dobu deseti týdnů přikrmovány sušenými shiitake (5 % z celkového objemu potravy), během kterých hladina cholesterolu v plazmě myší klesala o více než 14 % (116). Jako hypocholesterolemická látka byl izolován eritadenin [též nazývaný lentysin, lentinacin či

chemicky (*R*,*R*)-4-(9-adenyl)-2,3-dihydroxybutanová kyselina] (**I**) (obr. 9), který je derivátem adeninu (117, 118, 119). Jedná se o krystalickou látku s bodem tání 261−263 °C (15). Množství eritadeninu v *L. edodes* (ať už v různých typech shiitake či v myceliu) potřebné k efektivnímu hypocholesterolemickému účinku bylo kvantifikováno později (120, 121, 122). Testování efektivity shiitake v lidském organismu potvrdilo pokles hladiny sérového cholesterolu, přičemž u čerstvých shiitake byl tento pokles přibližně dvakrát větší než u sušených (tzn. snížení o 12 % resp. 7 % po týdnu přijímání 90 g čerstvých resp. 9 g sušených shiitake denně), a to již po jednom týdnu (123). Mechanismus působení eritadeninu v lidském organismu je rovněž zmapován. Předpokládá se, že eritadenin neinhibuje biosyntézu cholesterolu, ale urychluje vylučování požitého cholesterolu z organismu, stejně jako jeho metabolický rozklad (124, 125). Snižuje tedy hladinu veškerých lipoproteinů v organismu, včetně HDL i LDL, a to jak u myší, tak u lidí (62, 126). Aktivita eritadeninu je pochopitelně nejvyšší při konzumaci na tuky bohaté stravy (112, 127). Nedávné výzkumy toto potvrdily a upřesnily, že na významném snížení hladiny celkového cholesterolu, triglyceridů a nízkodenzitního cholesterolu (LDL-c) se podílejí (kromě eritadeninu) i polysacharidy z *L. edodes* (52). Mezi dvě další sloučeniny odvozené z eritadeninu a též izolované ze shiitake patří deoxyeritadenin [(*R*)-4-(9-adenyl)-2-hydroxybutanová kyselina (**VIII**)] a 3-(9-adenyl)propanová kyselina (**VII**) (obr. 11) (128). Ani jedna z těchto látek však hypolipidemickou aktivitu nevykazuje (129). Laboratorně bylo dosud syntetizováno a na hypolipidemickou aktivitu testováno více než 124 derivátů eritadeninu. Nejvyšší účinnost (až 50× vyšší než vlastní eritadenin) vykazovaly estery eritadeninu s krátkými řetězci obsahujícími právě jednu alkoholovou skupinu a neporušený adeninový cyklus (62, 129). Eritadenin byl nalezen a kvantifikován také v žampionech (*Agaricus bisporus*), avšak v této houbě je přítomen v podstatně nižších koncentracích (0,7 mg/100 g sušených žampionů) než v *L. edodes* (50−70 mg/100 g sušených shiitake) (122).

Zajímavé je, že eritadenin (**I**) (obr. 8) není hypolipidemicky aktivní u všech savců – např. u králíků (129). Je účinný při perorálním podání (navzdory tomu, že myši dokáží absorbovat pouze 10 % zkonzumovaného eritadeninu) a tento efekt pokračoval, i když byly shiitake z jídelníčku myší posléze odstraněny. Při jiném než orálním podání nebyl hypolipidemický efekt zdaleka tak zřejmý (62, 130). Japonští vědci poukázali na zachování hypolipidemické aktivity eritadeninu i při konzumaci po delší časový úsek – jinými slovy, metabolismus testovaných zvířat se ani za 14 měsíců na pravidelný příjem

shiitake neadaptoval a neustále docházelo ke snižování hladiny cholesterolu u testovaných zvířat oproti skupině kontrolní (129).

Na začátku 90. let 20. století bylo zjištěno, že vodné roztoky některých jedlých hub obsahují nízkomolekulární sloučeniny způsobující inhibici agregace krevních destiček. V houbách *L. edodes* byla tato schopnost takřka nejvyšší (IC_{50} byla 80 μg/ml dialyzátu). Předběžné výzkumy prokázaly, že nejaktivnějšími inhibitory jsou nukleosidy, nukleotidy či další nízkomolekulární, dosud neidentifikované sloučeniny (131). Toto se později potvrdilo; eritadenin (**I**) i deoxyeritadenin (**VIII**) mají antihemokoagulační schopnost (obr. 9, resp. 11), stejně jako 5′-AMP (**IX**) a 5′-GMP (**X**), které se v shiitake také vyskytují (obr. 11). Tato schopnost je vyšší v sušených či vařených houbách nežli v čerstvých (15). U sirných sloučenin extrahovaných z *L. edodes* byla rovněž testována jejich antikoagulační aktivita. Extrakt ze shiitake, který skutečně inhiboval agregaci červených krvinek, obsahoval lenthionin (**III**) (obr. 10) jakožto hlavní sirnou sloučeninu (132).

Konzumace shiitake je také spojována se snižováním krevního tlaku (65), což je další způsob obrany organismu proti kardiovaskulárním onemocněním.

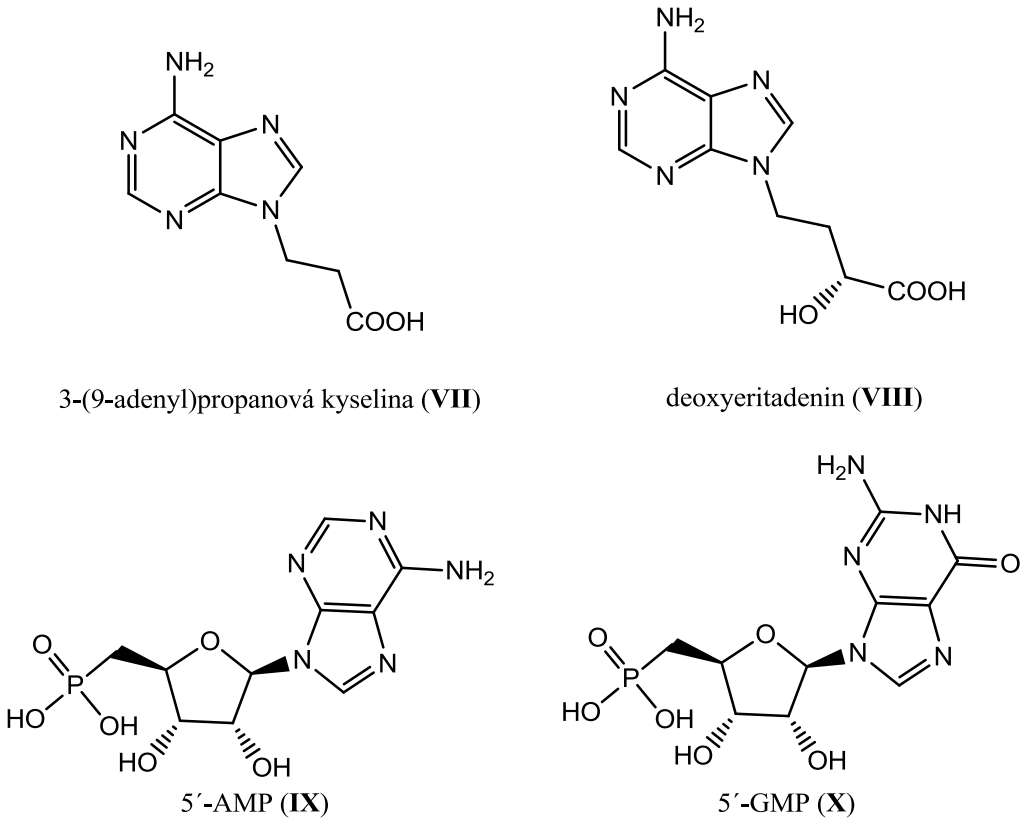
2.4.6 Antidiabetická aktivita

Diabetes mellitus neboli cukrovka je metabolické onemocnění postihující více než 250 milionů lidí po celém světě (99). U extraktů z mycelia *L. edodes* byl prokázán hypoglykemický efekt, který se projevoval výrazným snížením hladiny glukosy a triacylglycerolů v krvi (133). Tento efekt byl zřetelný i při histologickém pozorování Langerhansových ostrůvků (134). Shiitake tedy podle klinických studií působí preventivně i léčivě v případech obezity a s ní spojených metabolických poruch (135).

2.4.7 Toxicita a vedlejší efekty shiitake

L. edodes je sice jedlá houba s celou řadou mimořádně příznivých biologických účinků, přesto se při její konzumaci mohou vzácně objevit minoritní negativní efekty či alergické reakce. U zemědělců pěstujících shiitake ve vnitřních prostorách se např. objevily alergické reakce na spory, které se projevovaly bolestmi hlavy, zvýšenou teplotou, kašlem, rýmou či nevolností. Při nadměrné konzumaci těchto hub nebo při jejich nedostatečné tepelné úpravě se může objevit kožní vyrážka či průjem (54, 136). Obvykle je vyrážka viditelná 24 hodin po požití. Projevuje se velmi svědivými malými vřídky,

které se kontaktem snadno přenášejí na jiné části těla. Ačkoli patogeneze není zcela zřejmá, shiitake dermatitida je pravděpodobně způsobená lentinanem (**II**) (137) (obr. 9). Žádná akutní otrava po konzumaci shiitake nebyla dosud popsána (54).



Obr. 11: Biologicky aktivní sloučeniny *L. edodes*: 3-(9-adenyl)propanová kyselina (**VII**), deoxyeritadenin (**VIII**), 5´-AMP (**IX**) a 5´-GMP (**X**).

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Hlavní náplní této disertační práce bylo detailní studium sekundárních metabolitů houževnatce jedlého s důrazem na metabolity sirné. Zabývá se studiem struktury těchto látek, mechanismem jejich tvorby a především pak jejich biologickými vlastnostmi. Houževnatec jedlý je již po staletí používán nejen k přípravě a ochucování pokrmů, ale i v tradiční asijské medicíně. Je pravděpodobné, že i některé z metabolitů vznikající během jeho kulinárního (tepelného) zpracování mohou pozitivně působit na zdraví člověka.

Hlavními cíly této práce bylo:

- pokusit se potvrdit či vyvrátit navržený mechanismus enzymově katalyzované tvorby sirných metabolitů z kyseliny lentinikové izolací/detekcí předpokládaných meziproduktů za využití moderních analytických technik;
- otestovat biologickou aktivitu extraktů houževnatce jedlého (čerstvého i kulinárně zpracovaného) a porovnat ji s aktivitou jeho hlavního sirného metabolitu – lenthioninu (1,2,3,5,6-tetrathiepanu, **III**);
- pokusit se detekovat/identifikovat další sloučeniny, které jsou za případnou biologickou aktivitu této houby zodpovědné.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Získávání vzorku houževnatce jedlého

V rámci této doktorské práce byly zkoumány vzorky hub shiitake, které byly získávány vždy čerstvé. Zakoupeny byly v Nedvědicích u Soběslavi od společnosti České houby, a.s. (http://www.ceskehouby.cz/), a to v říjnu 2014 (tyto byly použity k izolaci lentinikové kyseliny a enzymů), únoru 2015 (k měření technikou DART) a v listopadu 2015 (experimenty sledující biologickou aktivitu a detekci těkavých látek). Shiitake byly buď ihned zpracovány (např. kuchyňské úpravy), či uloženy do mrazicího boxu o teplotě −28 °C.

4.2 Chemikálie

Chemikálie použité k detekci těkavých látek

Diethylether (≥ 99 %), síran hořečnatý (bezvodý, 99 %), hydroxid sodný (≥ 98 %) (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika).

Chemikálie použité k izolaci a syntéze

Methanol (99,97 %), dichlormethan (≥ 99,5 %), hydroxid sodný (≥ 98 %), síran amonný (99,4 %), síran hořečnatý (bezvodý, 99 %), ninhydrin, síra (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika); kyselina chlorovodíková (35 %), amoniak (25 %) (Penta, Praha, Česká republika); ethanol (96 %) (Merck, Darmstadt, Německo); *γ*-glutamyl-*p*-nitroanilid (Fisher BioReagents, New Jersey, USA); 2-sulfanylethanol (99 %), Tris báze (≥ 99 %), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, 99 %), acetonitril (≥ 99,9 %) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); Amberlite IR-120 16−45 mesh (Acros Organics, Geel, Belgie); Amberlite GC-120 100−200 mesh (Fluka, Buchs, Švýcarsko); *S*-(2-pyrrolyl)cysteinsulfoxid (izolovaný Ing. Petrou Krejčovou z *Allium giganteum*).

Chemikálie použité k testování cytotoxicity

Antibiotika a antimykotika (směs penicilinu, streptomycinu a amfotericinu od výrobce), L-glutamin, RPMI a DMEM media, trypsin, fetální hovězí sérum (FBS), 2-sulfanylethanol (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT) (Invitrogen

Molecular Probes, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); adenosin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); dimethylsulfoxid (DMSO), methanol (99,7 %), acetonitril (99,9 %) (Scharlab, Barcelona, Španělsko); kyselina mravenčí (Lachema, Brno, Česká republika); chlorid sodný, chlorid draselný, dodekahydrát fosforečnanu disodného, dihydrogenfosforečnan draselný a kyselina chlorovodíková (Penta, Praha, Česká republika).

Chemikálie použité při testování antimikrobiální aktivity

Agar ST, pepton, kvasniční autolyzát, živný agar č. 2 (Imuna Pharm, Šarišské Michaľany, Slovenská republika); bramborovo-dextrosový agar, bramborovo-dextrosový bujón (Himedia, Mumbai, Indie); trypton (Scharlab, Barcelona, Španělsko); chlorid sodný (≥ 99,9 %) (Penta, Praha, Česká republika); sójový pepton (Fluka, Buchs, Švýcarsko); D-glukosa (p. a.) a Tween 80 (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika); antibiotika ampicilin sodný (≥ 98 %), gentamicin-sulfát, chloramfenikol (≥ 98 %), tetracyklin hydrát (99 %), tioconazol (97 %) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); ethanol (96 %) (Merck, Darmstadt, Německo); hydroxid sodný (≥ 98 %) (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika).

Chemikálie použité k určení antioxidační aktivity

1,1-Difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl (DPPH), kyselina gallová, kyselina askorbová, 2,2′-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) (ABTS), Trolox, peroxodisíran draselný, ethanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); methanol (99,97 %) (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika).

Chemikálie použité k určení protizánětlivé aktivity

Forbolester (forbol-12-myristát-13-acetát, Cayman Chemicals, USA); dimethylsulfoxid (DMSO), penicilin a strepromycin, L-glutamin, RPMI-1640 medium, fetální hovězí sérum (FBS) (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); prednison (≥ 99,5 %), fosfátový pufr (PBS), lipopolysacharidy izolované z *E. coli* (0111:B4) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4.3 Přístroje

GC analýzy byly prováděny za pomoci plynového chromatografu Varian 3800 vybaveného hmotnostním detektorem Varian 4000 (Palo Alto, CA, USA).

K detekci 1,2-dithiiranu byl použit iontový zdroj DART (DART−SVP, IonSense, Saugus, MA, USA) s hmotnostním spektrometrem Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Během izolace lentinikové kyseliny byl využíván HPLC−PDA chromatografický systém od firmy Varian (Palo Alto, CA, USA), sestávající z binárního modulu vysokotlakých pump Dynamax SD-210 Varian a PDA detektoru Varian 335.

K identifikaci lentinikové kyseliny, detekci jejích rozkladných produktů a dalším analýzám jednotlivých frakcí během testů cytotoxicity byl využit kapalinový chromatograf Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC+ vybavený PDA detektorem a Bruker Impact HD hmotnostním detektorem s vysokým rozlišením, využívající ionizaci elektrosprejem.

NMR spektra byla měřena pomocí NMR spektrometru Bruker AVANCE III 700 MHz (Bruker, Billerica, MA, USA).

K přečištění enzymů byl využit systém vysokorychlostní kapalinové chromatografie BioLogic DuoFlow Pathfinder 20 (Bio-Rad, USA). Systém se skládal z pracovní stanice, „maximizéru“, UV−VIS detektoru s deuteriovou lampou umožňující měření absorbance při čtyřech vlnových délkách, pH detektoru a sběrače frakcí.

Nádorové buňky byly pěstovány v inkubátoru Sanyo MCO-15AC (Moriguči, Japonsko), stále nastaveném na 37 °C a s 5% přísunem CO_2. Absorbance byla pro potřebu cytotoxických testů měřena pomocí spektrofotometru Tecan Sunrise (Männedorf, Švýcarsko) při dvou vlnových délkách (590 nm hlavní a 640 nm referenční).

Časosběrná mikroskopie byla realizována pomocí Axio-Zeiss Observer Z.1 mikroskopu (Londýn, UK) na sterilních 96jamkových mikrotitračních destičkách s regulovanou teplotou 37 °C a s přídavkem 5 % CO_2. Sběr dat probíhal 48 hodin každých 20 minut.

Antimikrobiální aktivita byla vyhodnocována za pomoci spektrofotometru BioRad (xMark, Hemel Hempstead, UK). Antioxidační aktivita byla měřena pomocí spektrofotometru Biomate 5 (Thermo Spectronic, Cambridge, UK). Protizánětlivá aktivita byla vyhodnocována pomocí spektrofotometru FLUOstar Omega BMG LABTECH (Ortenberg, Německo).

K testování protizánětlivé aktivity byl využit Instant ELISA kit (Diaclone, Francie), buňky byly pěstovány v inkubátoru Heracell VIOS 160i (Thermo Scientific, UK) při 37 °C a se stálým 5% přísunem CO_2.

4.4 Analytické metody

HPLC−PDA metody

Metoda H1

kolona: Varian Microsorb MV 100-5 Amino (250 × 4,6 mm, 5 μm)
mobilní fáze: 50mM KH_2PO_4 (pH 3,30), acetonitril
izokratická eluce 50:50
průtok: 0,9 ml/min
nastřikovaný objem: 20 μl
monitorovací vlnová délka: 210 nm

Metoda H2

kolona: Varian Microsorb MV 100-5 C8 (250 × 4,6 mm, 5 μm)
mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B)
gradientová eluce

čas (min)	A (%)	B (%)
0	80	20
40	5	95
45	5	95
50	80	20
60	80	20

průtok: 0,9 ml/min
nastřikovaný objem: 20 μl
monitorovací vlnová délka: 220 nm

Metoda H3

kolona: TSKgel Amide-80 (250 × 2,6 mm, 3 μm)
mobilní fáze: 0,1% HCOOH (A), acetonitril + 0,1% HCOOH (B)
gradientová eluce

čas (min)	A (%)	B (%)
0	20	80
15	20	80
17	35	65
20	80	20
25	90	10
30	20	80
36	20	80

průtok: 0,6 ml/min
nastřikovaný objem: 3 μl
monitorovací vlnová délka: 280 nm

Metoda H4

kolona: TSKgel Amide-80 (250 × 2,6 mm, 3 µm)
mobilní fáze: 0,1% HCOOH (A), acetonitril + 0,1% HCOOH (B)
gradientová eluce

čas (min)	A (%)	B (%)
0	30	70
15	30	70
20	90	10
25	90	10
30	30	70
35	30	70

průtok: 0,6 ml/min
nastřikovaný objem: 5 µl
monitorovací vlnová délka: 280 nm

Metoda H5

kolona: TSKgel Amide-80 (250 × 2,6 mm, 3 µm)
mobilní fáze: voda (A), acetonitril (B)
gradientová eluce

čas (min)	A (%)	B (%)
0	0	100
15	100	0
22	100	0
23	0	100

průtok: 0,8 ml/min
nastřikovaný objem: 10 µl
monitorovací vlnová délka: 270 nm

Metoda H6

kolona: TSKgel Amide-80 (250 × 2,6 mm, 3 µm)
mobilní fáze: 0,1% HCOOH (A), acetonitril + 0,1% HCOOH (B)
gradientová eluce

čas (min)	A (%)	B (%)
0	25	75
15	75	25
20	75	25
25	25	75

průtok: 0,5 ml/min
nastřikovaný objem: 1 µl

FPLC metody

Metoda F1

kolona: BIO-RAD, Bio-Scale Mini, BioGel P6 Desalting Cartridge (10 ml)
mobilní fáze: voda
izokratická eluce, 100 % vody
průtok: 4 ml/min
nastřikovaný objem: 2,5 ml
monitorovací vlnové délky: 214 nm, 260 nm, 280 nm, 405 nm

Metoda F2

kolona: BIO-RAD, UNO Q6 Anion Exchange Column (12 mm × 0,53 mm)
mobilní fáze: ekvilibrační pufr: 50mM Tris HCl (pH 7,6)
eluční pufr: 50mM Tris HCl (pH 7,6) + 1M $(NH_4)_2SO_4$
gradientová eluce

čas (min)	ekvilibrační pufr (%)	eluční pufr (%)
0	100	0
3	100	0
18	0	100
20	0	100
29	100	0

průtok: 4 ml/min
nastřikovaný objem: 500 µl
monitorovací vlnové délky: 214 nm, 260 nm, 280 nm, 405 nm

GC metoda (G1)

kolona: HP-5MS (30 m × 0,25 mm; 0,25 µm)
nosný plyn: helium (1,3 ml/min)
nastřikovaný objem: 1 µl (split 1:10)
ionizace: EI (70 eV) rozsah sledovaných *m*/*z*: 30−320 Da
teplota nástřiku: 200 °C teplota detektoru: 250 °C
teplotní gradient: od 40 °C (3 min) do 240 °C (5 min) s nárůstem 4 °C/min.

4.5 Izolace senzoricky aktivních látek metodou přímé extrakce

K izolaci sirných těkavých látek byl použit postup publikovaný Chenem *et al.* (26) s následujícími modifikacemi. Nejprve bylo smícháno 500 g čerstvých hub s 1 l kohoutkové vody a homogenizováno kuchyňským mixerem. Poté byla změřena hodnota pH (pH = 6,25), která byla upravena pomocí 1M roztoku hydroxidu sodného na hodnotu pH = 9,0 (optimum pro aktivitu *γ*-glutamyltranspeptidázy a C−S lyázy). Získaný homogenát byl nechán za stálého míchání do druhého dne, a to při laboratorní teplotě. Následující den bylo zkontrolováno pH směsi (pH = 8,11), homogenát byl zfiltrován přes tkaninu, následně přes filtrační papír a poté byla provedena extrakce 2 × 700 ml diethyletheru. Z důvodu tvorby emulze bylo nutné k oddělení jednotlivých fází použít centrifugu při 12 000 rpm (22 539 × g, 4 minuty). Následně byl získaný extrakt přesušen bezvodým $MgSO_4$, zfiltrován přes filtrační papír a rozpouštědlo bylo odpařeno (hmotnost 35 mg). Takto připravený extrakt byl před analýzami uchován v mrazicím boxe při teplotě −28 °C a poté analyzován pomocí GC−MS (metoda G1).

4.6 Izolace lentinikové kyseliny

Izolace lentinikové kyseliny byla provedena dle postupu publikovaného Yasumotem *et al*. (21) s několika modifikacemi. Zmražené plodnice shiitake (1005 g) byly při pokojové teplotě rozmraženy, smíchány s methanolem (2 l) a homogenizovány kuchyňským mixerem (10 minut). Získaný homogenát byl ponechán 2 hodiny za stálého míchání při laboratorní teplotě macerovat a poté byl zfiltrován přes tkaninu a následně přes filtrační papír. Tímto způsobem byl získán první filtrát. Filtrační koláč byl znovu smíchán s methanolem (1 l), po jedné hodině macerace za stálého míchání byla směs opět filtrována přes tkaninu a následně přes filtrační papír. Takto byl získán druhý filtrát. Oba filtráty byly spojeny a zakoncentrovány na rotační vakuové odparce při teplotě 30 °C. Výsledný tmavě hnědý viskózní roztok (objem přibližně 300 ml) byl do druhého dne zamražen. Po rozmražení byla upravena jeho hodnota pH (z 6,57 na 3,56) pomocí koncentrované HCl a vzorek byl opětovně zfiltrován přes filtrační papír. Získaný extrakt byl nanesen na kolonu iontoměniče Amberlite IR-120 (16−45 mesh) o rozměrech 2,3 × 22 cm. Kolona s katexem byla po nanesení vzorku (a jeho protečení) promyta destilovanou vodou (90 ml) a následně 2% vodným roztokem amoniaku, přičemž byly jímány jednotlivé frakce o objemu 50 ml. Eluce byla ukončena v okamžiku, kdy eluovaná frakce nevykazovala pozitivní reakci s ninhydrinem (0,2% roztok v acetonu). Jednotlivé

frakce byly poté analyzovány pomocí HPLC−PDA (metoda H1) a ty, které obsahovaly kyselinu lentinikovou, byly spojeny a zamraženy (výsledný objem 100 ml).

K dalšímu přečištění byl použit Amberlite CG−120 (100−200 mesh, 2,3 × 13,5 cm). Ve vzorku získaném v předchozím kroku byla upravena hodnota pH za pomoci koncentrované HCl (z 10,3 na 3,4) a všechen byl nanesen na kolonu. Po vizuální změně zbarvení katexu (z béžové na tmavě hnědou) byla kolona promývána destilovanou vodou a jímány jednotlivé frakce po 50 ml, dokud poskytovaly pozitivní reakci s ninhydrinem. Získané frakce byly analyzovány pomocí HPLC−PDA (metoda H1) a ty, které obsahovaly kyselinu lentinikovou, byly sloučeny a lyofilizovány.

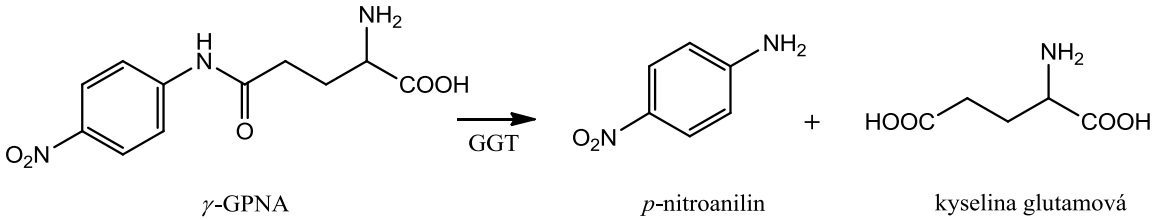
Získaný lyofilizát byl poté rozpuštěn v horkém methanolu a po několika dnech stání při teplotě 4 °C byla získána lentiniková kyselina jakožto bílá látka amorfní struktury. Identita získané látky byla ověřena pomocí HPLC−MS a NMR.

4.7 Izolace *γ*-glutamyltransferázy a C−S lyázy

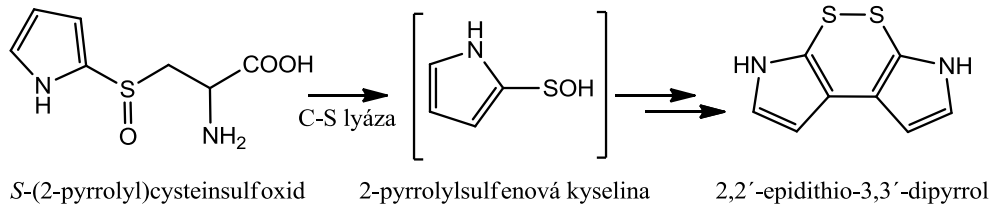
γ-Glutamyltransferáza (GGT) a C−S lyáza byly izolovány dle návodu publikovaného Li *et al*. (31) s drobnými modifikacemi. Čerstvé plodnice shiitake (1 kg) byly zmraženy, lyofilizovány a následně rozemlety. 25 g (tj. přibližně 1/3) tohoto houbového prášku bylo přidáno k 300 ml 0,05M Tris-HCl (pH 7,6), obsahujícího 1mM EDTA a 5mM 2-sulfanylethanol. Směs byla důkladně rozmíchána, ochlazena po dobu 20 minut v ledové tříšti a následně centrifugována při 4 °C a otáčkách 4754 rpm (odpovídající 4166 × g, 20 minut). Směs byla zfiltrována přes filtrační papír a supernatant dále zpracováván. K supernatantu (166 ml) bylo přidáno 29,22 g $(NH_4)_2SO_4$ (tj. 30% nasycení). Vzorek byl ponechán 20 minut chladit ledem a opět centrifugován za stejných podmínek uvedených výše. K supernatantu (175 ml) byl opět přidán $(NH_4)_2SO_4$, tentokrát do 70% nasycení [tj. 47,78 g $(NH_4)_2SO_4$]. Po dalším centrifugování za identických podmínek byla získaná peleta rozpuštěna v 10 ml 0,05M Tris-HCl (pH 7,6) a před další izolací byla použita kolona BioGel P6 (FPLC metoda F1). Tato kolona byla použita především k důkladnému odsolení vzorku a k odstranění dalších nízkomolekulárních látek.

K dalšímu přečištění GGT a C−S lyázy byla použita FPLC ve spojení s kolonou UNO Q6, která funguje na principu hydrofobních interakcí. Tuto kolonu bylo nutné předem ekvilibrovat pomocí 0,05M Tris-HCl (pH 7,6) s 1M $(NH_4)_2SO_4$ (FPLC metoda F2). Frakce byly získány za pomoci automatického jímače frakcí po 1 ml, přičemž aktivní

frakce byly rozpoznány spektrofotometricky díky specifické reakci GGT s *γ*-glutamyl-*p*-nitroanilidem (obr. 12), kde vznikající *p*-nitroanilin absorbuje při vlnové délce λ = 410 nm (138). Frakce obsahující C−S lyázu byly rozpoznány reakcí s *S*-(2-pyrrolyl)-cysteinsulfoxidem, přičemž vznikající 2,2′-epidithio-3,3′-dipyrrol absorbuje při vlnové délce λ = 518 nm (obr. 13) (139).



Obr. 12: Specifická reakce k určení aktivity GGT.

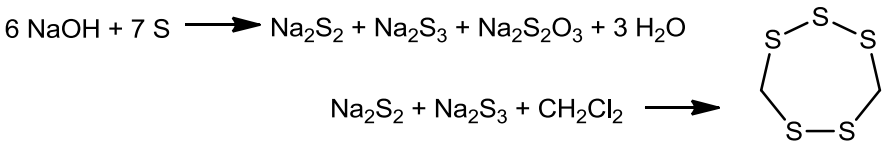


Obr. 13: Specifická reakce k určení aktivity C-S lyázy.

4.8 Syntéza lenthioninu

Syntéza lenthioninu (**III**) (obr. 14) byla provedena dle návodu publikovaného Moritem *et al*. (77), avšak s drobnými úpravami. V tříhrdlé baňce (1 l) osazené zpětným chladičem, teploměrem a přívodem dusíku bylo za stálého míchání rozpuštěno 24 g NaOH ve 250 ml ethanolu. Po úplném rozpuštění hydroxidu bylo do roztoku přidáno 23 g bezvodé síry. Směs byla míchána při teplotě 80 °C po dobu 45 minut. Během zahřívání se změnilo zbarvení reakční směsi ze žlutého na hnědé. Poté byla tříhrdlá baňka vyjmuta z topného hnízda a za pokračujícího míchání ponechána zchladnout na laboratorní teplotu. Po jejím vychladnutí na 20 °C bylo do tříhrdlé baňky za stálého míchání přidáno 250 ml dichlormethanu. V průběhu tohoto přídavku barva reakční směsi zesvětlala a její teplota vzrostla na 34 °C. Roztok byl za stálého míchání ponechán samovolně chladnout do dalšího dne.

Poté bylo do tříhrdlé baňky přidáno 100 ml vody, čímž se dosud čirý roztok žluté barvy zakalil. Roztok byl míchán dalších 30 minut a poté zfiltrován před filtrační papír. Po přidání dalších 100 ml destilované vody se roztok opětovně zakalil a po 15 minutách míchání bylo nutné jej znovu zfiltrovat, následně byla vodná fáze odstraněna. Organická fáze byla promyta 3 × 200 ml vody a vodná fáze obsahující ethanol byla odstraněna. Dichlormethanová fáze byla přesušena pomocí bezvodého $MgSO_4$, zakoncentrována na rotační vakuové odparce (teplota 40 °C, výsledný objem 50 ml) a ponechána přes noc při teplotě 4 °C. Vzniklé krystalky světle žluté barvy (výtěžek 2,4 g) byly charakterizovány jako lenthionin (**III**) pomocí HPLC−PDA (metoda H2), GC−MS (metoda G1) a NMR. Čistota produktu byla ≥ 98 % (dle GC−MS i HPLC−PDA).



Obr. 14: Syntéza lenthioninu.

4.9 Monitorování rozkladu lentinikové kyseliny

Ke studiu mechanismu enzymově katalyzovaného rozkladu lentinikové kyseliny (obr. 6) byla použita metoda DART−HRMS. Přístroj sestával z iontového zdroje DART (DART−SVP, IonSense, Saugus, MA, USA) a hmotnostního spektrometru Exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Vzdálenost mezi výstupem iontového zdroje a keramickou trubicí se vzorkem byla 10 mm, mezera mezi keramickou trubicí a přívodem do kapiláry spektrofotometru byla 2 mm. Vzorky byly vpraveny manuálně pomocí Dip-It skleněných kapilár (IonSense, Saugus, MA, USA), čas desorpce byl 5 s. Použita byla ionizace v pozitivním i negativním módu. Parametry nastavení byly následující: průtok He 2,5 l/min, teplota vzduchu 350 °C, teplota kapiláry 250 °C, napětí na vylučovací jehle 5 000 V, napětí na mřížkové elektrodě 350 V, napětí na kapiláře 50 V, napětí na čočce 120 V. Rozlišovací schopnost pro *m*/*z* 200 byla 50 000 (fwhm). Pro vyhodnocování získaných dat byl použit program PeakView, verze 1.1.1.2 (AB SCIEX, Framingham, MA, USA).

Enzymově katalyzovaný rozklad lentinikové kyseliny

Při studiu mechanismu enzymově katalyzovaného rozkladu lentinikové kyseliny byly prováděny experimenty jednak s čerstvými i sušenými plodnicemi shiitake, tak i s izolovanou kyselinou lentinikovou smíchanou s přečištěnými enzymy GGT a C−S lyázou. Z čerstvých plodnic shiitake byla vymačkána šťáva, která byla během 1 min od homogenizace pomocí vzorkovací Dip-It skleněné kapiláry analyzována metodou DART−HRMS. Sušené mleté shiitake byly nejprve smíchány s vodou (100 mg shiitake/ 2 ml vody) a po 1 minutě inkubace byla tato směs analyzována pomocí DART−HRMS.

V případě modelových experimentů s lentinikovou kyselinou byla tato sloučenina rozpuštěna ve vodě (10 mg/ml) a pH roztoku bylo upraveno pomocí 0,1M NH_3 na hodnotu 9,0 (pH optimum pro aktivitu zúčastněných enzymů). Před nanesením do vzorkovací kapiláry byl tento roztok smíchán s izolovanými enzymy (GGT a C−S lyázou), inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě a poté analyzován pomocí DART−HRMS.

Zcela identický vzorek byl připraven k analýze pomocí HPLC−HRMS. Záměrem využití této techniky bylo odhalit méně těkavé sirné metabolity vznikající z lentinikové kyseliny, které by nemuselo být možné detekovat jinými analytickými metodami. Šťáva z čerstvých plodnic shiitake byla vymačkána, zfiltrována (0,2 μm) a analyzována v různých časových intervalech (rozmezí 1−30 min) pomocí HPLC−HRMS (metoda H6).

Dále byl připraven vodný roztok lentinikové kyseliny (10 mg/ml, pH upraveno pomocí 0,1M NH_3 na 9,0) a obou klíčových enzymů podílejících se na jejím rozkladu. Tato směs byla inkubována při 25 °C (pH 9,0) a analyzována v různých časových intervalech (rozmezí 1−30 min) pomocí HPLC−HRMS (metoda H6).

4.10 Tepelné úpravy shiitake a příprava extraktů

Mezi základní tepelné úpravy hub běžně se praktikující po celém světě patří jejich vaření, pražení a sušení. V případě shiitake se používají pouze klobouky, neboť třeň je i po déletrvajících kuchyňských úpravách tuhý a špatně stravitelný. Vodné extrakty po těchto úpravách byly testovány na cytotoxickou, antimikrobiální, protizánětlivou a antioxidační aktivitu a jejich účinnost porovnána s aktivitou lenthioninu.

Vaření: Čerstvé nemražené klobouky shiitake (1005 g) byly nakrájeny na přibližně centimetrové kostky, které byly následně vloženy do hrnce se 3 l kohoutkové vody. Po přivedení k varu byly za občasného míchání zvolna vařeny 30 minut.

Po zchladnutí (po cca 1 hodině) byly houby rozmixovány pomocí kuchyňského mixéru, získaný homogenát byl míchán pomocí magnetického míchadla 1,5 hodiny, zfiltrován přes tkaninu a filtrační papír a poté byl filtrát zakoncentrován na objem 350 ml pomocí rotační vakuové odparky (RVO). Část extraktu (1 ml) byla odebrána, zfiltrována (mikrofiltr 0,22 μm) do vialky a uchovávána při −28 °C pro doplňkové analýzy, zbylá část byla následně lyofilizována a získaný lyofilizát (13,0 g) uchováván v mrazicím boxu (−28 °C).

Pražení: Čerstvé nemražené klobouky shiitake (1004 g) byly praženy na teflonové pánvi bez přítomnosti tuku a vody – cca 70 % kloboučků bylo nakrájeno na plátky přibližně 0,6 cm tlusté, zbylé klobouky (ty s nízkým profilem) byly praženy vcelku, a to přibližně 2 minuty z každé strany. Hmotnost opražených hub byla 513 g, tj. došlo k redukci jejich hmotnosti na 51 %. Po opražení byly ke kloboukům přidány 2 l kohoutkové vody a rozmixovány pomocí kuchyňského mixéru. Získaný homogenát byl míchán 1,5 hodiny, poté zfiltrován přes tkaninu a filtrační papír a poté byl filtrát zakoncentrován na objem 800 ml pomocí RVO. Část extraktu (1 ml) byla odebrána, zfiltrována (mikrofiltr 0,22 μm) do vialky a uchovávána při −28 °C pro doplňkové analýzy, zbylá část byla následně lyofilizována a získaný lyofilizát (13,8 g) uchováván v mrazicím boxu (−28 °C).

Sušení: Čerstvé nemražené klobouky shiitake (1002 g) byly sušeny při 40 °C po 96 hodin v laboratorní sušárně, poté zváženy (91 g) a povařeny s 2 l kohoutkové vody po dobu 30 minut. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byly klobouky důkladně rozmixovány pomocí kuchyňského mixéru, získaný homogenát byl míchán 1,5 hodiny, poté zfiltrován přes tkaninu a filtrační papír a následně byl filtrát zakoncentrován na objem 420 ml pomocí RVO. Část extraktu (1 ml) byla odebrána a zfiltrována (mikrofiltr 0,22 μm) do vialky a uchovávána při −28 °C pro doplňkové analýzy, zbylá část byla lyofilizována a získaný lyofilizát (35,3 g) uchováván v mrazicím boxu (−28 °C).

4.11 Příprava vodného extraktu z čerstvých plodnic shiitake

Čerstvé plodnice shiitake (1000 g) byly smíchány s 2 l kohoutkové vody a důkladně zhomogenizovány (15 minut) pomocí kuchyňského mixéru. Získaný homogenát byl míchán 1,5 hodiny, poté zfiltrován (nejprve přes plátno, poté přes filtrační papír) a filtrát zakoncentrován na objem 600 ml pomocí RVO. Část extraktu (1 ml) byla odebrána a zfiltrována (mikrofiltr 0,22 μm) do vialky a uchovávána při −28 °C pro doplňkové

analýzy, zbylá část byla lyofilizována a získaný lyofilizát (96,4 g) uchováván v mrazicím boxu (−28 °C).

4.12 Testování potenciálního cytotoxického účinku na buněčných liniích HeLa, PaTu a HepG2

4.12.1 Kultivace buněčných linií HeLa, PaTu a HepG2

Testy cytotoxicity byly prováděny na třech adherentních buněčných liniích, a to linii lidské rakoviny děložního čípku (HeLa), linii lidské rakoviny slinivky břišní (PaTu) a linii lidské rakoviny jater (HepG2). Kultury byly získány z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Třeboni, tamtéž byly uchovávány, kultivovány a používány, přičemž tento postup odpovídal tamější běžné laboratorní praxi (140). Buňky byly sterilně kultivovány v inkubátoru (teplota 37 °C − simuluje extracelulární prostředí v organismu − a vysoká relativní vlhkost vzduchu okolo 90 %, díky níž se zabraňuje odpařování vody z médií). Ke kultivaci byla používána média RPMI-1640 (pro buněčnou linii HeLa) a DMEM (pro linie PaTu a HepG2), obě s 5% přídavkem fetálního hovězího séra (FBS), 1% L-glutaminu, 1% směsi antibiotik a antimykotik a 0,1 % 50nM 2-sulfanylethanolu. Pasážování adhezivních buněčných linií bylo prováděno oplachováním sterilním PBS (phosphate buffer saline) za účelem odstranění vápníku a optimálního působení enzymů. PBS bylo připraveno následovně: 8 g NaCl + 2,89 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ + 0,2 g KCl + 0,2 g KH_2PO_4 bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody a pH roztoku bylo upraveno pomocí 1M HCl na hodnotu 7,2. Poté byla provedena trypsinizace spočívající v přídavku roztoku trypsinu (trypsin:PBS, 3:7, V/V) každé 2−3 dny (dle zbarvení média, které se snižujícím se množstvím živin žloutne), čímž došlo k uvolnění buněk od povrchu i od sebe navzájem. Působení proteázy bylo zastaveno přidáním vhodného média. Za pomocí automatické serologické pipety bylo vytvořeno homogenní sérum z buněk; jeho část byla v kultivační lahvi ponechána, doplněna novým médiem a vrácena do inkubátoru, se zbytkem bylo dále pracováno. Veškerá kultivace s buněčnými liniemi byla prováděna sterilně.

4.12.2 Inkubace buněk na mikrotitrační destičce

Všechny experimenty s buněčnými liniemi byly prováděny v 96jamkových sterilních polypropylenových mikrotitračních destičkách (Baria s.r.o., Psáry). Do jamek

po obvodu mikrotitrační destičky bylo napipetováno 200 µl deionizované vody, aby se omezilo odpařování z ostatních (testovacích) jamek. Buňky byly na destičku nasazeny vždy den před vlastním experimentem, a to v rozdílném počtu. Pro experimenty s HeLa a HepG2 liniemi bylo nasazeno 4×10^4 buněk na jamku (200 µl), pro PaTu pak poloviční množství (z důvodu jejich rychlejšího růstu). Požadované koncentrace buněk bylo dosaženo jejich spočtením pomocí Bürkerovy komůrky a následně jejich zředěním adekvátním médiem. Po nasazení buněk na mikrotitrační destičku (200 µl do každé jamky) se buňky nechaly do druhého dne inkubovat při 37 °C s přísunem 5% CO_2.

4.12.3 Příprava expozičního roztoku pro testování lenthioninu

Lenthionin (**III**) (obr. 10) je sloučenina ve vodě a v polárních rozpouštědlech obtížně rozpustná; její rozpustnost v ethanolu je 0,26 %, ve vodě je téměř nerozpustná (141). Byl připraven zásobní roztok lenthioninu v ethanolu o výchozí koncentraci 10,89 mmol/l (což odpovídá rozpustnosti 0,26 %). Ze zásobního roztoku byl připraven expoziční roztok, a to pětinásobným zředěním zásobního roztoku v RPMI. Z expozičního roztoku bylo pipetováno 10 µl do 200µl testovací jamky, tj. nejvyšší koncentrace lenthioninu, připraveného z ethanolového zásobního roztoku, které bylo možné dosáhnout, byla 108,9 µmol/l. Dále byl lenthionin ředěn vhodným médiem. Koncentrace ethanolu v testovací jamce nikdy nepřesáhla 1 % a neovlivnila tedy životaschopnost buněk. Testy byly prováděny vždy v technickém triplikátu (3 jamky) a celý proces byl opakován třikrát (3 biologické replikáty). Doba expozice byla 48 hodin, během kterých byla mikrotitrační destička umístěna v inkubačním boxu.

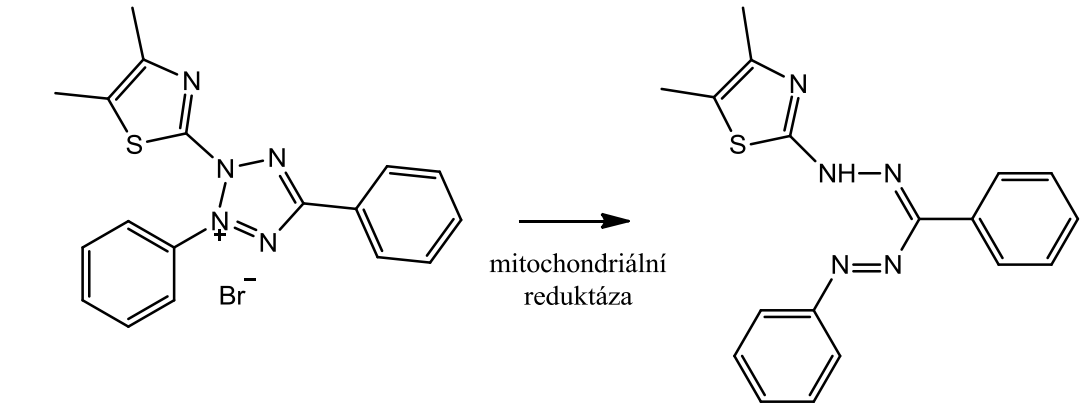
4.12.4 Ředění a multiplikace

Na předem připravenou mikrotitrační destičku s nasazenými buňkami byly do testovacích jamek pipetovány vždy v triplikátech pro každou ze zvolených koncentrací vodné extrakty čerstvých i tepelně upravených plodnic shiitake. V tomto případě nebylo zapotřebí pracovat s expozičním roztokem, protože se jednalo o vodné extrakty. Test cytotoxického účinku byl proveden nejméně třikrát, vždy v technickém triplikátu. Mikrotitrační destička byla umístěna do inkubačního boxu na požadovanou dobu (48 hodin). Z důvodu vysokých hodnot směrodatných odchylek získaných výsledků však byla většina extraktů testována více než třikrát.

4.12.5 MTT test

Princip

Metoda MTT testu je založena na izolaci buněk vzorku nádorové tkáně a jejich následné kultivaci *ex vivo* s cytostatiky o různých koncentracích. Schopnost přežití nádorových buněk se vyhodnocuje na základě spektrofotometrie. Tento postup je založen na redukci žlutého 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromidu (MTT) na ve vodných roztocích nerozpustný formazan (modré krystaly). Tato reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk (obr. 15).



3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-
2,5-difenyltetrazoliumbromid
(MTT)

(*E*,*Z*)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-
1,3-difenylformazan
(formazan)

Obr. 15: Redukce probíhající na mitochondriální membráně ke zhodnocení životaschopnosti buněk.

Princip této konverze byl popsán již v roce 1954 Blackem a Speerem (142), metoda byla uvedena do praxe Mosmanem v roce 1983 (tzv. kolorimetrický test stanovení životnosti buněk) (143). Formazanové krystalky se rozpustí přidáním silného detergentu (v tomto případě DMSO) a zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnových délkách v rozmezí 590−640 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství metabolicky aktivních buněk (čím tmavší barva, a tedy vyšší absorbance, tím vyšší podíl živých buněk). Úroveň zabarvení roztoku je však závislá na několika parametrech: na koncentraci MTT, době inkubace, množství životaschopných buněk a na jejich metabolické aktivitě (144).

Vlastní provedení

Cytotoxicita připravených vodných extraktů a lenthioninu (**III**) na všech dostupných buněčných liniích byla stanovena pomocí MTT testu. MTT roztok byl připraven smícháním 4 mg MTT s 1 ml PBS, následným rozpuštěním (za pomoci ultrazvukové lázně) a zfiltrováním přes bakteriologický filtr (0,2 μm). Po uplynutí expoziční doby působení extraktu na buňky (tedy po 48 hodinách) bylo do každé jamky přidáno 10 μl roztoku MTT. Destička byla další 4 hodiny inkubována a následně stočena na centrifuze (2000 rpm, 738 × g, 10 minut). Médium s MTT z destičky bylo poté vyklepáno a usazené formazanové krystalky rozpustěny ve 200 μl DMSO na jamku. Destička byla na 30 minut vrácena zpět do inkubačního boxu, poté vložena do spektrofotometru a 5 minut nechána protřepat. Následně byla naměřena absorbance, a to při dvou vlnových délkách, $\lambda = 590$ nm (hlavní) a $\lambda = 640$ nm (referenční).

Naměřené hodnoty pro jednotlivé triplikáty testovacích jamek a všechny kontroly (tj. jamky, ve kterých byly buňky v identických médiích bez přídavku testovaných vzorků) byly zprůměrovány. Poměr jednotlivých průměrů absorbancí testovaných jamek a průměru absorbancí kontrolních vzorků představuje míru životaschopnosti („*viability*“) buněk, vyjádřena je v procentech spolu se směrodatnými odchylkami. Hodnota IC_{50} byla stanovena z kalibrační křivky sestrojené ze dvou nejbližších okolních bodů.

4.12.6 Časosběrná mikroskopie

U lenthioninu a extraktů z čerstvých i kulinárně zpracovaných plodnic byly testovány jejich schopnosti inhibovat buněčné proliferace a jejich cytotoxické účinky na buněčných liniích také za použití časosběrné mikroskopie.

Invertovaný mikroskop Zeiss Axio Observer Z.1 byl vybaven komorou pro udržení stálé teploty (37 °C) a přívodem CO_2. Na mikroskopu bylo možné nastavit zaznamenávání obrazu všech polí mikrotitrační destičky ve zvoleném časovém intervalu (v tomto případě každých 20 minut) a po zvolenou celkovou dobu expozice (48 hodin). Výsledkem byla série fotografií, na kterých lze pozorovat změny v morfologii buněk v závislosti na čase. Ze sekvence je možné vyčíst patologické změny (nekróza, apoptóza) či vakuolizaci a též lze počítáním buněk odhadnout rychlost jejich dělení.

4.12.7 Frakcionace vodného extraktu pomocí HPLC

Po otestování vodného extraktu z čerstvých plodnic na cytotoxickou aktivitu bylo zjišťováno, která z přítomných složek je za tuto vlastnost zodpovědná. Vodný extrakt byl analyzován pomocí amidové kolony na HPLC−PDA (metoda H5), přičemž byly jímány frakce po dvouminutových intervalech (viz obr. 24). Z těchto celkem 9 frakcí byl odpařen acetonitril za pomoci RVO (30 °C) a vodná fáze spolu se vzorkem byla lyofilizována. Každá z frakcí byla zpětně rozpuštěna ve stejném objemu odpovídajícímu celkovému objemu na HPLC nastřikovanému. MTT testem byla aktivita všech získaných frakcí otestována pomocí buněčné linie HeLa identickým způsobem, jak je uvedeno u testování aktivity původního extraktu.

Tímto postupem byly nalezeny tři cytotoxicky aktivní oblasti (na obr. 24 frakce označené 5, 6 a 7), které byly dále frakcionovány pomocí optimalizovaných HPLC−PDA metod (H3 a H4). V tomto kroku byly analyty jímány jednotlivě dle chromatografického záznamu. Z najímaných frakcí byl odpařen acetonitril, vodná část lyofilizována a výsledné lyofilizáty rozpuštěny ve stejném objemu, ve kterém byl extrakt na HPLC nastřikován. Cytotoxicita takto získaných frakcí byla opět testována MTT testem na nádorové buněčné linii HeLa.

4.13 Testování antimikrobiální aktivity

4.13.1 Mikrobiální kultury

Mikrobiální kultury byly získány z několika sbírek mikroorganismů CCM (Česká sbírka mikroorganismů, Brno), ATCC (American Type Culture Collection), BCCM/LMG (Belgian Coordinatel Collections of Microorganisms), RICP (Research Institute of Crop Production − Výzkumný ústav rostlinné výroby, Ruzyně, Praha) a KRV/ZF/JU (sbírka katedry rostlinné výroby a agroekologie − Biotechnologické centrum, ZF JU v Českých Budějovicích).

Na testování antimikrobiální aktivity byly použity bakteriální kultury *Bacillus cereus* (CCM 869), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (CCM 3954), *Micrococcus luteus* (CCM 1048), fytopatogenní bakterie *Erwinia amylovora* (RICP 121A), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (RICP 1297/99) a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (BCCM/LMG 931). Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* byla získána ze sbírky KRV/ZF/JU; z dalších kvasinkových kultur byla na testování používána

Candida albicans (ATCC 10231). Testované kultury plísní byly *Rhizoctonia solani* (CCM F-1), *Fusarium solani* (CCM F-1036) a *Aspergillus niger* (získány ze sbírky hub oddělení rostlinolékařství, KRV/ZF/JU). Všechny mikroorganismy byly uchovávány v kryozkumavkách při teplotě −80 ºC.

Testování s bakteriálními, kvasinkovými i plísňovými kulturami probíhalo na katedře speciální produkce rostlinné (ZF/JU, České Budějovice).

4.13.2 Příprava živných bujónů a agarů

Trypto-sójový bujón (TSB) byl připraven v následujícím složení: 15 g/l tryptonu, 5 g/l sójového peptonu a 5 g/l NaCl ve vodě (pro přípravu agaru TSA bylo nadto přidáno ještě 15 g/l agaru). C-médium (bujón) bylo připraveno rozpuštěním 10 g/l peptonu, 5 g/l kvasničného autolyzátu, 5 g/l glukosy a 5 g/l NaCl ve vodě. Maso-peptonový agar obohacený glukosou (MPAg) obsahoval ve vodě rozpuštěného 40 g/l živného agaru č. 2, 10 g/l glukosy, 5 g/l kvasničného autolyzátu a 20 g/l agaru. U zmíněných bujónů i agarů byla upravena hodnota pH pomocí 1M roztoku NaOH na hodnotu 7,2. Bramborovo-dextrosový bujón (PDB) byl rozpuštěn ve vodě v koncentraci 24 g/l (výsledné pH 5,1) a bramborovo-dextrosový agar (PDA) v koncentraci 39 g/l (výsledné pH 5,4). Všechna živná média byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut a do analýzy uchovávána v lednici.

4.13.3 Podmínky kultivace

Bakterie *M. luteus*, *E. coli*, *B. cereus* a *E. faecalis* byly kultivovány v TSB/TSA 24 hodin při 37 ºC. Fytopatogenní bakterie byly kultivovány následovně: *E. amylovora* 24 hodin, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* a *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* vždy 2−3 dny při 25 ºC v C-médiu/MPAg. Kvasinka *C. albicans* byla pěstována v TSB/TSA po dobu 2−3 dnů při teplotě 37 ºC a *S. cerevisiae* byla kultivována v PDB/PDA 24 hodin při teplotě 25 ºC. Plísňové kultury *F. solani*, *R. solani* a *A. niger* byly kultivovány při 25 ºC na PDA 48 hodin (vytvoření spor trvalo 30 dní).

4.13.4 Mikrodiluční metoda

Testování bylo prováděno v 96jamkových mikrotitračních destičkách (Thermo Scientific). Lenthionin (**III**) i lyofilizované vodné extrakty byly převedeny do roztoku rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle (ethanol, voda). Dále byly připraveny jejich

zásobní roztoky o koncentraci 5120 μg/ml. Antibiotika byla rozpuštěna ve vodě nebo ethanolu na koncentraci 160 μg/ml. Po úplném rozpuštění byly testované roztoky přefiltrovány přes sterilní filtr (Millex-GV 0,22 μm). Testované roztoky byly následně zředěny příslušným bujónem 10×. Další ředění bylo prováděno již přímo v mikrotitračních destičkách na koncentrace od 512 do 1 μg/ml (ředění tzv. dvojkovou řadou). V případě potřeby byla u některých antibiotik použita nižší počáteční koncentrace. Ve všech jamkách byl celkový objem roztoku 100 μl. Jamky byly zaočkovány 5 μl mikrobiální suspenze o koncentraci 10^7 CFU/ml (10^4 buněk/ml) ve vhodném sterilním bujónu. Kultivace probíhala při – pro různé kmeny různé – optimální teplotě a to 24 příp. 48 hodin. Zákal byl měřen před a po inkubaci na spektrofotometru BioRad při 405 nm (145, 146).

Testování protiplísňové aktivity bylo prováděno analogicky jako testování inhibičních účinků proti bakteriím a kvasinkám jen s drobnými modifikacemi. Místo bujónu byl použit agar. Testované látky byly ředěny agarem při teplotě 70 ºC. Po ztuhnutí agaru v jamkách byla nanesena suspenze plísňových spór o koncentraci 10^7 CFU/ml v 0,05% (V/V) vodném roztoku Tweenu 80 (147, 148). Nárůst plísně byl hodnocen okometricky po 48 hodinách v inkubátoru, nastaveném na 25 °C.

MIC byla vypočítána jako rozdíl zákalu před nárůstem a po nárůstu daného mikroorganismu v testovaném roztoku. Rozdíl byl porovnán se zákalem při optimálním růstu mikroorganismu (bez použití testovaných látek či antibiotik). Koncentrace testované látky byla považována za aktivní, když inhibice růstu daného mikroorganismu byla ≥ 80 %. Získané hodnoty byly průměrem třech opakování. Test byl prováděn ve třech nezávislých experimentech.

4.14 Měření antioxidační aktivity

4.14.1 Metoda DPPH

Antioxidační aktivita byla metodou DPPH měřena za identických podmínek uvedených v článku Kim *et al*. (149), tzn. 3,75 ml 0,05mM roztoku DPPH v methanolu a 0,25 ml vzorku vodného extraktu o koncentraci 2000, 4000 nebo 8000 ppb v destilované vodě bylo smícháno a protřepáno. Pro testování lenthioninu (**III**) byl použit jeho nasycený ethanolový roztok (tj. 10,9 mmol/l) a k porovnání jeho antioxidační aktivity s běžnými antioxidanty byly použity roztoky troloxu a kyselin gallové a askorbové o 100× nižší koncentraci, nežli měl lenthionin. Jako slepý vzorek byl použit namísto

vzorku methanol. Absorbance byla měřena při 517 nm po 30 minutách, během kterých byl roztok umístěn ve tmě. Vzorky byly připravovány a testovány v triplikátech a aktivita vzorku pohlcujícího volné radikály byla vyjádřena pomocí následujícího vzorce:

aktivita vzorku (%) = $(1 - A_{vzorek}/A_{slepý\ vzorek}) \times 100$.

4.14.2 Metoda ABTS

Antioxidační aktivita metodou ABTS byla měřena za identických podmínek uvedených v článku Kim a spol. (149), tzn. 7mM vodný roztok ABTS a 2,45mM roztok peroxodisíranu draselného byl ředěn ethanolem, dokud jeho absorbance při 734 nm nebyla 0,700 ± 0,050. 50 µl vzorku o koncentraci 2000, 4000 a 8000 ppb v destilované vodě bylo smícháno s 1,9 ml roztoku ABTS s pufrem. Pro testování lenthioninu (**III**) byl použit jeho nasycený ethanolový roztok (tj. 10,9 mmol/l) a k porovnání jeho antioxidační aktivity s běžnými antioxidanty byly použity roztoky troloxu a kyselin gallové a askorbové o 100× nižší koncentraci, nežli měl lenthionin. Jako slepý vzorek byl použit místo testovaného vzorku ethanol. Absorbance byla měřena při 734 nm po 6 minutách, během kterých byl roztok umístěn ve tmě. Vzorky byly připravovány a testovány v triplikátech a aktivita vzorku pohlcujícího volné radikály byla vyjádřena pomocí následujícího vzorce:

aktivita vzorku (%) = $(1 - A_{vzorek}/A_{slepý\ vzorek}) \times 100$.

4.15 Měření protizánětlivé aktivity

Testy byly provedeny Mgr. Zuzanou Plavcovou z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně. Lidské leukemické buňky linie THP-1 v RPMI-1640 médiu obohaceném o 2mM L-glutamin, 10% fetální hovězí sérum (FBS), penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml) byly naneseny v potřebném množství (500 000 buněk/ml) v objemu 100 µl do každé jamky 96jamkové mikrotitrační destičky. Diferenciace makrofágů byla vyvolaná forbolesterem rozpuštěným v PBS (výsledná koncentrace 50 ng/ml), poté byly buňky inkubovány 24 hodin (37 °C, 5 % CO_2). Další den se médium vyměnilo za čerstvé a proběhla další 24 hodinová inkubace. Následně se médium odsálo, makrofágy adherované na dnech jamek byly opláchnuty PBS a spolu s RPMI-1640 médiem serum free (tzn. včetně antibiotik a FBS, avšak bez forbolesteru) byly nechány inkubovat (37 °C, 5 % CO_2) po dobu 2 hodin. Do mikrotitračních destiček byly následně přidány lenthionin (5µM v DMSO), vodné extrakty shiitake (10 µg/ml v DMSO),

prednison (1μM v DMSO) či samotný DMSO, sloužící jako kontrola. Konečná koncentrace DMSO v každé jamce byla 0,1 %. V tuto chvíli nevykazovaly extrakty ani lenthionin žádný cytotoxický efekt (životaschopnost buněk > 95 %), proto bylo přikročeno k vlastnímu testování protizánětlivé aktivity. Ta byla spuštěna přidáním lipopolysacharidů (izolovaných z *Escherichia coli*, 1 μg/ml). Následující den bylo médium sesbíráno a koncentrace TNF-*α* v médiu měřena za pomoci instantního ELISA kitu dle instrukcí výrobce (absorbance měřená při 450 a 620 nm). Všechny testy byly provedeny v technických triplikátech a ve třech na sobě nezávislých opakováních. Odlehlé hodnoty (větší či menší nežli průměr ± 3 × SD) nebyly do výsledků zahrnuty. Pro statistické hodnocení byla použita analýza rozptylu (ANOVA), přičemž pro $p < 0,05$ byly hodnoty považovány za statisticky významné.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

V první části této práce byla pozornost zaměřena na izolaci a identifikaci těkavých sirných sloučenin vznikajících v plodnicích *L. edodes* při jejich mechanickém poškození. V následující fázi byly izolovány a přečištěny lentiniková kyselina, *γ*-glutamyltransferáza a C−S lyáza, které byly využity při studiu mechanismu vzniku těchto těkavých sirných sloučenin v modelových směsích.

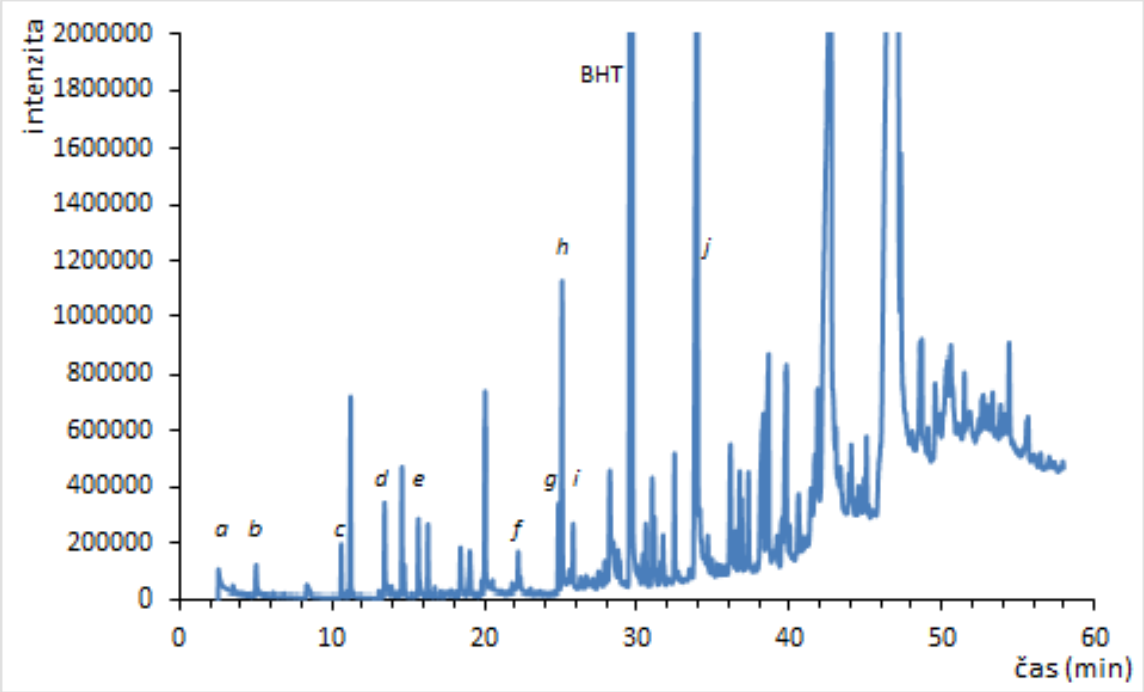
V druhé části této práce byly studovány vybrané biologické vlastnosti (cytotoxické, antimikrobiální, antioxidační a protizánětlivé) vodných extraktů čerstvých i kulinárně zpracovaných plodnic shiitake, které byly následně porovnány s aktivitou hlavního sirného sekundárního metabolitu − lenthioninu (1,2,3,5,6-pentathiepanu), jakož i s aktivitou příslušných standardů.

5.1 Sirné látky vznikající v houževnatci jedlém

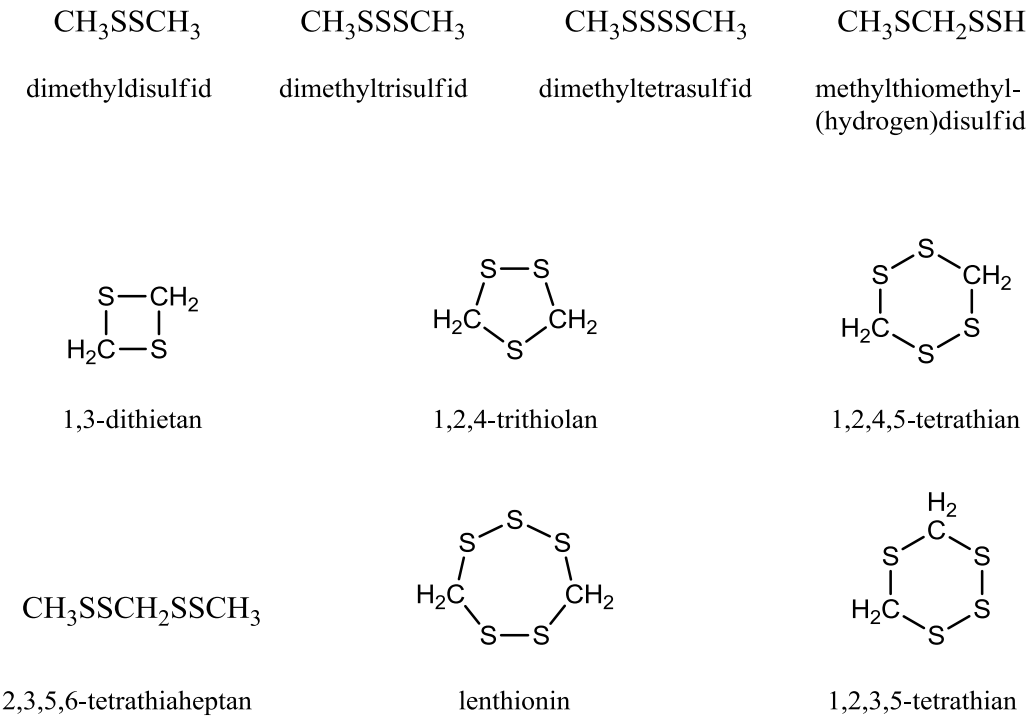
5.1.1 Identifikace hlavních těkavých sirných sloučenin *L. edodes*

Těkavé látky byly izolovány metodou přímé extrakce původně publikovanou Chenem *et al*. (26). Získaný extrakt byl poté analyzován pomocí GC−MS (metoda G1, obr. 16). Vzhledem k faktu, že standardy některých sloučenin nebyly k dispozici, byla identifikace těchto látek přítomných v analyzovaném extraktu provedena na základě interpretace jejich MS spekter a také srovnáním těchto dat s literárními údaji (26, 27).

Sloučeniny detekované pomocí GC−MS bylo možné rozdělit na látky kyslíkaté (zejména alkoholy a estery) a sirné, přičemž pozornost byla zaměřena právě na sloučeniny sirné, jejichž MS spektra se vyznačovala typickým izotopickým klastrem iontů $[M]^+$ a $[M+2]^+$. EI−MS data a pravděpodobné struktury nejvýznamněji zastoupených sirných sloučenin jsou uvedeny na obr. 17 a v tab. 2. Z chromatogramu na obr. 16 je zřejmé, že kvantitativně nejvýznamnější těkavou sirnou sloučeninou shiitake byl lenthionin, což bylo plně v souladu s dosud publikovanými literárními údaji. Na chromatogramu je také patrný výrazný pík (retenční čas 29,9 min) odpovídající BHT (3,5-di-*terc*-butyl-4-hydroxytoluen), což je látka, která byla přítomna v diethyletheru použitém k extrakci − nejedná se tedy o přirozeně se vyskytující složku shiitake. Dva nejintenzivnější, chvostující píky (s retenčními časy 42,8 a 46,2 min) dle MS spekter odpovídají látkám lipidické povahy, pravděpodobně volným mastným kyselinám.



Obr. 16: GC chromatogram extraktu plodnic *L. edodes*.



Obr. 17: Struktura nejvýznamnějších těkavých sirných látek v extraktu plodnic *L. edodes*.

Tab. 2: EI−MS data sirných sloučenin v diethyletherovém extraktu *L. edodes*.

označení	M_r (Da)	sumární vzorec	název	MS spektrum (*m/z*, rel. %)
a	94	$C_2H_6S_2$	dimethyldisulfid	94 (100, M^+), 79 (48), 64 (12), 45 (40)
b	92	$C_2H_4S_2$	1,3-dithietan*	92 (100, M^+), 77 (25), 76 (17), 61 (53), 45 (79)
c	126	$C_2H_6S_3$	dimethyltrisulfid	126 (100, M^+), 111 (13), 91 (16), 79 (55), 64 (26), 45 (38)
d	126	$C_2H_6S_3$	methylthiomethyl(hydrogen)disulfid*	126 (30, M^+), 93 (66), 80 (100), 47 (40), 45 (43)
e	124	$C_2H_4S_3$	1,2,4-trithiolan*	124 (100, M^+), 91 (8), 78 (76), 59 (18), 45 (40)
f	158	$C_2H_6S_4$	dimethyltetrasulfid	158 (27, M^+), 112 (66), 93 (64), 79 (61), 61 (76), 47 (100), 45 (85)
g	172	$C_3H_8S_4$	2,3,5,6-tetrathiaheptan*	172 (10, M^+), 126 (26), 93 (100), 64 (23), 61 (13), 45 (32)
h	156	$C_2H_4S_4$	1,2,3,5-tetrathian*	156 (100, M^+), 110 (55), 91 (18), 78 (11), 64 (16), 45 (29)
i	156	$C_2H_4S_4$	1,2,4,5-tetrathian*	156 (100, M^+), 110 (30), 91 (32), 78 (14), 64 (26), 45 (37)
j	188	$C_2H_4S_5$	1,2,3,5,6-pentathiepan (lenthionin)	188 (30, M^+), 142 (100), 124 (91), 78 (82), 64 (20), 45 (32)

* Takto označené sloučeniny byly identifikovány pouze na základě interpretace jejich MS spekter a srovnáním s literárními údaji.

5.1.2 Studium mechanismu tvorby sirných látek v houževnatci jedlém

V další etapě výzkumu sirných sloučenin houževnatce jedlého byla pozornost zaměřena na objasnění mechanismu enzymově katalyzovaného rozkladu lentinikové kyseliny za vzniku těkavých látek detekovaných v předchozím oddíle. Hlavní důraz byl kladen zejména na detekci předpokládaných meziproduktů tohoto rozkladu. První návrh pravděpodobného mechanismu rozkladu lentinikové kyseliny byl publikován již v roce 1971 Yasumotem *et al.* a následně upřesněn Chenem *et al.* (viz obr. 6) (24, 27). Tento navržený mechanismus vychází z analogie s rozkladem alliinu a jeho analogů v česnekovitých rostlinách. Tvorba žádného z předpokládaných meziproduktů (např. příslušné sulfenové kyseliny, thiosulfinátu nebo 1,2-dithiiranu) však doposud nebyla

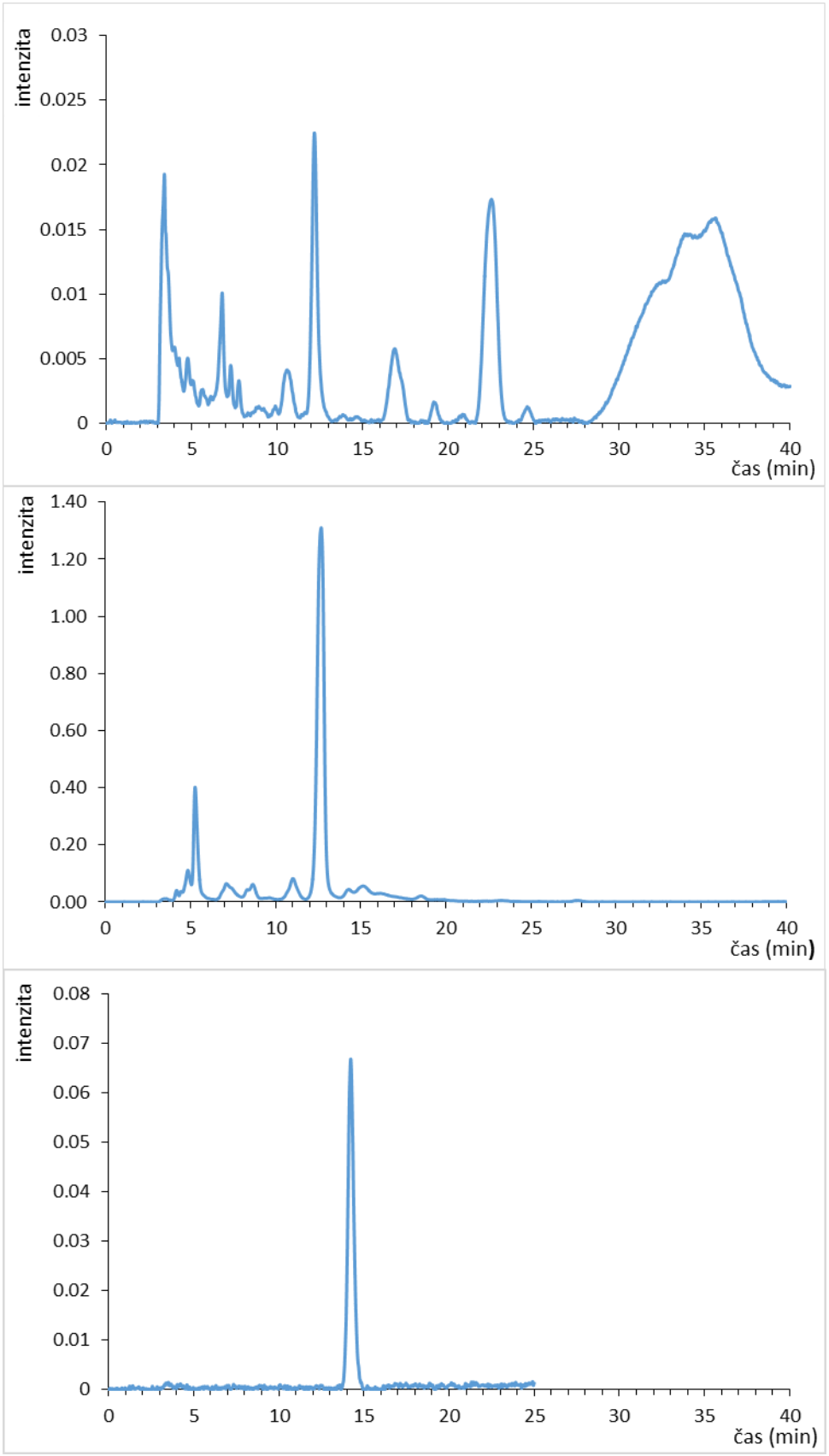
nikým potvrzena. Z tohoto důvodu byly provedeny modelové experimenty studující rozklad analyticky čisté lentinikové kyseliny pomocí dvou částečně přečištěných enzymů – γ-glutamyltranspeptidázy (GGT) a C−S lyázy.

Izolace lentinikové kyseliny

Lentiniková kyselina byla izolována z plodnic shiitake nejprve extrakcí methanolem a následně přečištěna pomocí iontoměničové chromatografie za využití několika různých iontoměničů (Amberlite IR-120 a Amberlite CG-120). Po lyofilizaci frakcí obsahujících lentinikovou kyselinu (ověřeno pomocí HPLC−PDA) a následné rekrystalizaci z methanolu byla získána lentiniková kyselina ve formě amorfní bílé sloučeniny. Na obr. 18 je zobrazen průběh izolace této látky. HPLC chromatogram výchozího methanolového extraktu z mražených plodnic shiitake je zobrazen na obr. 18a, na obr. 18b je zobrazen HPLC chromatogram částečně přečištěného extraktu (po přečištění pomocí Amberlite IR-120), konečná míra přečištění lentinikové kyseliny je zřejmá z obr. 18c.

Identita získané lentinikové kyseliny byla potvrzena využitím (+)ESI-HRMS. Pomocí této techniky byla zjištěna přesná molekulová hmotnost i elementární složení ($C_{12}H_{22}N_2O_{10}S_4$), které plně odpovídalo předpokládaným hodnotám ($[M+H]^+$ teoret. 483,0230 Da; nalezeno 483,0232 Da). Také izotopické poměry jednotlivých iontů a MS/MS fragmentace odpovídaly předpokládanému elementárnímu složení a struktuře lentinikové kyseliny.

Takto získaná lentiniková kyselina byla spolu s částečně přečištěnými enzymy (γ-glutamyltranspeptidázou a C−S lyázou) použita v následujících modelových experimentech s cílem detailně pochopit mechanismus tvorby sirných sloučenin *L. edodes*. Během těchto pokusů byly využívány moderní analytické techniky DART−HRMS a HPLC−HRMS.



Obr. 18: HPLC chromatogram lentinikové kyseliny a) ve výchozím methanolovém extraktu, b) v částečně přečištěném extraktu, c) přečištěné.

Využití techniky DART−HRMS

DART je poměrně nová „měkká“ ionizační desorpční technika, která umožňuje sledovat tvorbu látek přímo v biologickém materiálu ihned po porušení pletiv bez nutnosti předchozí extrakce. To dovoluje detekci i značně reaktivních meziproduktů s velmi krátkou dobou existence. Právě tato technika byla úspěšně využita k detekci sulfenových kyselin vznikajících enzymovým rozkladem alliinu a jeho analogů v česneku a dalších česnekovitých rostlinách (150).

Z čerstvých i mražených shiitake byla do skleněné vzorkovací kapiláry vymačkána šťáva, která byla ihned vložena do iontového zdroje, přičemž byly použity oba módy ionizace (pozitivní i negativní). V pozitivním ionizačním módu se nepodařilo detekovat žádnou z hledaných sloučenin. Naopak pomocí ionizace v negativním módu byly v oblasti iontů *m*/*z* 50−500 Da detekovány tři látky obsahujících síru (soudě dle izotopických klastrů) (tab. 3, obr. 19). Z těchto třech sloučenin poskytovala nejintenzivnější signál látka, jejíž ion $[M - H]^-$ = 78,9848 Da odpovídal sumárnímu vzorci $[CH_3O_2S]^-$. Tomuto sumárnímu vzorci se ovšem nepodařilo přiřadit žádnou reálně existující sloučeninu. Nelze proto vyloučit, že se jedná pouze o artefakt tvořící se termickým rozkladem jiné sirné sloučeniny.

Další ze sirných sloučenin detekovaných v negativním módu byla látka poskytující ion $[M - H]^-$ = 110,9569 Da, což odpovídá sumárnímu vzorci $[CH_3O_2S_2]^-$. Nejpravděpodobnější sloučeninou odpovídající tomuto sumárnímu vzorci je 1,2-dithiiran-1,1-dioxid, což je sloučenina, jejíž tvorba nebyla dosud v shiitake nikým předpokládána.

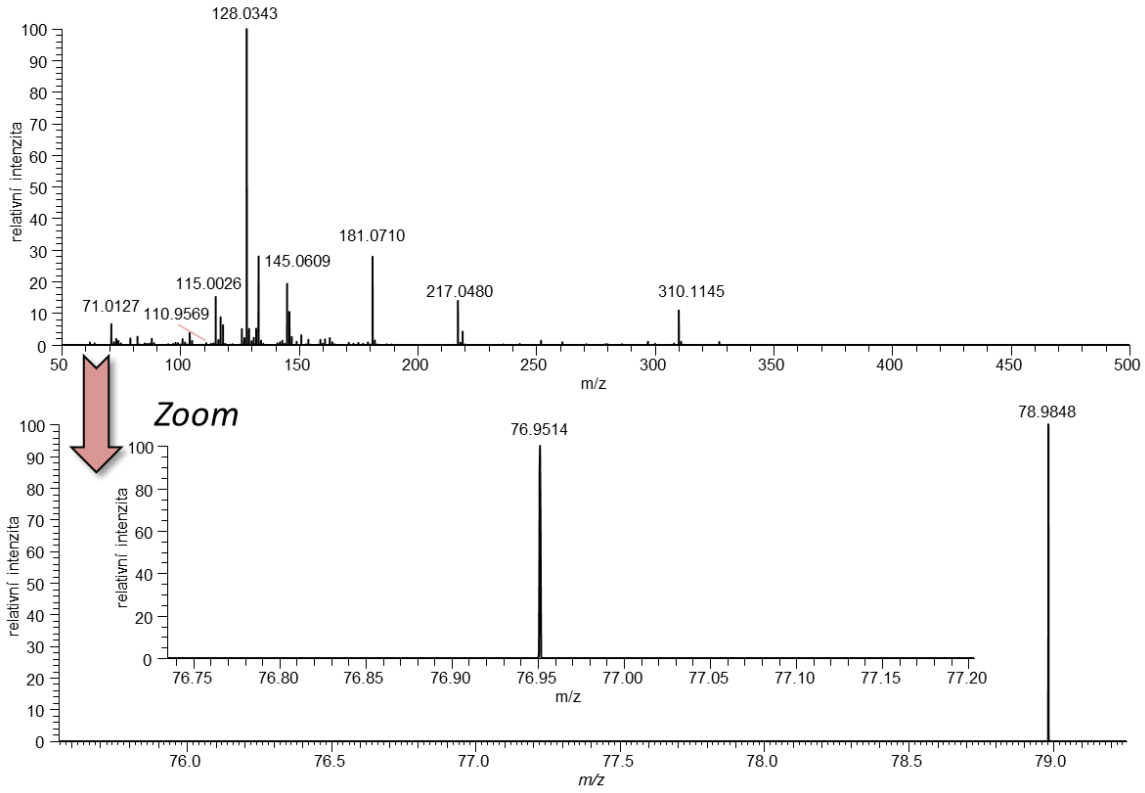
Poslední ze sirných látek detekovaných v čerstvých i mražených houbách pomocí DART−HRMS byla sloučenina poskytující ion $[M - H]^-$ = 76,9514 Da, kterému odpovídá sumární vzorec $[CHS_2]^-$. S velmi vysokou mírou pravděpodobnosti se jedná o methylendisulfid (neboli 1,2-dithiiran), nestabilní meziprodukt enzymatického rozkladu lentinikové kyseliny, jehož tvorba byla předpovězena v 80. letech 20. století Chenem *et al.* (27). Experimenty popsané v této práci tak poskytují první přímý důkaz jeho tvorby v shiitake. O jeho původu nemůže být pochyb, neboť tato látka byla detekována také v modelové směsi sestávající se z lentinikové kyseliny, GGT a C−S lyázy. V sušených houbách (po rehydrataci a úpravě pH na 9,0) methylendisulfid ani další z výše uvedených sirných sloučenin detekovány nebyly.

Přítomnost žádné jiné sirné sloučeniny v těchto experimentech potvrzena nebyla. Zvláštní pozornost byla zaměřena především na detekci příslušné sulfenové kyseliny vznikající z lentinikové kyseliny. Fakt, že se tuto látku nepodařilo detekovat, lze vysvětlit

dvěma různými způsoby. Tato sulfenová kyselina (M_r = 265,9411 Da) se může skutečně při narušení pletiva plodnic shiitake tvořit, ale je příliš nestabilní popř. nedostatečně těkavá, aby mohla být detekována pomocí DART. Nelze ani vyloučit druhou možnost, a to že se lentiniková kyselina rozkládá zcela jiným mechanismem, než se dosud předpokládalo, a hledaná sulfenová kyselina z ní nevzniká.

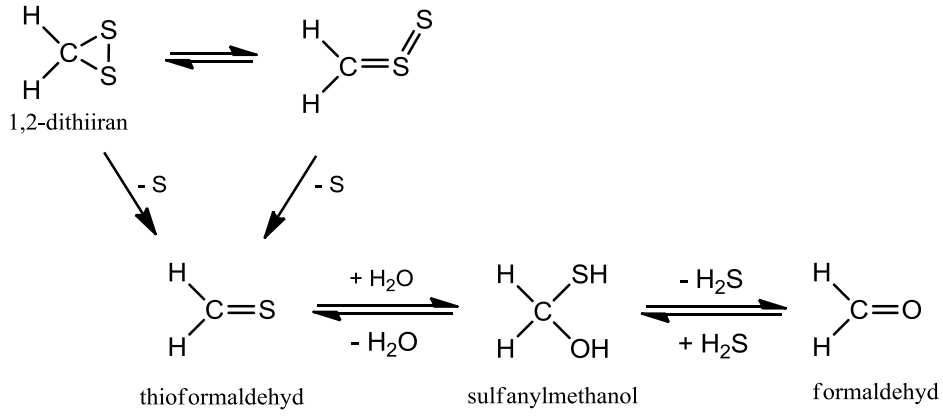
Tab. 3: Sirné sloučeniny detekované v čerstvě homogenizovaných plodnicích *L. edodes* pomocí DART−HRMS.

typ ionizace	**ion**	**teoretická** $[M-H]^-$ (Da)	**změřená** $[M-H]^-$ (Da)	**rozdíl** (ppm)
negativní	$[CHS_2]^-$	76,9525	76,9514	-0,624
	$[CH_3O_2S]^-$	78,9859	78,9848	-0,970
	$[CH_3O_2S_2]^-$	110,9580	110,9569	-0,246



Obr. 19: DART−HRMS spektrum šťávy houževnatce jedlého.

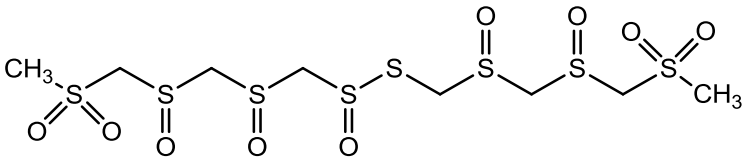
Potvrzení tvorby 1,2-dithiiranu při mechanickém narušení pletiva plodnic shiitake může zároveň vysvětlit přítomnost velmi vysokých koncentrací formaldehydu v těchto houbách, jak bylo popsáno v oddíle 2.3.6. Lze totiž předpokládat, že tato vysoká množství endogenního formaldehydu se pravděpodobně tvoří z thioformaldehydu, který vzniká rozkladem vysoce nestabilního 1,2-dithiiranu (obr. 20) (41, 151). Tvorba thioformaldehydu však bohužel nemohla být použitou technikou DART potvrzena, neboť dostupné přístrojové vybavení neumožňovalo detekci látek s M_r < 50 Da (monoizotopická M_r thioformaldehydu je 45,9877 Da).



Obr. 20: Pravděpodobný mechanismus tvorby formaldehydu v shiitake (151).

Využití techniky HPLC−HRMS

Záměrem využití techniky HPLC−HRMS bylo detekovat méně těkavé sirné metabolity vznikající z lentinikové kyseliny, jejichž tvorbu se nepodařilo potvrdit pomocí DART−HRMS. Jednalo se především o příslušný thiosulfinát (2,4,6,8,9,11,13,15-oktathiahexadekan-2,2,4,6,8,11,13,15,15-nonaoxid), který by měl hypoteticky vznikat z lentinikové kyseliny, pokud je mechanismus jejího rozkladu navržený Chenem *et al.* (27) správný.



Obr. 21: Vzorec thiosulfinátu (2,4,6,8,9,11,13,15-oktathiahexadekan-2,2,4,6,8,11,13,15,15-nonaoxidu).

Byla připravena modelová směs lentinikové kyseliny a obou klíčových enzymů podílejících se na jejím rozkladu. Tato modelová směs byla inkubována při 25 °C (pH 9,0) a analyzována v různých časových intervalech (1−30 min) pomocí HPLC−HRMS. Ačkoliv byl v průběhu tohoto experimentu pozorován zřetelný úbytek výchozího množství lentinikové kyseliny, v žádném časovém úseku nebyla detekována sloučenina, jejíž molekulová hmotnost by odpovídala molekulové hmotnosti hledaného thiosulfinátu (monoisotopická M_r = 513,8716 Da). Podobné výsledky byly dosaženy i při analýze extraktů z čerstvě homogenizovaných plodnic.

Výše popsaná pozorování mohla být způsobena tím, že hledaný thiosulfinát je příliš nestabilní a během HPLC analýzy se rozložil ještě před vstupem do MS detektoru. K vyloučení této možnosti byly proto vzorky analyzovány také technikou „*direct infusion*“ (tj. bez předchozí separace na koloně). Avšak ani při použití této techniky se hledaný thiosulfinát detekovat nepodařilo.

Na základě získaných výsledků se tedy jeví jako pravděpodobnější varianta, že k rozkladu lentinikové kyseliny dochází poněkud jiným mechanismem, než se dosud předpokládalo.

5.2 Sledování biologické aktivity lenthioninu a vodných extraktů shiitake

Byl připraven vodný extrakt z čerstvých plodnic shiitake, jakož i vodné extrakty z plodnic, které prošly kulinární úpravou (vařením, pražením a sušením). Poté byla sledována cytotoxická, antimikrobiální, antioxidační a protizánětlivá aktivita těchto extraktů, která byla porovnána s aktivitou hlavní sirné sloučeniny vznikající z lentinikové kyseliny – lenthioninem.

5.2.1 Cytotoxická aktivita lenthioninu a vodných extraktů shiitake

O cytotoxických účincích *L. edodes* vůči celé řadě buněčných nádorových linií bylo dosud publikováno poměrně velké množství vědeckých článků. Všechny tyto práce se však zabývaly studiem cytotoxických vlastností polysacharidů, glykoproteinů či jejich frakcí, u nichž byly cytostatické i cytotoxické účinky prokázány již v 50. letech minulého století. Účinnost celé řady z nich byla potvrzena také klinickými studiemi na myších i lidech (152, 153).

Žádná z publikovaných prací se však dosud nezabývala zkoumáním cytotoxicity celkových vodných extraktů různě kulinárně zpracovaných plodnic *L. edodes* na lidský organismus. V této práci byly připraveny vodné extrakty čerstvých a tepelně upravených (sušených, vařených a pražených) plodnic. Poté byla testována cytotoxická aktivita těchto extraktů vůči buňkám třech rakovinných linií, a sice HeLa (rakovina děložního čípku), PaTu (rakovina slinivky) a HepG2 (rakovina jater), v koncentračním rozmezí 0,001−10 mg/ml. Výsledky těchto experimentů jsou shrnuty v tab. 4.

Tab. 4: Životaschopnost buněčných nádorových linií po ošetření extrakty *L. edodes* (v %).

Koncentrace testovaných extraktů (mg/ml)			10	5	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001
Životaschopnost buněk (%)	pražené	HepG2	84 ± 6	86 ± 5	91 ± 25	78 ± 7	93 ± 5	95 ± 9	98 ± 4	100 ± 9	99 ± 6
		PaTu	61 ± 3	74 ± 1	78 ± 6	78 ± 5	84 ± 5	95 ± 12	89 ± 7	91 ± 7	94 ± 4
		HeLa	35 ± 3	48 ± 1	59 ± 6	73 ± 1	88 ± 2	87 ± 2	98 ± 3	100 ± 4	100 ± 3
	sušené	HepG2	82 ± 4	82 ± 2	76 ± 4	75 ± 4	95 ± 8	95 ± 3	97 ± 3	100 ± 6	99 ± 3
		PaTu	77 ± 1	80 ± 2	76 ± 3	74 ± 2	84 ± 6	89 ± 2	91 ± 1	92 ± 1	94 ± 0
		HeLa	45 ± 3	46 ± 4	54 ± 0	73 ± 1	87 ± 4	92 ± 4	92 ± 3	97 ± 2	97 ± 3
	vařené	HepG2	73 ± 7	82 ± 17	76 ± 4	78 ± 5	90 ± 5	98 ± 6	96 ± 4	94 ± 6	100 ± 4
		PaTu	68 ± 4	65 ± 7	68 ± 2	70 ± 3	83 ± 2	89 ± 2	91 ± 1	92 ± 2	97 ± 4
		HeLa	44 ± 1	44 ± 5	66 ± 11	76 ± 1	89 ± 7	92 ± 7	90 ± 4	94 ± 7	97 ± 4
	čerstvé	HepG2	34 ± 10	44 ± 10	75 ± 9	88 ± 13	89 ± 3	92 ± 10	93 ± 7	98 ± 11	100 ± 7
		PaTu	40 ± 3	57 ± 0	83 ± 9	84 ± 0	89 ± 0	91 ± 1	92 ± 2	91 ± 0	95 ± 0
		HeLa	15 ± 1	17 ± 1	53 ± 2	81 ± 5	87 ± 10	90 ± 7	91 ± 7	95 ± 9	100 ± 8

Z tab. 4 je zřejmé, že životaschopnost buněk testovaných nádorových linií je nejnižší při ošetření vodným extraktem čerstvých plodnic *L. edodes*. Pro všechny tři linie u něj lze v rozsahu testovaných koncentrací stanovit inhibiční koncentraci IC_{50}, tedy takovou, při které dojde k buněčné smrti u právě poloviny buněk. Hodnota IC_{50} u extraktu čerstvých plodnic je nejvyšší pro buňky PaTu (6 ± 2 mg/ml), nižší pro HepG2 (5 ± 2 mg/ml) a vůbec nejvíce aktivní byl tento extrakt vůči buňkám HeLa (1 ± 0 mg/ml).

Během tepelných úprav shiitake došlo k významnému snížení cytotoxické aktivity připravených vodných extraktů, a to do té míry, že hodnoty IC_{50} bylo možné určit (vzhledem ke zvolené škále koncentrací testovaných extraktů a bez využití jakýchkoli predikčních programů) jen pro nádorovou buněčnou linii HeLa. Pro vodné extrakty z hub pražených, sušených a vařených odpovídá 50% inhibiční koncentrace pro buňky HeLa

hodnotám 4 ± 0; 4 ± 1 resp. 4 ± 0 mg/ml. Buňky rakoviny děložního čípku tedy zůstávají vůči vodným extraktům nejcitlivější bez ohledu na způsob tepelného zpracování hub.

Mezi jednotlivými typy tepelných úprav *L. edodes* nejsou (co se cytotoxicity testovaných nádorových buněčných linií týká) žádné statisticky významné rozdíly. Ze získaných výsledků tedy nelze doporučit jednu konkrétní tepelnou úpravu plodnic, která by byla z hlediska cytotoxického efektu pro lidský organismus nejvhodnější. Nejvyšší účinnost extraktů lze vysledovat proti buňkám nádorové linie HeLa, méně účinné jsou extrakty vůči PaTu a takřka imunní jsou vůči ošetření vodným extraktem buňky HepG2, ačkoli podle dostupných informací patří buňky rakoviny jater zpravidla k těm vůbec nejcitlivějším (154).

Z naměřených dat je zřejmé, že z testovaných vodných extraktů nejvíce potlačuje životaschopnost nádorových buněk ten, při jehož přípravě nebyla zvýšena teplota nad 30 °C během celého procesu zpracování. To může naznačovat, že se zvyšující se teplotou zpracování hub patrně dochází k degradaci v nich přítomných cytotoxicky účinných látek a tím ke snižování účinnosti vůči testovaným rakovinným buňkám HeLa, PaTu i HepG2.

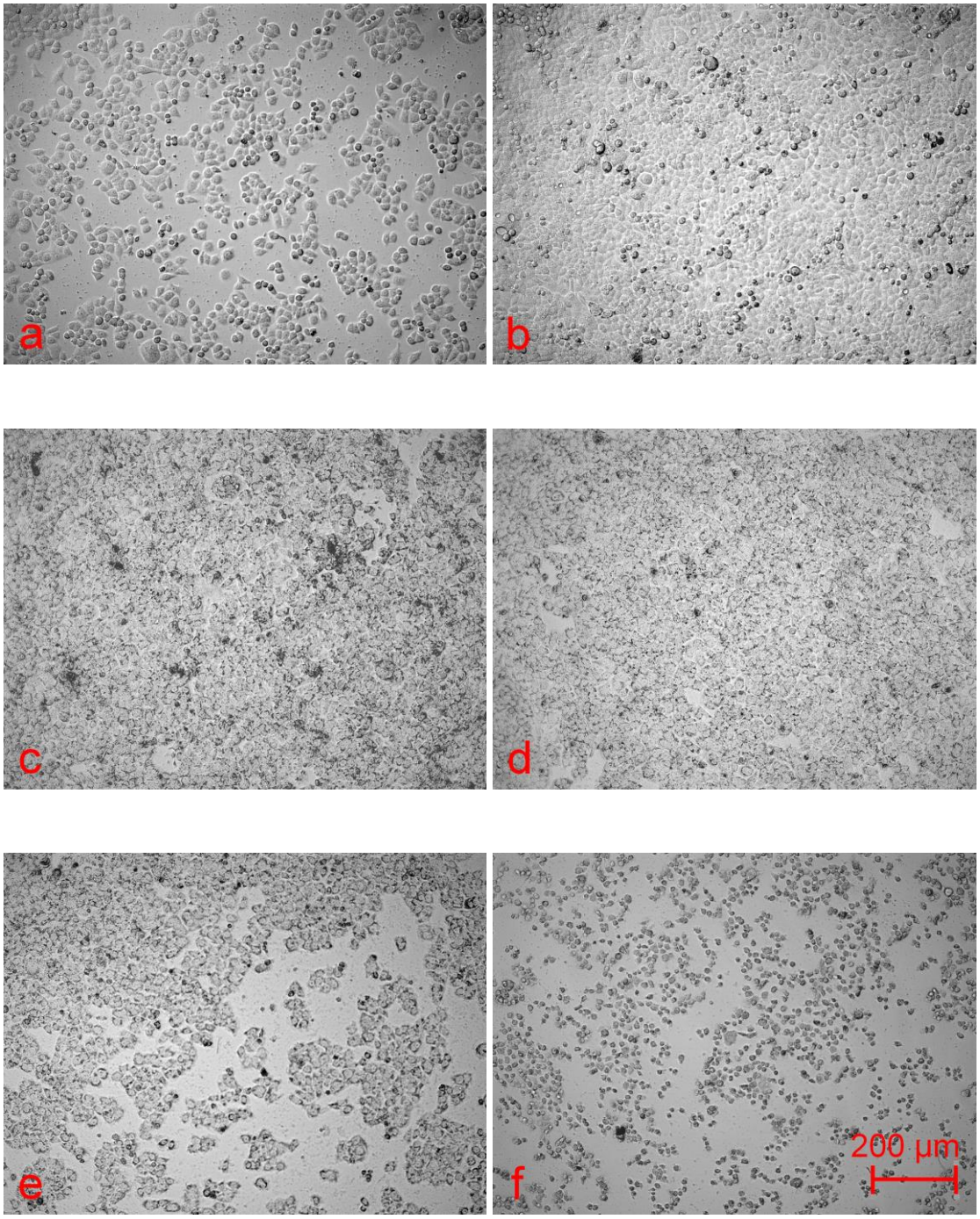
Časosběrná mikroskopie pro buněčné linie HeLa, PaTu a HepG2 po aplikaci extraktů

K vizuálnímu zmapování změn buněk po ošetření extraktem byla využita časosběrná mikroskopie. U všech typů testovaných nádorových buněčných linií byl po jejich ošetření extraktem cytotoxický efekt vizuálně patrný.

Na obr. 22a jsou zobrazeny buňky linie HeLa před započetím experimentu. Je zřejmé, že buňky jsou rovnoměrně rozptýlené, mají dostatek prostoru ve svém okolí a některé se dělí (mají pravidelný kulatý tvar, neboť během dělení nejsou adherovány na dno mikrotitrační jamky). Na obr. 22b jsou tytéž buňky linie HeLa bez ošetření extraktem, ovšem o 48 hodin později. Mezi jednotlivými buňkami již nejsou vidět volné prostory, buňky vyplnily celé dno mikrotitrační jamky a některé se stále dělí. Za 48 hodin se při optimálních podmínkách buňky rozdělily 2,3×. Obr. 22c dokládá situaci po 48 hodinách od aplikace vodného extraktu o koncentraci 10 mg/ml připraveného z pražených plodnic. Z videonahrávky je zřejmé, že buňky se za celou dobu expozice vůbec nerozdělily či se rozdělily minimálně (dělily se pouze první dvě hodiny po aplikaci extraktu). Během dalších dvou hodin začíná docházet ke ztrátě jejich adherentních vlastností a kondenzaci organel a po deseti hodinách od ošetření extraktem dojde i ke ztrátě jejich mobility následované nekrózou. Na obr. 22d je zachycena situace

nádorové buněčné linie HeLa po 48 hodinách po ošetření vodným extraktem o koncentraci 10 mg/ml připraveným ze sušených plodnic *L. edodes*. Ze snímku je patrné, že buňky jsou více odolné vůči ošetření extraktem ze sušených než z pražených hub, což odpovídá výsledkům MTT testu (tab. 4). Po 18 hodinách začínají buňky děložního čípku vakuolizovat a za pomoci mikroskopu jsou lépe zřetelné další organely buňky. Po 24 hodinách se přestávají buňky dělit, avšak přežívají a částečně mobilní zůstává až do ukončení experimentu (48 hodin) většina z nich. První ojedinělé známky nekrózy se objevily po 32 hodinách. Obr. 22e dokládá situaci po 48 hodinách po ošetření vodným extraktem o koncentraci 10 mg/ml připraveným z vařených hub. Po 20 hodinách od ošetření extraktem dochází ke zvětšování buňek a zakoncentrovávání buněčného obsahu. Ještě po 40 hodinách se buňky (byť výjimečně) dělí a první známky nekrózy se objevují po 42 hodinách. Poté buňky začínají nekrotizovat ve větším množství, avšak většina zůstává mobilní do ukončení experimentu (48 hodin). Obr. 22f mapuje situaci po 48 hodinách od aplikace vodného extraktu o koncentraci 10 mg/ml připraveným z čerstvých hub bez předchozí tepelné úpravy. Buňky se během experimentu vůbec nerozdělily, ihned se začínají deformovat a jsou patrné známky nekrózy. Během první hodiny dochází k vylévání buněčného obsahu a v průběhu 5 hodin k nekróze všech buněk.

Závěrem lze konstatovat, že výsledky časosběrné mikroskopie korelovaly s výsledky MTT testu. Bylo potvrzeno, že buňky rakoviny děložního čípku (HeLa) nejvíce reagují na ošetření vodným extraktem z čerstvých, tepelně neupravených shiitake. Reakce buněk linie HeLa na tento extrakt při zvolené koncentraci byla natolik intenzivní, že v další fázi bylo přistoupeno k hledání sloučeniny, která je za tento vysoký cytotoxický efekt zodpovědná (viz dále).



Obr. 22: Časosběrná mikroskopie – buňky HeLa a) před aplikací extraktu; b) po 48 hodinách bez ošetření extraktem; c) po 48 hodinách od aplikace vodného extraktu pražených hub; d) po 48 hodinách od aplikace vodného extraktu sušených hub; e) po 48 hodinách od aplikace vodného extraktu vařených hub; f) po 48 hodinách od aplikace vodného extraktu čerstvých hub.

Cytotoxické vlastnosti lenthioninu

Mezi v lékařství běžně používaná chemoterapeutika patří např. bleomycin, busulfan či thiotepa (155, 156, 157). Všechny tyto sloučeniny spojuje (kromě ověřených a hojně využívaných cytostatických účinků) přítomnost síry v jejich molekulách. U lenthioninu (**III**), nejvýznamnější sirné sloučeniny zpracovaných plodnic *L. edodes*, dosud cytotoxická aktivita testována nebyla. V této práci byl proto sledován vliv aplikace lenthioninu na životaschopnost nádorových buněčných linií HeLa, PaTu a HepG2. Výsledky těchto experimentů jsou shrnuty v tab. 5.

Tab. 5: Životaschopnost buněčných nádorových linií po ošetření lenthioninem (v %).

	$c_{lenthioninu}$ (μmol/l)	108,9	54,45	10,89	5,445	1,089	0,545	0,109	0,054
Životaschopnost buněk (%)	HepG2	100 ± 3	100 ± 9	100 ± 5	99 ± 2	98 ± 2	98 ± 3	100 ± 3	97 ± 4
	PaTu	79 ± 5	79 ± 1	88 ± 3	95 ± 3	97 ± 7	100 ± 6	100 ± 3	99 ± 3
	HeLa	64 ± 6	85 ± 6	91 ± 5	92 ± 5	93 ± 5	98 ± 8	98 ± 3	88 ± 6

Z tab. 5 je zřejmé, že lenthionin (**III**) je vůči rakovinným jaterním buňkám (HepG2) zcela neúčinný. Buňky rakoviny slinivky (PaTu) již na aplikaci lenthioninem zareagovaly, avšak cytotoxický efekt byl poměrně nízký. Vůbec nejvyšší cytotoxicitu z testovaných nádorových buněčných linií vykazoval lenthionin vůči buňkám rakoviny děložního čípku (HeLa). Bohužel ani pro buněčnou linii HeLa však nebylo možné (bez predikčního programu) určit přesnou hodnotu IC_{50} z důvodu nedostatečné rozpustnosti lenthioninu v ethanolu či jiných (v MTT testu běžně používaných) rozpouštědlech. Hodnoty IC_{50} se u běžně využívaných chemoterapeutik (pochopitelně v závislosti na typu buněk a daného chemoterapeutika) pohybují v desetinách až jednotkách μg na ml roztoku (158, 159), zatímco maximální koncentrace použitá ke stanovení cytotoxicity lenthioninu v této práci byla 108,9 μmol/l, což odpovídá koncentraci 20,5 μg/ml (jedná se o maximální možnou koncentraci, které lze dosáhnout rozpuštěním lenthioninu v ethanolu).

Ačkoli by se samotný lenthionin (**III**) z důvodu velmi omezené rozpustnosti jako chemoterapeutikum pravděpodobně neosvědčil, potenciálně zajímavý by mohl být jeho účinek ve spojení s běžnými chemoterapeutiky. Je možné, že by docházelo ke sčítání či dokonce násobení účinků obou látek a vzhledem k jeho poměrně vysoké antimikrobiální

aktivitě vůči kvasinkám, bakteriím i plísním (viz další kapitoly) by mohl být chemoterapeutiky oslabený lidský organismus méně náchylný k infekcím.

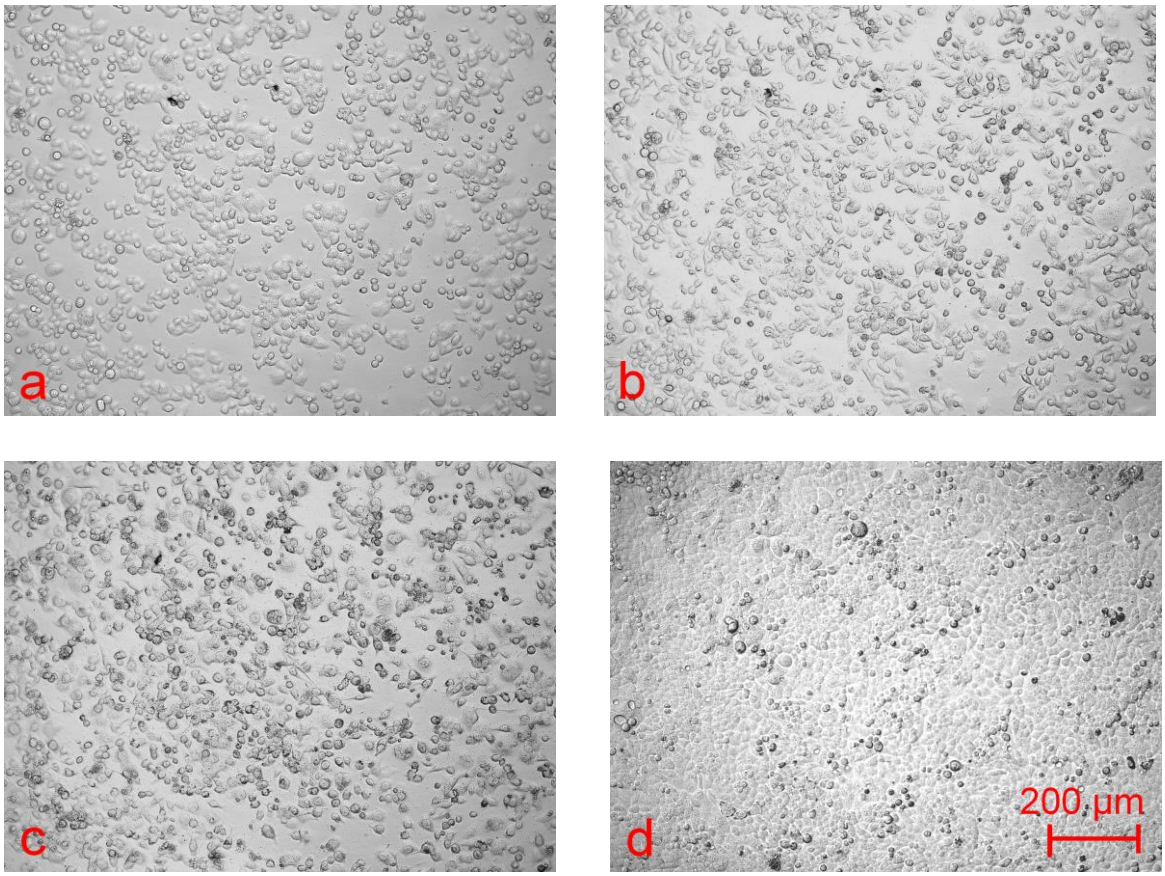
Časosběrná mikroskopie pro buněčné linie HeLa, PaTu a HepG2 po ošetření lenthioninem

Po přidání roztoku lenthioninu (108,9 µmol/l) k buňkám HepG2 byla po 48 hodinách za pomoci časosběrné mikroskopie pozorována 100% životaschopnost buněk. Zároveň byl sledován nárůst počtu buněk, jenž byl takřka totožný s přírůstkem buněk kontrolních. Aplikace lenthioninu tedy neměla žádný statisticky významný vliv na chování HepG2 buněk, což odpovídá i výše popsaným datům získaným pomocí MTT testu.

Pozorovatelný vliv neměl přídavek lenthioninu ani na buněčnou linii PaTu. Dle výsledku z MTT testu sice došlo po přídavku lenthioninu k mírnému snížení životaschopnosti buněk rakoviny slinivky břišní (na 79 ± 5 %), avšak vizuálně žádné morfologické změny pozorovány nebyly.

Na obr. 23a jsou vidět buňky rakoviny děložního čípku (HeLa) ihned po aplikaci roztoku lenthioninu (108,9 µmol/l). Je patrné, že buňky jsou rovnoměrně rozptýlené, mají dostatek prostoru k rozmnožování a některé se právě dělí. Po aplikaci lenthioninu se během prvních tří hodin začínají buňky zvětšovat a již po pěti hodinách začíná být na některých buňkách zřejmé vytváření nepravidelných záhybů cytoplazmatické membrány (tzv. „*blebbing*“), jakási předzvěst apoptózy, tedy programované buněčné smrti. Na obr. 23b je zachycen stav po 24 hodinách od aplikace lenthioninu. Na fotografii prakticky nejsou vidět množící se buňky (žádné nemají kulovitý tvar), většina z nich je adherována a některé jsou prasklé. Počet buněk zůstává prakticky identický s počátečním stavem, k jejich rozmnožení nedošlo. Na obr. 23c je zachycen stav po 48 hodinách od ošetření buněk lenthioninem. Ze srovnání s obr. 23b je zřejmé, že došlo k odumření velkého množství buněk, část buněk vytváří cytoplazmatické výběžky a další vakuolizují. Je pravděpodobné, že při delší expozici by došlo ke smrti ještě většího počtu buněk. Na první pohled je s tímto tvrzením v částečném rozporu výsledek získaný pomocí MTT testu, podle kterého je životaschopnost buněk HeLa po aplikaci lenthioninu snížena přibližně o jednu třetinu (na 64 ± 6 %). Vysvětlit to lze tím, že navzdory buněčné smrti takřka poloviny buněk (po 48 hodinách od jejich ošetření lenthioninem) je metabolická aktivita buněk dosud žijících zvýšená, a dochází tak k falešně negativnímu výsledku MTT testu. Tento výsledek dokládá správně zvolenou kombinaci MTT testu a časosběrné

mikroskopie (neboť ani jedna z metod nezachycuje přesnou situaci) a taktéž potřebu delší expozice buněk testovanou látkou, než je běžně používaných 24 hodin. Na obr. 23d je zachycen stav kontrolních rakovinných buněk po 48 hodinách (tedy buněk, na které neměl vliv přídavek jakékoli látky či extraktu).



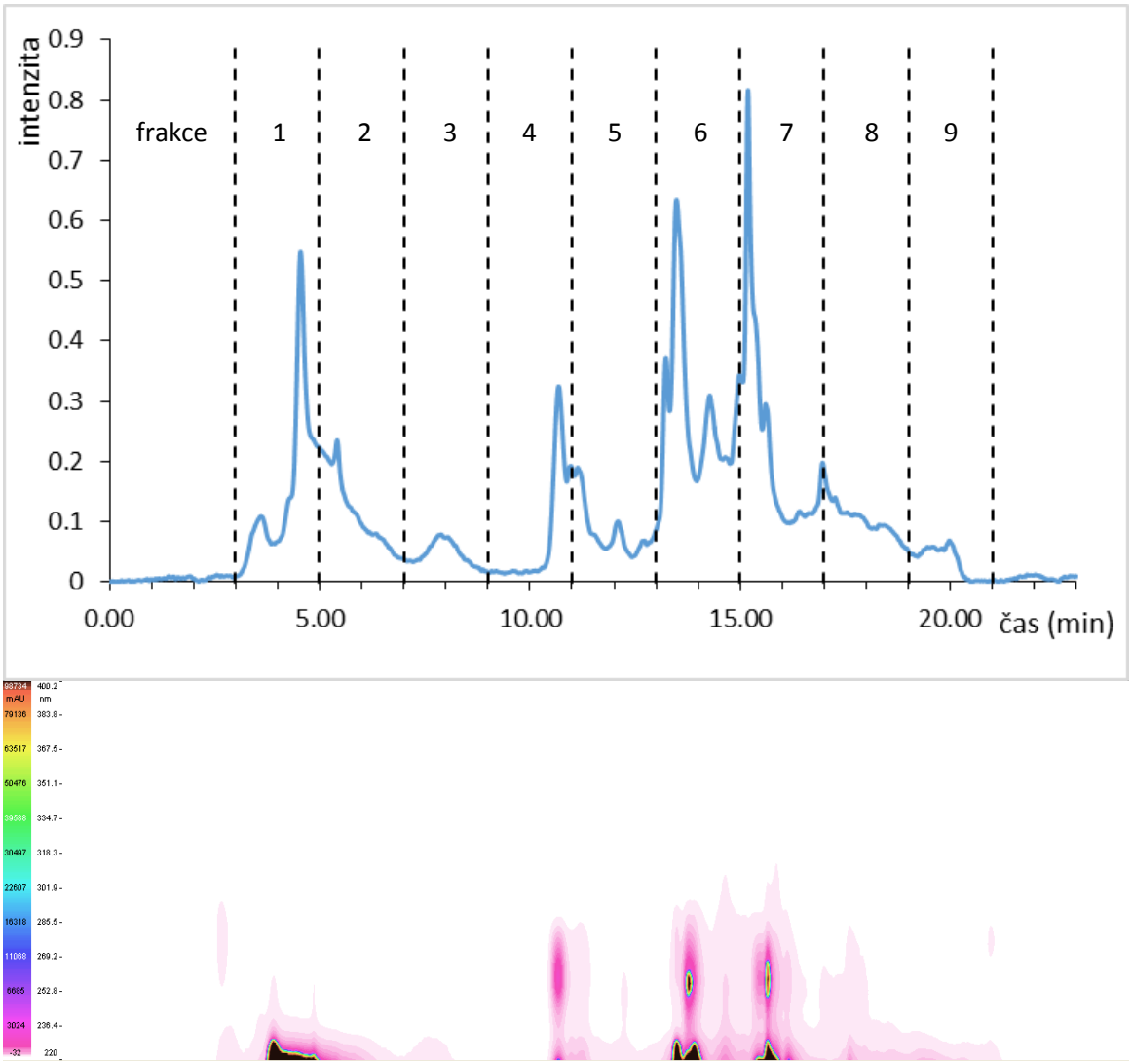
Obr. 23: Časosběrná mikroskopie – buňky linie HeLa a) před aplikací lenthioninu; b) po 24 hodinách od aplikace lenthioninu; c) po 48 hodinách od aplikace lenthioninu; d) po 48 hodinách bez aplikace lenthioninu.

Frakcionace vodného extraktu čerstvých plodnic *L. edodes*

Vzrůstající rezistence rakovinných buněk na v současnosti používané léky, jakož i zvýšený výskyt nových typů karcinomů jsou dostatečným důvodem k hledání nových protirakovinných látek. Některé ze sekundárních metabolitů rostlin i hub jsou potenciálně zajímavé pro vývoj léků tohoto typu. *L. edodes* obsahuje celou řadu sekundárních metabolitů, a je proto vhodným kandidátem k cytotoxikologickým testům.

Většina běžně používaných léčiv působí vůči určitému typu rakovinné linie. Z výsledků popsaných v předchozích oddílech vyplývá, že z testovaných vodných

extraktů *L. edodes* vykazoval nejsilnější cytotoxický účinek ten, který byl připraven z čerstvých, tepelně neošetřených plodnic, přičemž nejvíce působil na nádorovou linii buněk rakoviny děložního čípku (HeLa). Proto byla při hledání látky/látek, které jsou za tuto aktivitu zodpovědné, další pozornost zaměřena právě na buněčnou linii HeLa a vodný extrakt čerstvých plodnic *L. edodes*.



Obr. 24: HPLC−PDA chromatogram vodného extraktu čerstvých plodnic *L. edodes*.

Vodný extrakt čerstvých plodnic byl analyzován pomocí HPLC−PDA (metoda H5). Při opakovaných nástřicích tohoto extraktu bylo poté jímáno celkem 9 frakcí, které se z kolony eluovaly ve dvouminutových intervalech, jak je patrné z obrázku 24. Každá z těchto najímaných frakcí byla lyofilizována a následně byla testována jejich cytotoxická aktivita vůči nádorové buněčné linii HeLa. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

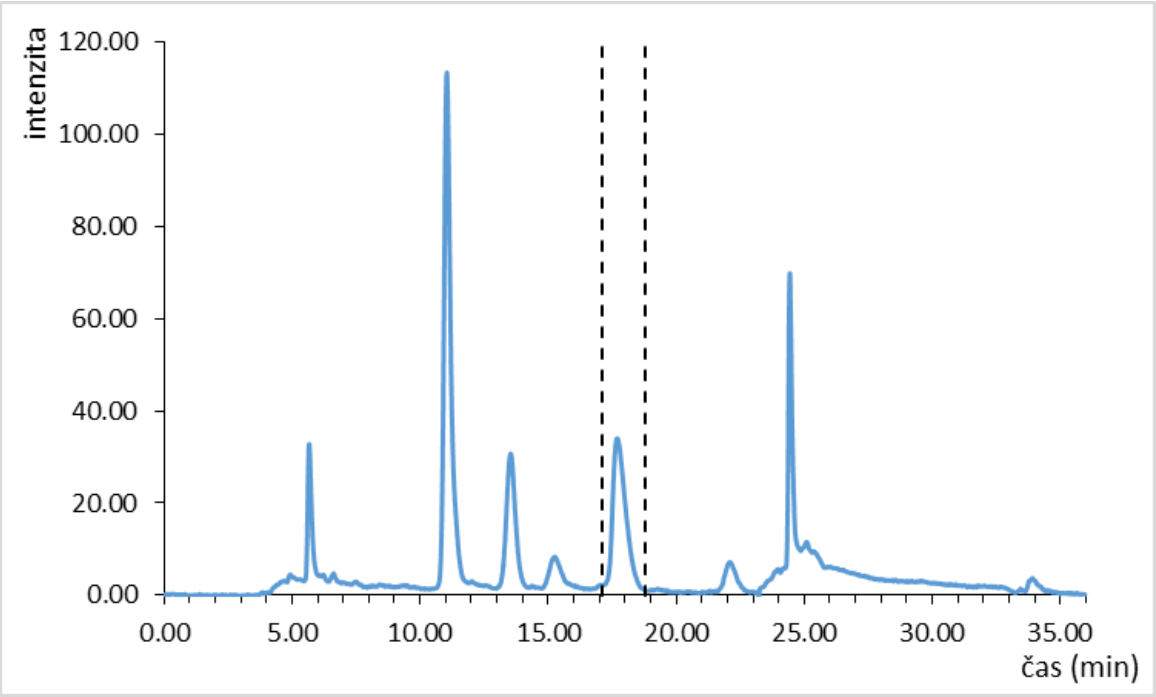
Tab. 6: Životaschopnost buněk rakoviny děložního čípku (HeLa) po ošetření jednotlivými frakcemi.

Frakce č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Životaschopnost (%)	70,3	91,6	88,6	80,2	61,6	58,4	51,4	72,6	92,2

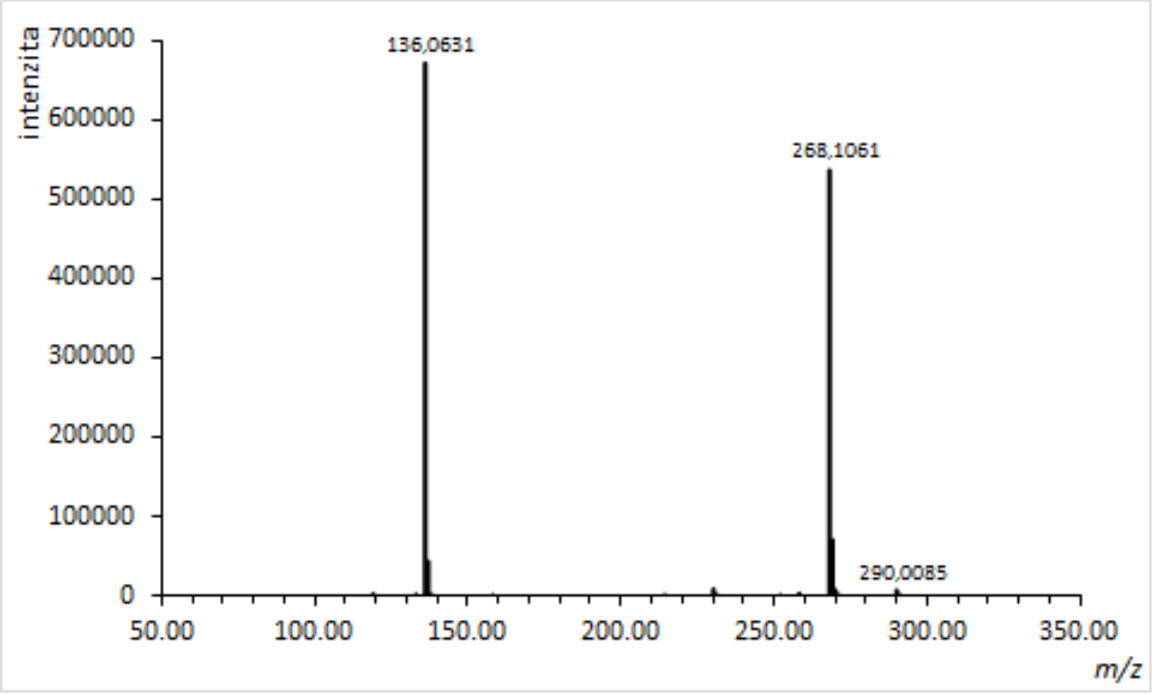
Z tab. 6 je zřejmé, že nejvíce aktivní frakce z testovaného extraktu jsou frakce 5, 6 a 7. Tyto frakce byly (ve snaze identifikovat v nich přítomné cytotoxicky aktivní sloučeniny) dále rozděleny pomocí optimalizovaných HPLC metod. Následně byly opět jímány jednotlivé frakce, ovšem tentokrát již ne ve stejných časových intervalech, ale dle odezvy PDA detektoru. Poté byly získané frakce opět podrobeny MTT testu.

Z frakce č. 5 byla nejvíce cytotoxicky aktivní oblast látek s retenčním časem 16,8−19,1 minut (metoda H3). Při $\lambda = 280$ nm odpovídá této oblasti pík dobře oddělený od okolních analytů (viz obr. 25). K ověření čistoty této frakce a určení její identity byla využita technika HPLC−HRMS (metoda H6, viz obr. 26). Na získaném MS spektru je dobře vidět přítomnost iontů $[M + H]^+ = 268{,}1061$ Da a $[M + Na]^+ = 290{,}0085$ Da, které odpovídají sumárnímu vzorci $C_{10}H_{13}N_5O_4$. V MS/MS spektru této látky byl přítomen dominantní fragment *m*/*z* 136,0631 Da odpovídající buď iontu $[C_7H_8N_2O]^+$ (*m*/*z* = 136,0631 Da), nebo iontu $[C_5H_6N_5]^+$ (*m*/*z* = 136,0618 Da). Z těchto MS dat bylo možné jednoznačně usoudit, že tato cytotoxicky aktivní látka není polysacharid, u kterého by se protinádorová aktivita dala očekávat, a ani žádná dosud v *L. edodes* identifikovaná sloučenina. Vzhledem ke zjištěnému sumárnímu vzorci se mohlo jednat o molekulu adenosinu, neuraminové kyseliny či miserotoxinu, případně o jinou, dosud neznámou látku. Ze srovnání MS a chromatografických charakteristik neznámé látky se standardem adenosinu posléze vyplynulo, že touto cytotoxicky aktivní látkou je právě adenosin (vykazoval stejnou MS fragmentaci i retenční čas).

Ačkoliv adenosin doposud nebyl dáván do souvislosti s protirakovinnými účinky shiitake, cytotoxická aktivita této látky je poměrně dobře známa. Bylo například zjištěno, že adenosin je schopen vyvolat apoptózu HepG2 i HL-60 buněčných linií (160, 161, 162).



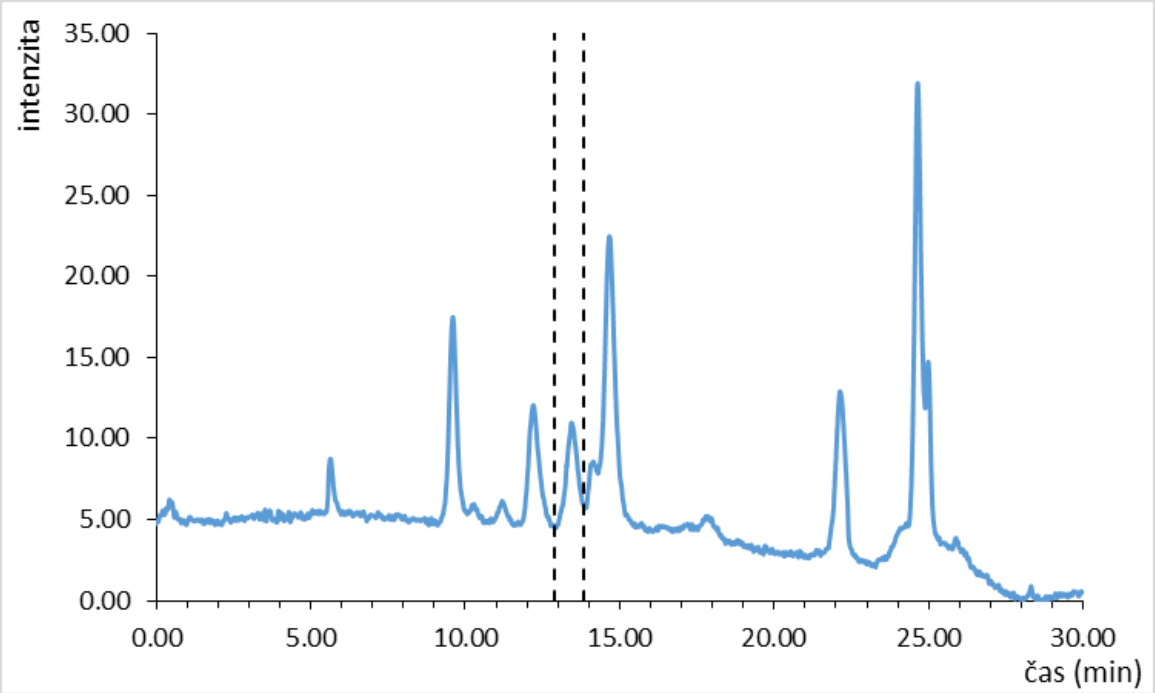
Obr. 25: HPLC chromatogram frakce 5 z vodného extraktu *L. edodes.*



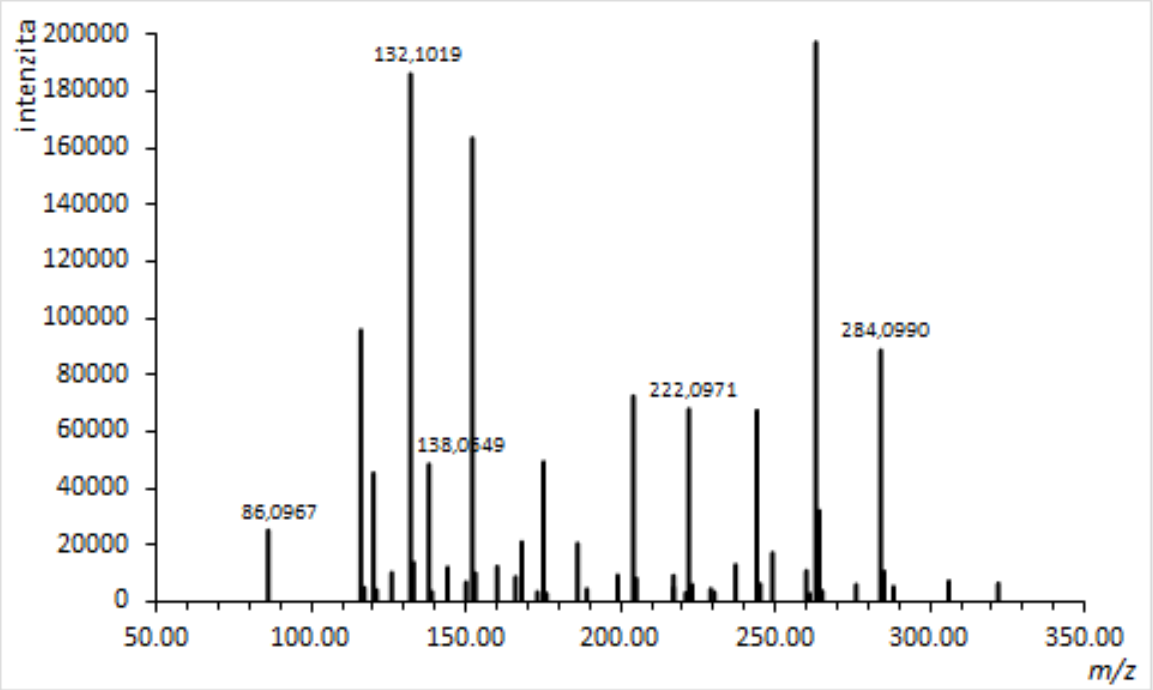
Obr. 26: (+)ESI−HRMS spektrum části frakce 5 s retenčním časem 17,8 minuty.

Z frakce č. 6 byla nejvíce cytotoxicky aktivní oblast s retenčním časem 12,9−13,8 min (metoda H4). Při λ = 280 nm odpovídá této oblasti analyt zvýrazněný na obr. 27. Opět z důvodu kontroly čistoty byla tato oblast analyzována pomocí (+)ESI−HRMS metodou H6 (obr. 28). Ze získaného hmotnostního spektra bohužel nebylo možné jednoznačně určit elementární složení látky, která je za cytotoxickou aktivitu zodpovědná, jelikož získaná frakce byla směsí několika sloučenin. V (+)ESI−MS spektru byly přítomny dva hlavní $[M + H]^+$ ionty, a sice $[M + H]^+$ = 284,0990 Da (a z něj dle MS/MS vzniklé ionty s *m/z* = 152,0567, 132,1019 a 86,0967 Da) a $[M + H]^+$ = 222,0971 Da (a z něj dle MS/MS vzniklý ion s *m/z* = 138,0549 Da). První ze zmíněných látek poskytovala výrazně intenzivnější MS signál, přesto však nelze jednoznačně tvrdit, že je za pozorovaný cytotoxický efekt zodpovědná právě ona. Bohužel se ale nepodařilo optimalizovat metodu do takové míry, aby bylo možné tyto dvě sloučeniny od sebe chromatograficky zcela oddělit a každou zvlášť otestovat.

Po optimalizaci metody vhodné k separaci analytů z frakce 7 bylo zjištěno, že žádná z frakcí není cytotoxicky aktivní, ačkoli kompletní frakce 7 aktivní je. V tomto případě došlo zřejmě ke kombinaci cytotoxických efektů více sloučenin, které však jednotlivě vykazují pouze mírnou cytotoxickou aktivitu (synergický efekt).



Obr. 27: HPLC chromatogram frakce 6 z vodného extraktu *L. edodes*.



Obr. 28: (+)ESI−HRMS spektrum části frakce 6 pro čas 13,4 minuty.

5.2.2 Antimikrobiální aktivita lenthioninu a vodných extraktů shiitake

Antimikrobiální aktivita vodných extraktů plodnic shiitake a lenthioninu byla sledována pomocí mikrodiluční metody. Tato metoda umožňuje určit hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC), za kterou je považována taková koncentrace testované látky, která inhibuje množství daného mikroorganismu v mikrotitrační jamce nejméně z 80 %. Antimikrobiální aktivita byla testována proti sedmi druhům bakterií, a to *Enterococcus faecalis* (*Ef*), *Escherichia coli* (*Ec*), vyskytujících se v zažívacím traktu člověka a teplokrevných živočichů, *Bacillus cereus* (*Bc*), způsobujících potravinové intoxikace, *Micrococcus luteus* (*Ml*), napadajících kůži savců a člověka a dále proti fytopatogenním bakteriím *Erwinia amylovora* (*Ea*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), napadajících řadu hospodářsky významných plodin z čeledi lilkovitých (např. rajčata, brambory či papriky) a z čeledi růžovitých (např. jabloně a hrušně). Do těchto testů byly zahrnuty také dva druhy kvasinek, *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) a *Candida albicans* (*Ca*), jakož i tři druhy plísní, a to *Rhizoctonia solani* (*Rs*), *Fusarium solani* (*Fs*) a *Aspergillus niger* (*An*).

Tab. 7: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaných extraktů a lenthioninu (**III**) (v μg/ml).

testované vzorky	**bakterie**							**kvasinky**		**plísně**		
	Ec	***Ml***	***Bc***	***Ef***	***Ea***	***Xav***	***Cms***	***Ca***	***Sc***	***Fs***	***Rs***	***An***
pražené	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
sušené	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
vařené	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
čerstvé	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
lenthionin	128	64	64	128	32	8	64	8	8	2	4	4
ampicilin	4	0,25	16	0,5	2	8	0,062	−	−	−	−	−
gentamicin	8	1	1	32	2	4	1	−	−	−	−	−
tetracyklin	1	0,125	0,031	16	0,25	0,25	0,062	−	−	−	−	−
chloram-fenikol	8	2	4	4	0,5	4	2	−	−	−	−	−
tioconazol	−	−	−	−	−	−	−	2	0,031	4	8	4

na − neaktivní (MIC > 512 μg/ml)

Zjištěné hodnoty MIC testovaných extraktů a lenthioninu jsou uvedeny v tab. 7. Jak je z této tabulky patrné, žádný z vodných extraktů *L. edodes* nevykazoval antimikrobiální aktivitu vůči žádnému z testovaných mikroorganismů ani při nejvyšší studované koncentraci, tj. 512 μg/ml. Toto pozorování se může zdát být v rozporu s několika dříve publikovanými vědeckými studiemi, které popsaly výraznou antimikrobiální aktivitu shiitake (54, 80, 163, 164). Je ovšem třeba mít na paměti, že v těchto studiích byly testovány extrakty o výrazně vyšší koncentraci (10−50 mg/ml), popř. extrakty získané pomocí organických rozpouštědel (např. chloroformu, ethyl-acetátu). Naopak v této práci byla sledována antimikrobiální aktivita vodných extraktů při mnohem nižších koncentracích, jejichž testování věrněji odpovídá biologickým efektům, které lze pozorovat při konzumaci přiměřeného množství shiitake.

Na rozdíl od vodných extraktů lenthionin antimikrobiální aktivitu vůči všem testovaným kmenům vykázal, přičemž hodnoty MIC se pohybovaly v rozmezí 2−128 μg/ml. Antimikrobiální aktivita lenthioninu vůči bakteriím nebyla příliš vysoká (MIC 64−128 μg/ml), zatímco například allicin, hlavní antimikrobiální složka česneku (*Allium sativum* L.), vykazoval vůči stejnému souboru bakterií hodnotu MIC 32 μg/ml. Mnohem významněji byl lenthionin schopen inhibovat růst všech testovaných kmenů kvasinek (MIC 8 μg/ml) a zejména pak plísní (MIC 2−4 μg/ml). Lenthionin tak vykazoval

srovnatelnou či dokonce vyšší (*Rhizoctonia solani* a *Fusarium solani*) aktivitu než běžně komerčně používané antibiotikum tioconazol.

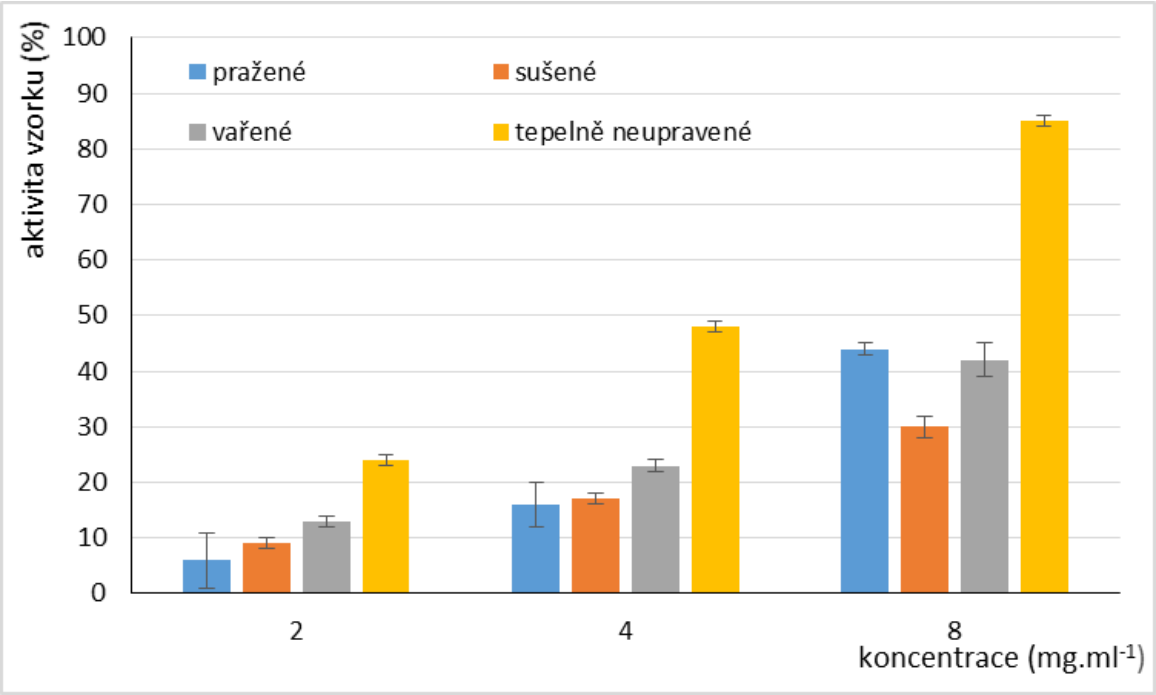
Antimikrobiální aktivita lenthioninu byla studována již v 70. letech 20. století např. Moritem *et al*. (77), a to proti bakteriálnímu kmenu *Escherichia coli* a kvasinkám *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae*. Hodnota MIC pro *E. coli* zjištěná v této práci je ve srovnání s výsledky Morita *et al*. takřka poloviční (128 resp. 250 μg/ml), naopak hodnoty MIC pro testované kvasinky jsou srovnatelné s výsledky zjištěnými v této práci (8 resp. 6,25 μg/ml). Porovnání získaných výsledků s dříve publikovanou prací Mority *et al*. není však zcela korektní, neboť se obě práce lišily jednak podmínkami kultivace (zejména teplotou), tak i většinou kmenů testovaných mikroorganismů a použitým živným médiem.

Na základě získaných dat lze tedy konstatovat, že lenthionin patří mezi sloučeniny s poměrně vysokou antimikrobiální aktivitou vůči kvasinkám a zejména plísním, proti kterým vykazuje srovnatelnou aktivitu jako běžně využívané antibiotikum tioconazol. Mechanismus antimikrobiálního účinku lenthioninu nebyl detailně zkoumán, ale lze předpokládat, že by mohl souviset s jeho interakcí s thiolovými skupinami proteinů, které mají pro daný mikroorganismus vitální funkce, podobně jako je tomu v případě allicinu z česneku.

5.2.3 Antioxidační aktivita lenthioninu a vodných extraktů shiitake

Antioxidační aktivita připravených vodných extraktů plodnic *L. edodes* byla testována metodami DPPH a ABTS dle Kima *et al*. (149). Získané výsledky jsou uvedeny na obr. 29 resp. obr. 30.

Z obrázku 29 je zřejmé, že při všech testovaných koncentracích vodných extraktů (2; 4 resp. 8 mg/ml) má nejvyšší schopnost zhášet syntetický radikál DPPH extrakt z čerstvých plodnic (24 ± 1; 48 ± 1 resp. 85 ± 1 %). Ve srovnání s výše uvedenou vědeckou prací (149) je antioxidační schopnost testovaného extraktu vyšší pro všechny sledované koncentrace, a to přibližně dvojnásobně. Rozdíl pozorovaný mezi výsledky popsanými v této práci a dříve publikovaným článkem může pravděpodobně spočívat v jiném způsobu přípravy vzorku, neboť Kim *et al*. používali pouze vnitřní část klobouků plodnic. Významný vliv mohla mít také odlišná odrůda shiitake, období sklizně, typ substrátu, na kterém byly houby pěstovány, jejich stáří či časový úsek mezi sklizní a vlastním zpracováním hub.



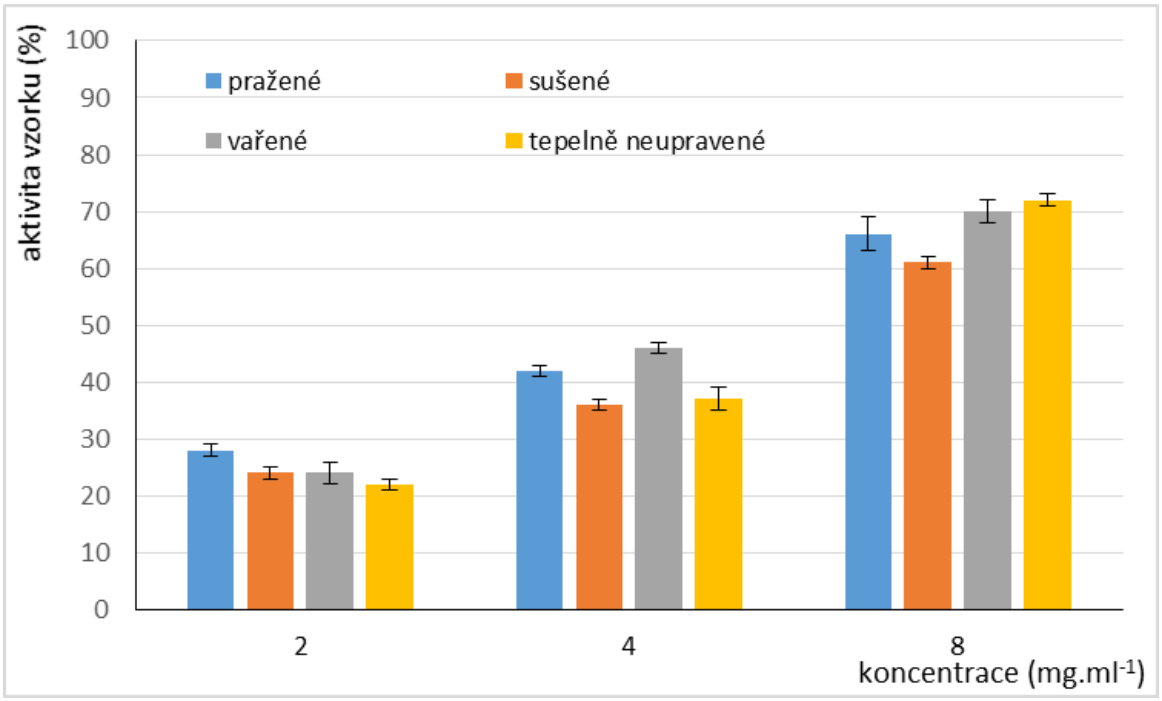
Obr. 29: Stanovení antioxidační aktivity vodných extraktů plodnic *L. edodes* metodou DPPH.

Jak je z obrázku 29 patrné, antioxidační aktivita kulinárně zpracovaných hub byla výrazně nižší. Pro koncentrace 2 a 4 mg/ml vykazoval nejnižší antioxidační aktivitu vodný extrakt z pražených hub, a to pouze 6 ± 5 resp. 16 ± 4 %. Důvodem této nízké aktivity může být buď vznik nových radikálů, ke kterému dochází během této tepelné úpravy, nebo tepelný rozklad některých antioxidačně působících sloučenin. Nepatrně vyšší aktivitu vykazoval vodný extrakt ze sušených hub (9 ± 1 resp. 17 ± 1 %) a nejvyšší antioxidační aktivitu z tepelně upravených vodných extraktů měl extrakt z vařených hub, a to 13 ± 1 resp. 23 ± 1 %. Pro koncentraci vodných extraktů 8 mg/ml je situace obdobná s výjimkou extraktu z pražených hub. Nejvyšší antioxidační aktivitu z tepelně opracovaných hub vykazoval právě extrakt z pražených hub (44 ± 1 %), prakticky stejná aktivita (42 ± 3 %) byla pozorována u extraktu z hub vařených a nejnižší aktivitu vykazovaly houby sušené (30 ± 2 %).

Tato pozorování jsou poněkud v rozporu s výsledky Choi *et al.* (47), kteří zahřívali shiitake při různých teplotách po různě dlouhé časové úseky, přičemž se zvyšující se teplotou a dobou ohřevu se antioxidační aktivita vzorků zvyšovala. Jako důvod tito autoři uvádějí zvýšený obsah antioxidačně působících sloučenin, především volných polyfenolických látek, které se během zahřívání uvolňují z vazeb na nerozpustné

polymerní sloučeniny. Dalším důvodem by mohla být tvorba zcela nových látek s antioxidačními vlastnostmi (47, 165).

Z obr. 30 je zřejmé, že pro radikál ABTS je situace dosti odlišná, neboť všechny testované extrakty vykazovaly velmi podobnou antioxidační aktivitu. Aktivita vodného extraktu čerstvých plodnic nebyla výrazně vyšší oproti aktivitě vodných extraktů kulinárně zpracovaných, dokonce pro koncentrace 2 a 4 mg/ml měl nejnižší antioxidační schopnost právě vodný extrakt z čerstvých plodnic (22 ± 1 resp. 37 ± 2 %).



Obr. 30: Stanovení antioxidační aktivity vodných extraktů *L. edodes* metodou ABTS.

Na obr. 31 jsou uvedeny výsledky měření antioxidační aktivity lenthioninu, které byly porovnány s antioxidační aktivitou několika běžně používaných antioxidantů. Podobně jako v předchozích experimentech byla koncentrace lenthioninu maximální možná, neboť k testování antioxidační aktivity byl použit jeho nasycený ethanolový roztok, tedy roztok o koncentraci 10,9 mmol/l (tj. 2,1 mg/ml) (141). Ostatní k měření používané standardy byly připraveny ve 100× nižší koncentraci. Z obrázku 31 je vidět, že navzdory o dva řády vyšší koncentraci lenthioninu oproti standardům je schopnost těchto látek vychytávat volné radikály (ABTS i DPPH) výrazně vyšší. Lenthionin eliminuje koncentraci DPPH radikálu z 9 ± 2 %, zatímco kyselina askorbová ze 42 ± 2 % (je tedy

přibližně 470× účinnější antioxidant), kyselina gallová z 87 ± 1 % (970× efektivnější antioxidant) a trolox ze 64 ± 1 % (710× účinější antioxidant).

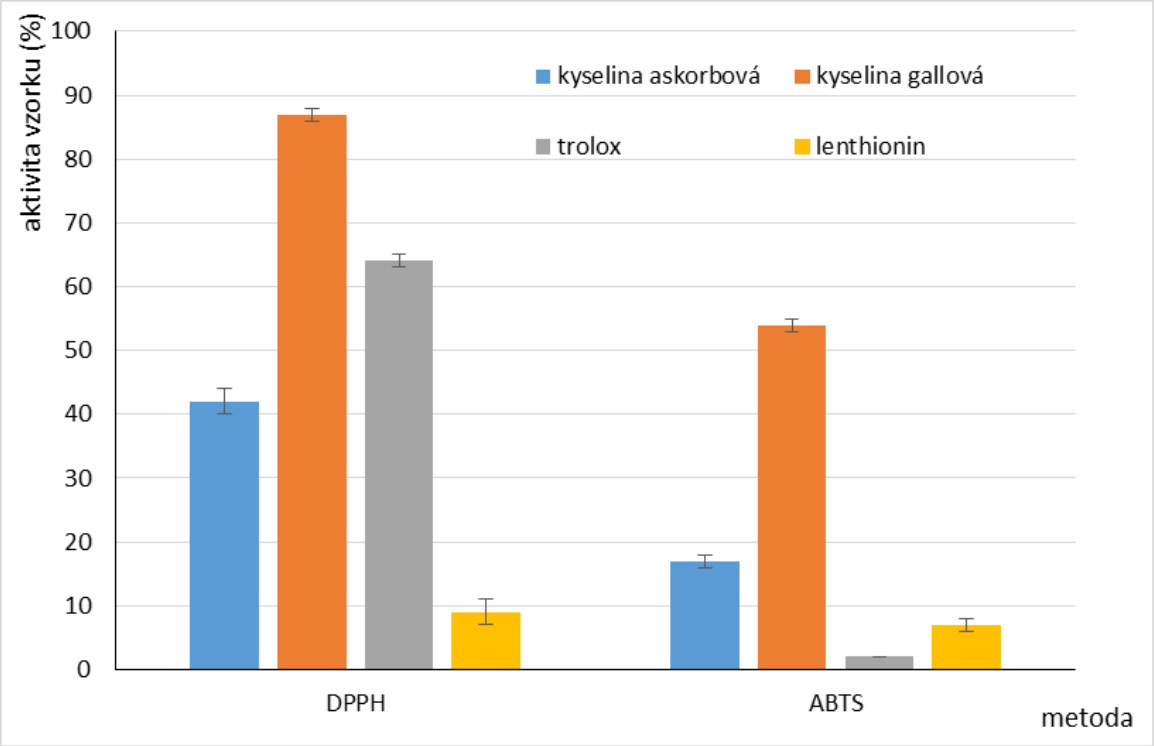
Obrázek 31 také dokládá, že schopnost lenthioninu zhášet radikál ABTS není výrazně vyšší než v případě DPPH. Nasycený ethanolový roztok lenthioninu eliminuje syntetický radikál ABTS pouze ze 7 ± 1 %, zatímco kyselina askorbová ze 17 ± 1 % (tedy je přibližně 240× účinnější antioxidant než lenthionin), kyselina gallová z 54 ± 1 % (770× efektivnější antioxidant) a trolox ze 2 ± 0 % (30× účinnější antioxidant).

Z výše uvedených dat je zřejmé, že antioxidační vlastnosti lenthioninu nejsou v porovnání s jinými antioxidanty nijak významné, a tato látka tedy pravděpodobně výrazně nepřispívá k pozorovaným antioxidačním vlastnostem shiitake. Toto však může být ku prospěchu věci z následujících důvodů.

Ačkoli antioxidanty prokazatelně chrání organismus proti oxidačnímu stresu, běžně se používají jako aditiva při konzervacích potravin (např. proti žluknutí rostlinných olejů) či jako potravinové doplňky a jejich antioxidační vlastnosti jsou médii hodnoceny jako jednoznačně pozitivní s celou řadou zdravotních benefitů, podle některých nedávných výzkumů to nemusí být tak docela pravda. Dle těchto takřka revolučních studií antioxidanty skutečně snižují míru oxidačního stresu, ale současně spolu s ním snižují i expresi klíčového nádory potlačujícího proteinu p53. Jako antioxidanty byly v těchto studiích doposud testovány vitamin E a *N*-acetylcystein, tedy běžné potravinové doplňky. *N*-Acetylcystein je velmi populárním výživovým doplňkem kulturistů (neboť snižuje riziko poškození svalů z nadměrné námahy) či se běžně používá ve farmakologii (lékaři jej předepisují na odkašlávání, psychiatři při léčbě schizofrenie), vitamin E urychluje hojení ran a podporuje správnou činnost imunitního a nervového systému. U obou těchto antioxidantů je důvodné podezření, že významně zvyšují nebezpečí rakoviny, a to rakoviny plic (*N*-acetylcystein) a prostaty (vitamin E). Publikované studie sice přímo neprokazují, že by tyto antioxidanty způsobovaly rakovinu u zcela zdravých osob, avšak poskytují důkaz o prokarcenogenní roli antioxidantů u lidí, kteří mají ke vzniku rakoviny vysoké predispozice (např. nemocní s chronickým zánětem průdušek, rozedmou plic, obstrukční plicní chorobou či kuřáci) (166). Dále bylo prokázáno, že pacientům s diagnostikovaným karcinomem plic, melanomem či potenciálně dalšími typy rakoviny antioxidanty progresi nemoci urychlují. Klinické studie byly sice provedeny jen na myších (*in vivo*) a na lidských buňkách (*in vitro*), nicméně málokterý z fyziologů si myslí, že u jiných savců by tomu mělo být jinak. Navíc tyto prokarcinogenní vlastnosti budou zřejmě platit i pro další antioxidanty. Oba testované antioxidanty zvyšovaly schopnost

migrace rakovinných buněk, tedy schopnost metastázovat. Na vině by měla být aktivace proteinu, který reguluje buněčné procesy. Dosud neexistuje jasný důkaz, že zvýšená konzumace antioxidantů je pro pacienty prospěšná, zato riziko zhoršení zdravotního stavu (ať už růst nádoru či vznik metastází) je vysoké (166, 167, 168).

Vzhledem k nezanedbatelným protinádorovým vlastnostem lenthioninu a naopak jeho nízkým antioxidačním schopnostem se tak lenthionin může jevit jako vhodný kandidát k dalšímu testování.



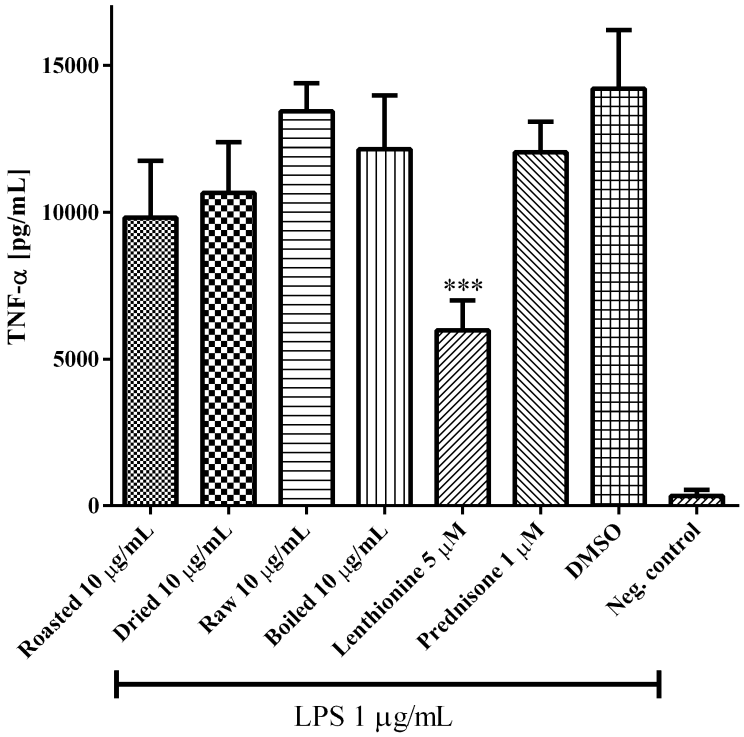
Obr. 31: Stanovení antioxidační aktivity lenthioninu a referenčních standardů.

5.2.4 Protizánětlivá aktivita lenthioninu a vodných extraktů shiitake

Shiitake jsou již po dlouhou dobu známé také pro své protizánětlivé a imunostimulační vlastnosti (54, 100, 112). Stále však nebyl dostatečně detailně prozkoumán vliv kuchyňského zpracování, jakož nejsou známy všechny nejvýznamnější sloučeniny zodpovědné za tyto vlastnosti.

V této práci byla studována schopnost vodných extraktů shiitake zvyšovat tvorbu prozánětlivého cytokinu TNF-α pomocí buněčné linie THP-1 *in vitro*. Jak je patrné z obr. 32, všechny testované extrakty inhibovaly sekreci TNF-α, což naznačuje, že jistý

protizánětlivý efekt lze očekávat při konzumaci relativně malého množství čerstvých či kulinárně zpracovaných plodnic shiitake. Bylo zjištěno, že během tepelného zpracování došlo k mírnému zvýšení protizánětlivých vlastností v řadě čerstvé < vařené < sušené < pražené. Toto zjištění je v rozporu se studií Gunawardeny *et al*. (169), kteří naopak pozorovali výrazné snížení protizánětlivé activity shiitake po tepelné úpravě. Důvodem tohoto rozporu mohou být výrazně rozdílné koncentrace testovaných extraktů (až 2,5 mg/ml vers. 10 µg/ml v této práci), jakož i rozdíly v původu plodnic, jejich zpracování a přípravě extraktů.



Obr. 32: Efekt testovaných vodných extraktů *L. edodes* a lenthioninu na sekreci TNF-*α* v lipopolysacharidech (LPS) stimulovaných THP-1 makrofágách.

Z jednotlivých sloučenin shiitake byla hlavní pozornost doposud zaměřena pouze na sledování imunomodulačních účinků frakcí obsahujících glukan lentinan. Bylo zjištěno, že tato látka je schopna významně snížit tvorbu TNFR1 v Caco-2 buňkách (170, 171). Také Chanput *et al*. (172) prokázali, že lentinan a vodné extrakty shiitake, které ho obsahují, snižují produkci prozánětlivě působících cytokinů IL-1β a IL-8 v buněčné linii THP-1 *in vitro*.

Doposud však v odborné literatuře nebyly popsány protizánětlivé vlastnosti lenthioninu. V této práci byla studována schopnost lenthioninu zvyšovat tvorbu prozánětlivého cytokinu TNF-*α* pomocí buněčné linie THP-1 *in vitro*. V těchto testech lenthionin prokázal výraznou schopnost snižovat produkci TNF-*α* při koncentraci 5μM (přibližně 1 μg/ml, obr. 32). Protizánětlivá aktivita lenthioniu byla dokonce vyšší než účinek prednisonu (1μM), což je syntetický kortikosteroid používaný jako imunosupresant. Tato pozorování naznačují poměrně silnou protizánětlivou aktivitu lenthioninu, ačkoliv momentálně nejsou k dispozici žádné detailní informace o mechanismu účinku této látky. Závěrem lze konstatovat, že lenthionin se může výrazně podílet na prokázaných protizánětlivých vlastnostech shiitake, ať samostatně, či v synergii s glukanem lentinanem.

6. ZÁVĚR

V této práci jsem se zabývala převážně sirnými sloučeninami plodnic houby *Lentinula edodes* (houževnatec jedlý, shiitake), konkrétně izolací jejich hlavního sirného prekurzoru (kyseliny lentinikové) a dvou enzymů (*γ*-glutamyltransferázy a C−S lyázy), za jejichž katalýzy k rozkladu kyseliny lentinikové dochází. Byly optimalizovány postupy těchto izolací a mechanismus rozkladu lentinikové kyseliny byl monitorován za pomoci nejmodernějších analytických technik (HPLC−HRMS, DART−HRMS). Celá řada z předpokládaných meziproduktů rozkladu lentinikové kyseliny jsou velmi nestabilní sloučeniny a jejich existence nebyla dosud nikým doložena. V rámci této práce se pomocí výše uvedených analytických technik podařilo poprvé potvrdit tvorbu 1,2-dithiiranu, avšak žádný další z předpokládaných meziproduktů rozkladu lentinikové kyseliny (např. příslušná sulfenová kyselina či thiosulfinát) detekován nebyl.

Dalším cílem této práce byla syntéza nejvýznamnějšího sirného produktu rozkladu kyseliny lentinikové – lenthioninu (1,2,3,5,6-pentathiepanu). Lenthionin byl následně podroben testování jeho biologických vlastností, přičemž pozornost byla zaměřena na testování antimikrobiální (bakteriální kultury *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, kvasinkové kultury *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida albicans* a plísňové kultury *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* a *Aspergillus niger*), cytotoxické (buněčné nádorové linie HeLa − rakovinné buňky děložního čípku, PaTu − rakovinné buňky slinivky a HepG2 – rakovinné buňky jater), antioxidační (metodami ABTS a DPPH) a protizánětlivé (TNF-*α* sekrece) aktivity.

Bylo zjištěno, že lenthionin je sloučenina vykazující významné antimikrobiální vlastnosti, a to zejména vůči testovaným kvasinkám a plísním (MIC 2−8 μg/ml). Bylo také pozorováno, že tento sirný metabolit je schopen významně snižovat tvorbu cytokinu TNF-*α*, díky čemuž může přispívat ke dříve popsaným protizánětlivým vlastnostem shiitake. Získané výsledky naopak naznačují, že lenthionin se pravděpodobně významným způsobem nepodílí na dobře známých antioxidačních a protirakovinných účincích shiitake.

Praktické využití může najít ta část studie, která byla zaměřena na zkoumání výše uvedených biologických vlastností vodných extraktů kulinárně zpracovaných plodnic

shiitake (vařením, pražením a sušením). Protirakovinná aktivita těchto extraktů byla jednoznačně nejvýraznější u nádorové buněčné linie HeLa, zřejmá byla i pro nádorovou buněčnou linii PaTu, avšak u linie HepG2 nebyl cytotoxický efekt statisticky významný. Způsob kulinárního zpracování hub nebyl z hlediska cytotoxicity podstatný. Antimikrobiální aktivita testovaných extraktů nebyla ve zvolené škále koncentrací pro dané mikroorganismy pozorována (MIC > 512 μg/ml). Nenulovou antioxidační aktivitu vykázaly všechny extrakty, přičemž se tepelná úprava vařením jeví jako nejvhodnější. Protizánětlivá aktivita byla též zřejmá u všech způsobů kulinárního zpracování, přičemž u pražených shiitake byla nejvýznamnější.

7. SEZNAM ZKRATEK

5´- AMP	5´-adenosinmonofosfát
5´- GMP	5´-guanosinmonofosfát
ABTS	2,2′-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
AIDS	acquired immune deficiency syndrome (syndrom získaného selhání imunity)
ANOVA	analysis of variance (analýza rozptylu)
ATCC	American Type Culture Collection (Americká sbírka mikroorganismů)
BCCM/LMG	Belgian Coordinatel Collections of Microorganisms (Belgické koordinační sbírky mikroorganismů)
CCM	Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)
CFU	colony forming unit (jednotka tvořící kolonii)
C−S lyáza	*S*-alkylcysteinsulfoxid lyáza
DART	direct analysis in real time (přímá analýza v reálném čase)
DMEM	Dulbecco´s modified eagle´s medium (médium pro kultivaci buněk)
DMSO	dimethylsulfoxid
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
EC	enzyme commission number (numerické klasifikační schéma pro enzymy)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EI	electron impact (ionizace nárazem elektronu)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (imunologická metoda sloužící k detekci protilátek)
EP3	frakce z extraktu LEM, obsahující především ve vodě rozpustný lignin
EPS4	nízkomolekulární frakce z EP3
ESI	electrospray ionization (ionizace elektrosprejem)
FBS	fetal bovine serum (fetální hovězí sérum)
FPLC	fast protein liquid chromatography (vysokorychlostní kapalinová chromatografie pro dělení proteinů)

fwhm	full width at half maximum (šířka v polovině výšky)
GC	gas chromatography (plynová chromatografie)
GGT	*γ*-glutamyltransferáza
γ-GPNA	*γ*-glutamyl-*p*-nitroanilid
GPx	glutathionperoxidáza
HDL	high density lipoprotein (vysokodenzitní lipoprotein)
HeLa	buňky lidské rakoviny děložního čípku
HepG2	buňky lidské rakoviny jater
HIV	human immunodeficiency virus (virus lidské imunodeficience)
HRMS	high resolution mass spectrometry (hmotnostní spektroskopie s vysokým rozlišením)
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration (polovina maximální inhibiční koncentrace)
IL-1,2	interleukin 1,2
JLS-18	ve vodě rozpustný extrakt z LEM
KRV/ZF/JU	sbírka Katedry rostlinné výroby agroekologie - Biotechnologické centrum, zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
KS-2	*α*-mannanový polysacharid z LAP
LC−MS	liquid chromatography – mass spectrometry (kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem)
LAP	ethanolový precipitát z LEM, glykoprotein
LDL	low density lipoprotein (nízkodenzitní lipoprotein)
LDL-c	low density lipoprotein cholesterol (nízkodenzitní lipoprotein s cholesterolem)
LEM	filtrát z vodného extraktu mycelia *Lentinula edodes*
LPS	lipopolysaccharide (lipopolysacharid)
MPAg	maso-peptonový agar obohacený o glukosu
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromid
NMR	nuclear magnetic resonance (nukleární magnetická rezonance)

PaTu	buňky lidské rakoviny slinivky břišní
PBS	phosphate buffer saline (fosfátový pufr)
PDA	photodiode-array (diodové pole)
PDA	potato dextrose agar (bramborovo-dextrosový agar)
PDB	potato dextrose broth (bramborovo-dextrosový bujón)
ppb	parts per billion (jedna miliardtina celku)
ppm	parts per million (jedna miliontina celku)
RICP	Research Institute of Crop Production (Výzkumný ústav rostlinné výroby, Ruzyně, Praha)
rpm	revolutions per minute (počet otáček za minutu)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (RPMI médium pro kultivaci buněk)
RVO	rotační vakuová odparka
SD	standard deviation (směrodatná odchylka)
SOD	superoxid dismutáza
THP-1	lidské leukemické buňky
TNF-α	tumor necrosis factor (faktor nádorové nekrózy)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	tryptic soy agar (trypton sojový agar)
TSB	tryptic soy broth (trypton sojový bujón)
UV−VIS	ultraviolet-visible (ultrafialová a viditelná oblast spektra)

8. CITOVANÁ LITERATURA

1) CHANG S. Mushroom research and development – equality and mutual benefit. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. **1996**, 1−10. ISBN 1-883956-01-3.

2) CHANG S. T. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: Nongreen revolution. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **1999**, *1*, 1−7.

3) COSS R. A., MCGRATH P. a CAGGIANO V. Alternative care. Patient choices for adjunct therapies within a cancer center. *Cancer Practice*. **1998**, *6*, 176−181.

4) YING C., WANG Y. a TANG H. *Icons of medicinal fungi from China*. Beijing, China: Science Press. **1987**, 575 ISBN 70-300-0195-8.

5) POUCHERET P., FONS F. a RAPIOR S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. *Cryptogamie: Mycologie*. **2006**, *27*, 311−333.

6) OGRA Y., ISHIWATA K., ENCINAR J. R., LOBINSKI R. a SUZUKI K. T. Speciation of selenium in selenium-enriched shiitake mushroom, *Lentinula edodes*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2004**, *379*, 861−866.

7) *Mushroom Grower´s Handbook 2: What is shiitake?* [online]. Seoul, Korea: MushWorld. **2005**, 1−11 [cit. 2013-05-30]. ISBN 1739−1377.

8) server biolib.cz [online] [cit. 2015-07-23].

9) SMOTLACHA M. Co jsou matsu-také a šií-také. *Výživa a potraviny*. **1992**, *5*, 75−76.

10) ROYSE D. J. *Cultivation of Shiitake on Natural and Synthetic Logs* [online]. **2001** [cit. 2013-05-30]. Dostupné z: http://pubs.cas.psu.edu/freepubs/pdfs/xl0083.pdf.

11) SILVA É. S., CAVALLAZZI J. R. P., MULLER G. a SOUZA J. V. B. Biotechnological applications of *Lentinus edodes*. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. **2007**, *5*, 403−407.

12) BRAUER D., KIMMONS T. a PHILLIPS M. Effects of management on the yield and high-molecular-weight polysaccharide content of shiitake (*Lentinula edodes*) mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, *50*, 5333−5337.

13) CHANG S. T. Past and present trends in the production of *Lentinula edodes* in Asia. *Mushroom Biology and Mushroom Products*. **2002**, *1*, 1−8.

14) JOHL P. P., SODHI H. S., DHANDA S. a KAPOOR S. Mushrooms as medicine - a review. *Journal of Plant Physiology*. **1995-6**, *11−12*, 73. Citováno podle BISEN P. S., BAGHEL R. K., SANODIYA B. S., THAKUR G. S. a PRASAD G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*. **2010**, *17*, 2419−2430.

15) MIZUNO T. Shiitake, *Lentinus edodes*: Functional properties for medicinal and food purposes. *Food Review International*. **1995**, *11*, 111−128.

16) VALÍČEK P. *Houby a jejich léčivé účinky*. 1. vyd. Benešov: Start. **2011**. ISBN 978-80-86231-54-9.

17) BAIER J. *Léčivé a zrádné síly hub*. Praha: Aventinum. **2014**. Fotografické atlasy. ISBN 978-80-7442-044-3.

18) JASROTIA N., SHARMA I., BADHANI S. a PRASHAR B. Incredible shiitake mushroom. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*. **2012**, *2*, 81−87.

19) LONGVAH T. a DOSTHALE Y. G. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry*. **1998**, *63*, 331−334.

20) TAKAMURA K. a HOSHINO H. Determination of vitamin D_2 in shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. **1991**, *545*, 201−204.

21) YASUMOTO K., IWAMI K. a H. MITSUDA. A New-sulfur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as a precursor for lenthionine. *Agricultural and Biological Chemistry*. **1971**, *35*, 2059−2069.

22) HÖFLE G., GMELIN R., LUXA H. H., N´GALAMULUME-TREVES M. a HATANAKA S. I. Struktur der Lentinsäure 2-(*γ*-Glutamylamino)-4,6,8,10,10-pentaoxo-4,6,8,10-tetrathiaundecansäure. *Tetrahedron Letters*. **1976**, *36*, 3129−3132.

23) GMELIN R., N´GALAMULUME-TREVES M. a HÖFLE G. Epilentinsäure, ein neuer Aroma- und Geruchs-Precursor in *Tricholoma* Arten. *Phytochemistry*. **1980**, *19*, 553−557.

24) YASUMOTO K., IWAMI K. a MITSUDA H. Enzyme-catalized evolution of lenthionine from lentinic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*. **1971**, *35*, 2070−2080.

25) IWAMI K., YASUMOTO K. a NAKAMURA K. Reactivity of lentinus gamma-glutamyltransferase with lentinic acid as the principal endogenous substrate. *Agricultural and Biological Chemistry*. **1975**, *39*, 1941−1946.

26) CHEN C. C., LIU S. E., WU C. M. a HO C. T. Enzymic formation of volatile compounds in shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *Biogeneration of aromas: ACS symposium*. **1986**, *317*, 176−183.

27) CHEN C. C. a HO C. T. Identification of sulfurous compounds of shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1986**, *34*, 830−833.

28) STOLL A. a SEEBECK B. Űber spezifische Inhaltsstoffe des Knoblauchs: Alliin, Alliinase und Allicin. *Scientia Pharmaceutica*. **1950**, *18*, 61−79.

29) TATE S. S. a MEISTER A. Gamma-glutamyl transpeptidase: Catalytic, structural and functional aspects. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **1981**, *39*, 357−368.

30) IWAMI K. a YASUMOTO K. Substrate preference of gamma-glutamyltransferase from caps of fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Agricultural and Biological Chemistry*. **1982**, *46*, 2387−2388.

31) LI J., HUANG J., YIN J., WU N., SONG J., YHANG L. a JIANG T. Rapid purification and characterization of *γ*-glutamyl-transpeptidase from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Food Science*. **2012**, *77*, C640−C645.

32) LIU Y., YUAN Y., LEI X., YANG H., IBRAHIM S. A. a HUANG W. Purification and characterisation of two enzymes related to endogenous formaldehyde in *Lentinula edodes*. *Food Chemistry*. **2013**, *138*, 2174−2179.

33) YASUMOTO K. a IWAMI K. *S*-Substituted L-cysteine sulfoxide lyase from shiitake mushroom. *Methods in Enzymology*. **1987**, *143*, 434−439.

34) YASUMOTO K., IWAMI K. a MITSUDA H. Enzymatic formation of shiitake aroma from non-volatile precursor(s)-lenthionine from lentinic acid. *Mushroom Science IX (part 1): Proceedings of the IXth International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi*. Japan: Mushroom Research Institute of Japan. **1976**, 371−383.

35) AHN J. S., KIM E. S. a PARK E. S. Studies on the volatile components of edible mushroom (*Lentinus edodes*) of Korea. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. **1987**, *16*, 328−332.

36) MORITA K. a KOBAYASHI S. Isolation and synthesis of lenthionine, an odorous substance of shiitake, an edible mushroom. *Tetrahedron Letters*. **1966**, *7*, 573−577.

37) YADA M., IMAIDA M. a KOBAYASHI T. Studies on formaldehyde in *Cortinellus shiitake*. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. **1970**, *11*, 171−176.

38) WENG X., CHON CH. H., JIANG H. a LI D. Rapid detection of formaldehyde concentration in food on a polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidic chip. *Food Chemistry*. **2009**, *114*, 1079−1082.

39) LIU J., PENG J., CHI Y a JIANG G. Determination of formaldehyde in shiitake mushroom by ionic liquid-based liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography. *Talanta*. **2005**, *65*, 705−709.

40) LEQIN K., JINGRONG CH. a QUISHUANG W. Effects of cultural practices on formaldehyde content of *Lentinula edodes*. *Acta Agriculturae Shanghai*. **2009**, *29*, 78−81.

41) LIU Y., YUAN Y., LEI X., YANG H., IBRAHIM S. A. a HUANG W. Purification and characterisation of two enzymes related to endogenous formaldehyde in *Lentinula edodes*. *Food Chemistry*. **2013**, *138*, 2174−2179.

42) HALLIWELL B. Free radicals, antioxidants, and human disease curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*. **1994**, *344*, 721−724.

43) HALLIWELL B. a GUTTERIDGE J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*. **1984**, *219*, 1−14.

44) YANG J. H., LIN H. C. a MAU J. L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*. **2002**, *77*, 229−235.

45) CHEUNG L. M. a CHEUNG P. C. K. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*. **2005**, *89*, 403−409.

46) CHEUNG L. M., CHEUNG P. C. K. a OOI V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extract. *Food Chemistry*. **2003**, *81*, 249−255.

47) CHOI Y., LEE S. M., CHUN J., LEE H. B. a LEE J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*. **2006**, *99*, 381−387.

48) FERREIRA I. C. F. R., BARROS L. a ABREU R. M. V. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*. **2009**, *16*, 1543−1560.

49) KITZBERGER C. S. G., SMÂNIA A., PEDROSA R. C. a FERREIRA S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal od Food Engineering*. **2007**, *80*, 631−638.

50) MATTILA P., KONKO K., EUROLA M., PIHLAVA J. M., ASTOLA J., VAHTERISTO L., HIETANIEMI V., KUMPULAINEN J., VALTONEN M. a

PIIRONEN V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, *49*, 2343−2348.

51) KIM M. Y., SEGUIN P., AHN J. K., KIM J. J., CHUN S. C., KIM E. H., SEO S. H., KANG E. Y., KIM S. L., PARK Y. J., RO H. M. a CHUNG I. M. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, *56*, 7265−7270.

52) XU C., HAIYAN Z., JIANHONG Z. a JING G. The pharmacological effect of polysaccharides from *Lentinus edodes* on the oxidative status and expression of VCAM-1mRNA of thoracic aorta endothelial cell in high-fat-diet rats. *Carbohydrate Polymers*. **2008**, *74*, 445−450.

53) SASIDHARAN S., ARAVINDRAN S., LATHA L. Y., VIJENTHI R., SARAVANAN D. a AMUTHA S. *In vitro* antioxidant activity and hepatoprotective effects of *Lentinula edodes* against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Molecules*. **2010**, *15*, 4478−4489.

54) BISEN P. S., BAGHEL R. K., SANODIYA B. S., THAKUR G. S. a PRASAD G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*. **2010**, *17*, 2419−2430.

55) GOULET N. R., COCHRAN K. W. a BROWN G. C. Differential and specific inhibition of ECHO viruses by plant extracts. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **1960**, *103*, 96−100.

56) COCHRAN K. W., NISHIKAWA T., BENEKE E. S. Botanical sources of influenza inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1966**, *6*, 515−520.

57) SUZUKI F., KOIDE T., TSUNODA A. a ISHIDA N. Mushroom extract as an interferon inducer I. Biological and physicochemical properties of spore extracts of *Lentinus edodes*. *Mushroom science*. **1976**, *9*, 509−520.

58) USHIYAMA R., Y. NAKAI a M. IKEGAMI. Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Virology*. **1977**, *77*, 880−883.

59) TAKEHARA M., KUIDA K. a MORI K. Antiviral activity of virus-like particles from *Lentinus edodes* (Shiitake). *Archives of Virology*. **1979**, *59*, 269−274.

60) KLEINSCHMIDT T. W. J. Biochemistry of interferon and its inducers. *Annual Review of Biochemistry*. **1972**, *41*, 517−542.

61) MORI K. a MORI K. Studies on virus-like particles in *Lentinus edodes* (Shii-ta-ke). *Mushroom science*. **1976**, *9*, 541−556.

62) JONG S. C. a BIRMINGHAM J. M. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. *Advances in Applied Microbiology*. **1993**, *39*, 153−184.

63) TAKEHARA M., MORI K., KUIDA K. a HANAWA M. A. Antitumor effect of virus-like particles from *Lentinus edodes* (shiitake) on Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Archives of Virology*. **1981**, *68*, 297−301.

64) MATTILA P., SUONPÄÄ K. a PIIRONEN V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*. **2000**, *16*, 694−696.

65) COATES P. M. Shiitake (*Lentinus edodes*). *Encyclopedia of dietary supplements*. 1. vyd. New York: Marcel Dekker. **2005**, 653−664. ISBN 0824747933.

66) WHITE R. W., HACKMAN R. M., SOARES S. E., BECKET L. A. a SUN B. Effects of a mushroom mycelium extract on the treatment of prostate cancer. *Urology*. **2002**, *60*, 640−644.

67) CHIHARA G. Lentinan and its related polysaccharides as host defence potentiators: their application to infectious diseases and cancer. *Immunotherapeutic prospects of infectious diseases*. 1. Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg. **1990**, 9−18. ISBN 9783642761225.

68) TOCHIKURA T. S., NAKASHIMA H., OHASHI Y. a YAMAMOTO N. Inhibition (*in vitro*) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Medical Microbiology and Immunology*. **1988**, *17*, 235−244.

69) YOSHIDA O., NAKASHIMA H., YOSHIDA T., KANEKO Y., YAMAMOTO I., MATSUZAKI K., URYU T. a YAMAMOTO N. Sulfation of the immunomodulating polysaccharide lentinan: A novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). *Biochemical Pharmacology*. **1988**, *37*, 2887−2891.

70) MORITA K. a KOBAYASHI S. Structure, and synthesis of lenthionine and its analogs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1967**, *15*, 988−993.

71) ISRAILIDES C., KLETSAS D., ARAPOGLOU D., PHILIPPOUSSIS A., PRATSINIS H., EBRINGEROVÁ A., HŘÍBALOVÁ V. a HARDING S. E. *In vitro* cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine*. **2008**, *15*, 512−519.

72) SUGANO N., HIBINO Y., CHOJI Y. a MAEDA H. Anticarcenogenic actions of water-soluble and alcohol-insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Letters*. **1982**, *17*, 109−114.

73) SUZUKI H., IIYAMA K., YOSHIDA O., YAMAZKI S., YAMAMOTO N. a TODA S. Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Agricultural and Biological Chemistry*. **1990**, *54*, 479−487.

74) SUZUKI F., SUZUKI C., SHIMOMURA E., MALDA H., FUJII T. a ISHIDA N. Antiviral and interferon-inducing activities of a peptidomannan, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *The Journal of Antibiotics*. **1979**, *32*, 1336−1345.

75) WASSER S. P. a WEIS A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **1999**, *1*, 31−62.

76) NGAI P. H. K. a NG T. B. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sciences*. **2003**, *73*, 3363–3374.

77) MORITA K. a KOBAYASHI S. Structure, and synthesis of lenthionine and its analogs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1967**, *15*, 988−993.

78) JACOB C. A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. *Natural Product Reports*. **2006**, *23*, 851−863.

79) HATVANI N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **2001**, *17*, 71−74.

80) HASSEGAWA R. H., KASUYA M. C. M. a VANETTI M. C. D. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. *Electronic Journal of Biotechnology*. **2005**, *8*, 212−217.

81) ZHOU L., ZHANG Q., ZHANG Y., LIU J. a CAO Y. The shiitake mushroom-derived immuno-stimulant lentinan protects against murine malaria blood-stage infection by evoking adaptive immune-responses. *International Immunopharmacology*. **2009**, *9*, 455−462.

82) ZHU M., LEW T. H. a LUK C. T. Gastric protective effect of *Lentinus edodes* against ethanol-induced ulceration. *Fitoterapia*. **1997**, *68*, 537−542.

83) IIZUKA C. a MAEDA H. *Anti AIDS drug extracted from Lentinus edodes* [patent]. European Patent Application, EP19870110692. Uděleno 30.11.1988.

84) IKEKAWA T., UEHARA N., MAEDA Y., NAKANISHI M. a FUKUOKA F. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research*. **1969**, *29*, 734−735.

85) CHIHARA G., MAEDA Y., HAMURO J., SASAKI T. a FUKUOKA F. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature*. **1969**, *222*, 687−688.

86) MIZUNO T., SAITO H., NISHITOBA T. a KAWAGISHI H. Antitumo-active substances from mushrooms. *Food Reviews International*. **1995**, *11*, 23−61.

87) OOI V. E. C. a LIU F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **1999**, *1*, 195−206.

88) CHIHARA G., HAMURO J., MAEDA Y. Y., ARAI Y. a FUKUOKA F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Research*. **1970**, *30*, 2776−2781.

89) DESLANDES Y., MARCHESSAULT R. H. a SARKO A. Triple-helical structure of(1→3)-*β*-D-glucan. *Macromolecules*. **1980**, *13*, 1466−1471.

90) SASAKI T. a TAKASUKA N. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carbohydrate Research*. **1976**, *47*, 99−104.

91) CRESCENZI V., GAMINI A., RIZZO R. a MEILLE S. V. On the solid state and solution conformations of a polycarboxylate derived from the polysaccharide scleroglucan. *Carbohydrate Polymers*. **1988**, *9*, 169−184.

92) BLUHM T. L. a SARKO A. The triple helical structure of lentinan, a linear *β*-(1 → 3)-D-glucan. *Canadian Journal of Chemistry*. **1977**, *55*, 293−299.

93) SAITO H., OHKI T., TAKASUKA N. a SASAKI T. A ^{13}C-N.M.R.-Spectral study of a gel-forming, branched (1→3)-*β*-D-glucan, (lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fractions. Structure, and dependence of conformation on the molecular weight. *Carbohydrate Research*. **1977**, *58*, 293−305.

94) CHIHARA G., HAMURO J., MAEDA Y. Y., ARAI Y. a FUKUOKA F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity,

especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Research*. **1970**, *30*, 2776−2781.

95) SURENJAV U., ZHANG L., XU X., ZHANG X. a ZENG F. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1→3)-*β*-D-glucans from different *Lentinus edodes*. *Carbohydrate Polymers*. **2006**, *63*, 97−104.

96) MAEDA Y. Y., WATANABE S. T., CHIHARA C. a ROKUTANDA M. Denaturation and renaturation of a *β*-1,6;1,3-glucan, lentinan, associated with expression of T-Cell-mediated responses. *Cancer Research*. **1988**, *48*, 671−675.

97) CHIHARA G., HAMURO J., MAEDA Y., ARAI Y. a FUKUOKA F. Antitumour polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman). *Nature*. **1970**, *225*, 943−944.

98) SIA G. M. a CANDLISH J. K. Effects of shiitake (*Lentinus edodes*) extract on human neutrophils and the U937 monocytic cell line. *Phytotherapy research*. **1999**, *13*, 133−137.

99) LINDEQUIST U., NIEDERMEYER T. H. J. a JÜLICH W. D. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2005**, *2*, 285−299.

100) YAP A. T. a NG M. L. Immunopotentiating properties of lentinan (1→3)−*β*−D−glucan extracted from culinary-medicinal shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Singer (Agaricomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **2003**, *5*, 352−372.

101) NANBA H. a KURODA H. Antitumor mechanism of orally administered shiitake fruit bodies. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1987**, *35*, 2459−2464.

102) CHIHARA G., HAMURO J., MAEDA Y. Y., SHIIO T., SUGA T., TAKASUKA N. a SASAKI T. Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: An overview. *Cancer Detection and Prevention*. **1987**, *1*, 423−443.

103) ZÁKÁNY J., CHIHARA G. a FACHET J. Effect of lentinan on tumor growth in murine allogeneic and syngeneic hosts. *International Journal of Cancer*. **1980**, *25*, 371−376.

104) TAKI H., OISHI K., OKANO A., SUGA T., AKIYAMA Y. a YAMASHITA A. Antimetastatic effect of lentinan on liver metastasis of colon carcinoma (Colon 26): Possible role of activated Kupffer cells. *International Journal of Immunotherapy*. **1995**, *11*, 29−38.

105) ARAI Y., TANOOKA H., SEKINE T. a FUKUOKA F. Effect of immunosuppresive agents on antitumor action of lentinan. *Gann Japanese Journal of Cancer Research*. **1971**, *62*, 131−134.

106) MAEDA Y. Y., CHIHARA G. a ISHIMURA K. Unique increase of serum protein components and action of antitumour polysaccharides. *Nature*. **1974**, *252*, 250−251.

107) MAEDA Y. Y., HAMURO J., YAMADA Y. O., ISHIMURA K. a CHIHARA G. The nature of immunopotentiation by the anti-tumour polysaccharide lentinan and the significance of biogenic amines in its action. *International Journal of Cancer*. **1974**, 259−281.

108) HAZAMA S., OKA M., YOSHINO S., IIZUKA N., WADAMORI K., YAMAMOTO K. , HIRAZAWA K., WANG F., OGURA Y. a MASAKI Y. Clinical effects and immunological analysis of intraabdominal and intrapleural injection of

lentinan for malignant ascites and pleural effusion of gastric carcinoma. *Cancer and Chemotherapy*. **1995**, *22*, 1595−1597.

109) NG M. L. a YAP A.T. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. **2002**, *8*, 581−589.

110) NANBA H., MORI K., TOYOMASU T. a KURODA H. Antitumor action of shiitake (*Lentinus edodes*) fruit bodies orally administered to mice. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1987**, *35*, 2453−2458.

111) CHATTERJEE S., BISWAS G., BASU S. K. a ACHARYA K. Antineoplastic effect of mushrooms: A review. *Australian Journal of Crop Science*. **2011**, *5*, 904−911.

112) HOBBS C. R. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetideae). A literature review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **2000**, *2*, 287−302.

113) FUJII T., MAEDA H., SUZUKI F. a ISHIDA N. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *The Journal of Antibiotics*. **1978**, *31*, 1079−1090.

114) SUGANO N., HIBINO Y., CHOJI Y. a MAEDA H. Anticarcinogenic actions of water-soluble and alcohol-insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Letters*. **1982**, *17*, 109−114.

115) WU C. H., WU C. C. a HO Y. S. Antitumor activity of combination treatment of *Lentinus edodes* mycelium extracts with 5-fluorouracil against human colon cancer cell xenografted in nude mice. *Journal of Cancer Molecules*. **2007**, *3*, 15−22.

116) KANEDA T. a TOKUDA S. Effect of various mushroom preparations on cholesterol levels in rats. *Journal of Nutrition*. **1966**, *90*, 371−376.

117) KAMIYA T., SAITO Y., HASHIMOTO M. a SEKI H. Structure and synthesis of lentysine, a new hypocholesterolemic substance. *Tetrahedron Letters*. **1969**, *10*, 4729−4732.

118) CHIBATA I., OKUMURA K., TAKEYAMA S. a KOTERA K. Lentinacin: A new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*. *Experientia*. **1969**, *25*, 1237−1238.

119) KAMIYA T., SAITO Y., HASHIMOTO M. a SEKI H. Hypocholesterolemic alkaloids of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. II. A novel synthesis of eritadenine. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **1972**, *9*, 359−362.

120) TOKITA F., SHIBUKAWA N., YASUMOTO T. a KANEDA T. Isolation and chemical structure of the plasma-cholesterol reducing substance from shiitake mushroom. *Mushroom Science*. **1972**, *8*, 783−788.

121) ENMAN J., HODGE D., BERGLUND K. a ROVA U. Production of the bioactive compound eritadenine by submerged cultivation of shiitake (*Lentinus edodes*) mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, *56*, 2609−2612.

122) ENMAN J., ROVA U. a BERGLUND K. A. Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, *55*, 1177−1180.

123) SUZUKI S. a OHSHIMA S. Influence of shiitake (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom science*. **1976**, *9*, 463−467.

124) MAKITA S., TAGIRI A., KANO E. a KANEDA N. *Eiyo to Syokuryho*. **1971**, *24*, 477. Citováno podle MIZUNO T. Shiitake, *Lentinus edodes*: Functional properties for medicinal and food purposes. *Food Review International*. **1995**, *11*, 111−128.

125) TOKUDA S., TAGIRI A., KANO E. a KANEDA T. Reducing mechanism of plasma cholesterol by mushroom effect of mushrooms on cholesterol metabolism in rats (VII). *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Sciences*. **1971**, *24*, 477−480.

126) FRANCIA C., RAPIOR S., COURTECUISSE R. a SIROUX Y. Current research findings on the effects of selected mushrooms on cardiovascular diseases. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. **1999**, *1*, 169−172.

127) ROKUJO T., KIKUCHI H., TENSHO A., TSUKITANI Y., TAKENAWA T., YOSHIDA K. a KAMIYA T. Lentysine: A new hypolipidemic agent from a mushroom. *Life Sciences*. **1970**, *9*, 379−385.

128) SAITO Y., HASHIMOTO M., SEKI H.a KAMIYA T. Two new constituents from *Lentinus edodes*. *Tetrahedron Letters*. **1970**, *11*, 4863−4866.

129) BREENE W. M. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. *Journal of Food Protection*. **1990**, *53*, 883−894.

130) TAKASHIMA K., IZUMI K., IWAI H. a TAKEYAMA S. The hypocholesterolemic action of eritadenine in the rat. *Atherosclerosis*. **1973**, *17*, 491−502.

131) HOKAMA, Y. a HOKAMA J. L. *In vitro* inhibition of platelet aggregation with low dalton compounds from aqueous dialysates of edible fungi. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. **1981**, *31*, 177−180.

132) SHIMADA S., KOMAMURA K., KUMAGAI H. a SAKURAI H. Inhibitory activity of shiitake flavor against platelet aggregation. *BioFactors*. **2004**, *22*, 177−179.

133) YANG B. K., KIM D. H., JEONG S. C., DAS S., CHOI Y. S., SHIN J. S., LEE S. C. a SONG C. H. Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exo-polymer produced from a submerged mycelial culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2002**, *66*, 937−942.

134) YAMAC M., KANBAK G., ZEYTINOGLU M., BAYRAMOGLU G., SENTURK H. a UYANOGLU M. Hypoglycemic effect of *Lentinus strigosus* (Schwein.) Fr. crude exopolysaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food*. **2008**, *11*, 513−517.

135) HANDAYANI D., CHEN J., MEYER B. J. a HUANG X. F. Dietary shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) prevents fat deposition and lowers triglyceride in rats fed a high-fat diet. *Journal of Obesity*. **2011**, *2011*, 1−8.

136) CHU E. Y., ANAND D., DAWN A., ELENITSAS R. a ADLER D. J. Shiitake dermatitis: A report of 3 cases and review of the literature. *Cutis*. **2013**, *91*, 287−290.

137) NAKAMURA T. Shiitake (*Lentinus edodes*) dermatitis. *Contact Dermatitis*. **1992**, *27*, 65−70.

138) KOK P. J. M. J, SEIDEL B., HOLTKAMP H. C. a HUISMAN J. A new procedure for the visualization of multiple forms of gamma-glutamyl transferase (GGT) results in normals, patients receiving enzyme-inducing drugs and patients having liver parenchymal lesions. *Clinica Chimica Acta*. **1978**, *90*, 209−216.

139) KUČEROVÁ P., KUBEC R., ŠIMEK P., VÁCLAVÍK L. a SCHRAML J. *Allium* discoloration: The precursor and formation of the red pigment in giant onion (*Allium giganteum* Regel) and some other subgenus *Melanocrommyum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, *59*, 1821−1828.

140) HROUZEK P., KAPUŚCIK A., VACEK J., VORÁČOVÁ K., PAICHLOVÁ J., KOSINA P., VOLOSHKO L., VENTURA S. a KOPECKÝ J. Cytotoxicity evaluation of large cyanobacterial strain set using selected human and murine *in vitro* cell models. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*. **2016**, *124*, 177−185.

141) WADA S., NAKATANI H. a MORITA K. A new aroma-bearing substance from shiitake, an edible mushroom. *Journal of Food Science.* **1967**, *32*, 559−561.

142) BLACK M. M. a SPEER F. D. Further observations on the effects of cancer chemoterapeutic agents on the *in vitro* dehydrogenase activity of cancer tissue. *Journal of the National Cancer Institute*. **1954**, *14*, 1147−1158.

143) MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. **1983**, *65*, 55−63.

144) RISS T. L., MORAVEC R. A., NILES A. L., BENINK H. A., WORZELLA T. J. a MINOR L. Cell viability assays. *Assay Guidance Manual* [online]. **2015**, 260−282 [cit. 2016-04-06]. Dostupné z: http://europepmc.org/books/NBK144065;jsessionid=HmPwHdSKJFE7pAivlFVB.0.

145) Clinical and laboratory standards institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-Eighth edition: Approved standard. Document M07-A8. Wayne, PA, USA. **2009**, *29*.

146) KOKOŠKA L., HAVLÍK J., VALTROVÁ I., SOVOVÁ H., SAJFRTOVÁ M. a JANKOVSKÁ I. Comparison of chemical composition and antibacterial activity of *Nigella sativa* seed essential oils obtained by different extraction methods. *Journal of Food Protection.* **2008**, *71*, 2475**–**2480.

147) National committee for clinical laboratory standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. Document M38-A. Wayne, PA, USA. **2002**.

148) OARD S., RUSH M. C. a OARD H. Characterization of antimicrobial peptides against a US starin of the rice patogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology.* **2004**, *97*, 169**–**180.

149) KIM M., LEE J. a LEE J. Effect of ultraviolet-B irradiation on antioxidative properties of aqueous extracts from shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms. *International Journal of Food Science and Technology*. **2014**, *49*, 2276−2282.

150) KUBEC R., CODY R. B., DANE, A. J., MUSAH R. A., SCHRAML J., VATTEKKATTE A., BLOCK E. Applications of direct analysis in real time−mass spectrometry (DART−MS) in *allium* chemistry. (*Z*)-Butanethial *S*-oxide and 1-butenyl thiosulfinates and their *S*-(*E*)-1-butenylcysteine *S*-oxide precursor from *Allium siculum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, *58*, 1121−1128.

151) SENNING A. Minireview: dithiiranes and thiosulfines. *Sulfur Letters*. **1990**, *10*, 83−86.

152) INA K., TAKAE K. a TAKAFUMI A. The use of lentinan for treating gastric cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. **2013**, *13*, 681−688.

153) OBA K., KOBAYASHI M., MATSUI T., KODERA Y. a SAKAMOTO J. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. *Anticancer Research*. **2009**, *27*, 2739−2745.

154) ERIKSSON J. E., HÄGERSTRAND H. a ISOMAA B. Cell selective cytotoxicity of a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystic aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1987**, *930*, 304−310.

155) BLUM R. H., CARTER S. K. a AGRE K. A clinical review of bleomycin – a new antineoplastic agent. *Cancer*. **1973**, *31*, 903−914.

156) IWAMOTO T., HIRAKU Y., OIKAWA S., MIZUTANI H., KOJIMA M. a KAWANISHI S. DNA intrastrand cross-link at the 5´-GA-3´sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer Science*. **2004**, *95*, 454−458.

157) MAANEN M. J., SMEETS C. J. M. a BEIJNEN J. H. Chemistry, pharmacology and pharmacokinetics of N, N´, N´´-triethylenethiophosphoramide (ThioTEPA). *Cancer Treatment Reviews*. **2000**, *26*, 257−268.

158) GYÉMANTI N., TANAKA M., ANTUS S., HOHMANN J., CSUKA O., MANDOKY L. a MOLNAR J. *In vitro* search for synergy between flavonoids and epirubicin on multidrug-resistant cancer cells. *In vivo*. **2005**, *19*, 367−374.

159) TSURUO T., IIDA H., TSUKAGOSHI S. a SAKURAI Y. Overcoming of vincristin resistence in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research*. **1981**, *41*, 1967−1972.

160) SEETULSINGH-GOORAH S. P. Mechanisms of adenosine-induced cytotoxicity and their clinical and physiological implications. *BioFactors*. **2006**, *27*, 213−230.

161) WU L. F., LI G. P., FENG J. L. a PU Z. J. Molecular mechanisms of adenosine-induced apoptosis in human HepG2 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2006**, *27*, 477−484.

162) TANAKA Y., YOSHIHARA K., TSUYUKI M. a KAMIYA T. Apoptosis induced by adenosine in human leukemia HL-60 cells. *Experimental Cell Research*. **1994**, *213*, 242−252.

163) HIRASAWA M., SHOUJI N., NETA T., FUKUSHIMA K. a TAKADA K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*. **1999**, *11*, 151−157.

164) ISHIKAWA N. K., KASUYA M. C. M. a VANETTI M. C. D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*. **2001**, *32*, 206−210.

165) PELEG H., NAIM M., ROUSEFF R. L. a ZEHAVI U. Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and Grapefruits (*Citrus paradisi*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1991**, *57*, 417−426.

166) SAYIN V. I., IBRAHIM M. X., LARSSON E., NILSSON J. A., LINDAHL P. a BERGO M. O. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Science Translational Medicine*. **2014**, *6*, 1−8.

167) LE GAL K., IBRAHIM M. X., WIEL C., SAYIN V. I., AKULA M. K., KARLSSON C., DALIN M. G., AKYÜREK L. M., LINDAHL P., NILSSON J. a BERGO M. O. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science Translational Medicine*. **2015**, *7*, 1−7.

168) KLEIN E. A., THOMPSON I. M., TANGEN C. M., CROWLEY J. J., LUCIA M. S., GOODMAN P. J., MINASIAN L. M., FORD L. G. a spol. Vitamin E and the risk of prostate cancer. *The Journal of the American Medical Association*. **2011**, *306*, 1549−1556.

169) GUNAWARDENA D., BENNETT L., SHANMUGAM K., KING K., WILLIAMS R., ZABARAS D., HEAD R., OOI L., GYENGESI E. a MÜNCH G. Anti-inflammatory effects of five commercially available mushroom species determined in lipopolysaccharide and interferon-*γ* activated murine macrophages. *Food Chemistry*. **2014**, *148*, 92−96.

170) MIZUNO M., NISHITANI Y., HASHIMOTO T. a KANAZAWA K. Different suppressive effects on fucoidan and lentinan on IL-8 mRNA expression in *in vitro* gut inflammation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2009**, *73*, 2324−2325.

171) NISHITANI Y., ZHANG L., YOSHIDA M., AZUMA T., KANAZAWA K., HASHIMOTO T. a MIZUNO M. Intestinal anti-inflammatory activity of lentinan influence on IL-8 and TNFR1 expression in intestinal epithelial cells. *PLoS One*. **2013**, *8*, 1−11.

172) CHANPUT W., REITSMA M., KLEINJANS L., MES J. J., SAVELKOUL H. F. J. a WICHERS H. J. β-Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research*. **2012**, *56*, 822−833.

Zdroje obrázků

1 a) https://en.wikipedia.org/wiki/Shiitake#/media/File:Shiitakegrowing.jpg

b) https://shizuokagourmet.com/2010/02/19/vegetables-facts-tips-91-shiitake-mushrooms-amended-expanded/

2 a) http://www.greenmedinfo.com/blog/delicious-easy-way-boost-your-immunity

b) https://coolcookstyle.com/2011/04/12/pan-roasted-shitake-mushroom-topped-bruschetta/

c) http://strong-athlete.com/wp-content/uploads/2012/07/Mushrooms-on-Pizza-1024x768.jpg

d) http://www.seriouseats.com/recipes/2014/07/crispy-pickled-shiitake-from-pitt-cue-co.html

3) Upraveno podle YASUMOTO, K., K. IWAMI a H. MITSUDA. A New-sulfur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as a precursor for lenthionine. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1971, **35**, 2059−2069.

4) Upraveno podle HÖFLE G., GMELIN R., LUXA H. H., N´GALAMULUME-TREVES M. a HATANAKA S. I. Struktur der Lentinsäure 2-(Gama-Glutamylamino)-4,6,8,10,10-pentaoxo-4,6,8,10-tetrathiaundecansäure. *Tetrahedron Letters*. **1976**, *36*, 3129−3132.

5 a) http://www.nahuby.sk/images/fotosutaz/2008/07/05/Micromphale-perforans/estera_bohunicka_115324.jpg

b) http://www.funghiabruzzesi.it/bdr/d/7739-2/collybia1.jpg

c) http://www.stridvall.se/fungi/gallery/Micromphale/NIKB2259?full=1

d) http://www.pharmanatur.com/Mycologie/Gymnopus%20impudicus.htm

e) http://www.funghiitaliani.it/?showtopic=9211

6) Přejato z YASUMOTO K., IWAMI K. a MITSUDA H. Enzymatic formation of shiitake aroma from non-volatile precursor(s)-lenthionine from lentinic acid. *Mushroom Science IX (part 1): Proceedings of the IXth International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi*. Japan: Mushroom Research Institute of Japan, **1976**, 371−383.

7) Přejato z CHEN C. C., LIU S. E., WU C. M. a HO C. T. Enzymic formation of volatile compounds in shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *Biogeneration of aromas: ACS symposium*. **1986**, *317*, 176−183.

8) http://organika.com/product/immunity/shiitake-mushroom-extract/

http://www.amazon.com/Solaray-Shiitake-Mushroom-Capsules-Count/dp/B00020HYKM

http://www.brit.co/mushroom-beauty-products/

http://www.bellalucce.com/shiitake-green-tea-antioxidant-serum.html

9) Přejato z BISEN P. S., BAGHEL R. K., SANODIYA B. S., THAKUR G. S. a PRASAD G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*. **2010**, *17*, 2419−2430.

10) Přejato z BISEN P. S., BAGHEL R. K., SANODIYA B. S., THAKUR G. S. a PRASAD G. B. K. S. *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*. **2010**, *17*, 2419−2430.; KOMEMUSHI S., YAMAMOTO Y. a FUJITA T. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lentinus edodes*. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents Japan*. **1996**, *24*, 21−26 a MISHIKAWA M., KAMIYA K., KOBAYASHI S., MORITA K. a TOMIIE Y. Analysis of lenthionine, an odorous substance of shiitake, an edible mushroom. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1967**, *15*, 756−760.

11) Přejato z SAITO Y., HASHIMOTO M., SEKI H. a KAMIYA T. Two new constituents from *Lentinus edodes*. *Tetrahedron Letters*. **1970**, *11*, 4863−4866 a z MIZUNO T. Shiitake, *Lentinus edodes*: Functional properties for medicinal and food purposes. *Food Review International*. **1995**, *11*, 111−128.

12) Upraveno podle KOK P. J. M. J, SEIDEL B., HOLTKAMP H. C. a HUISMAN J. A new procedure for the visualization of multiple forms of gamma-glutamyl transferase (GGT) results in normals, patients receiving enzyme-inducing drugs and patients having liver parenchymal lesions. *Clinica Chimica Acta*. **1978**, *90*, 209−216.

13) Přejato z KUČEROVÁ P., KUBEC R., ŠIMEK P., VÁCLAVÍK L. a SCHRAML J. *Allium* discoloration: The precursor and formation of the red pigment in giant onion (*Allium giganteum* Regel) and some other subgenus *Melanocrommyum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, *59*, 1821−1828.

14) Upraveno podle MORITA K. a KOBAYASHI S. Structure, and synthesis of lenthionine and its analogs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1967**, *15*, 988−993.

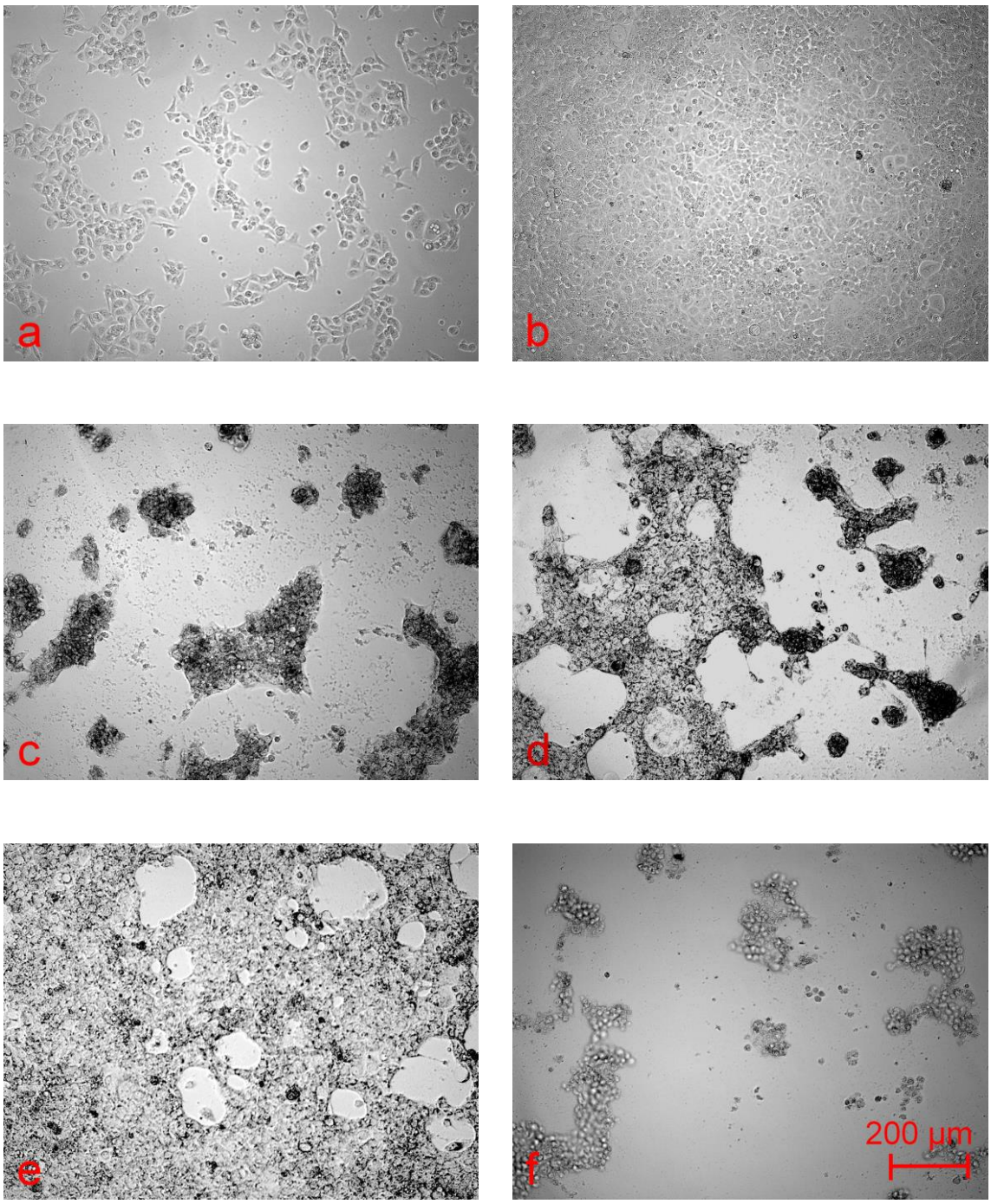
15) Přejato z http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html

17) Převzato z CHEN C. C., LIU S. E., WU C. M. a HO C. T. Enzymic formation of volatile compounds in shiitake mushroom (Lentinus edodes Sing.). Biogeneration of aromas: ACS symposium. 1986, 317, 176−183.

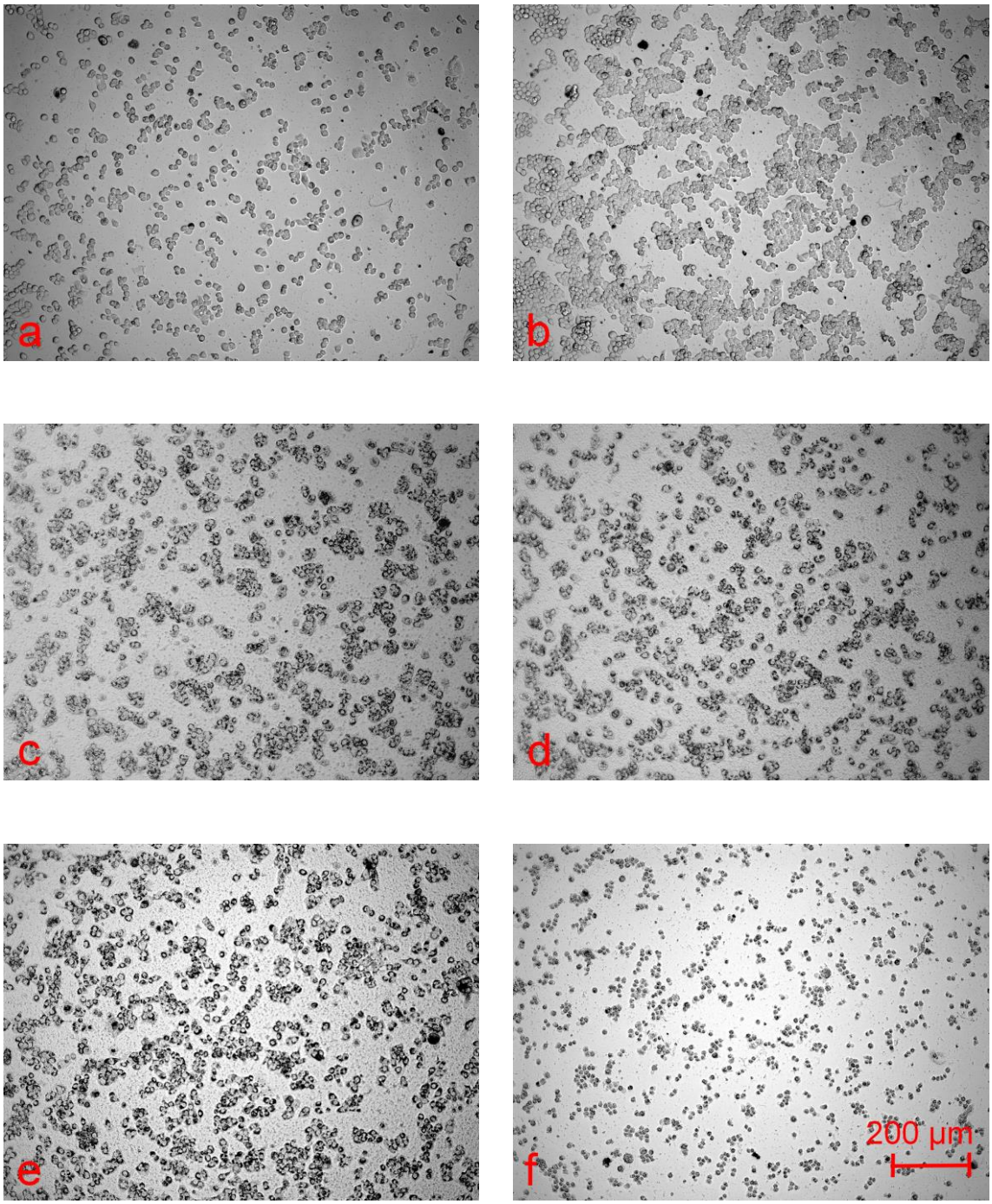
20) Přejato z SENNING A. Minireview: dithiiranes and thiosulfines. *Sulfur Letters*. **1990**, *10*, 83−86.

21) Převzato z YASUMOTO K., IWAMI K. a MITSUDA H. Enzyme-catalized evolution of lenthionine from lentinic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*. **1971**, *35*, 2070−2080.

9. SEZNAM PŘÍLOH



Obr. 33: Časosběrná mikroskopie – buňky linie PaTu a) před aplikací extraktu; b) po 48 hodinách bez ošetření extraktem; c) po 48 hodinách od ošetření vodným extraktem z pražených plodnic; d) po 48 hodinách od ošetření vodným extraktem ze sušených plodnic; e) po 48 hodinách od ošetření vodným extraktem z vařených plodnic; f) po 48 hodinách od ošetření vodným extraktem z čerstvých plodnic.



Obr. 34: Časosběrná mikroskopie – buňky linie HepG2 a) před aplikací extraktu; b) po 48 hodinách bez ošetření extraktem; c) po 48 hodinách od ošetření vodným extraktem z pražených plodnic; d) po 48 hodinách od ošetření vodným extraktem ze sušených plodnic; e) po 48 hodinách od ošetření vodným extraktem z vařených plodnic; f) po 48 hodinách od ošetření vodným extraktem z čerstvých plodnic.