

OPONENTSKÝ POSUDEK

Dizertační práce

Mgr. Kristýna Kupcová

Sekundární sirné metabolity houževnatce jedlého

Oponent: doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.

Zemědělská fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

V Českých Budějovicích dne 20.12.2017

Předložená dizertační práce, kterou Ing. Kristýna Kupcová vypracovala na téma Sekundární sírné metaboliky houževnatce jedlého, je velmi hodnotným dílem významným pro oblast analytické chemie, využitelná v lékařství i v potravinářství i dalších vědních oborech. Biologicky aktivní látky houževnatce jedlého nejsou dostatečně prozkoumané, proto se tato doktorská práce věnuje jejich detekci, izolaci a charakteristice jejich účinků.

Autorka rozdělila práci do šesti hlavních kapitol. Práce má celkový rozsah 98 stran. Na závěr práce je zařazen seznam použitých zkratk, což přispívá čtenáři k snazší orientaci v textu. Za poněkud nešťastné považuji zařazení zdrojů obrázků bez jakéhokoliv odkázání se od obrázku na závěr práce. Čtenář netuší, že něco takového v práci je obsaženo a domnívá se, že obrázkům citace zdrojů chybí nebo, že patří autorce.

V logicky členěné a vzájemně vyvážené literární rešerši shrnující poznatky o původu, kultivaci i využití houby, jejich senzoryicky aktivních látkách, i biologických vlastnostech je na 24 stranách přehledně shrnut stav současného poznání o této léčivé houbě. Na str. 3 lze vytknout nepoužití kurzívy pro označení čeledi řádu, třídy a říše. Na straně 5 uvádí autorka, že při kultivaci na pilinách je výnos houby 3-4x vyšší. Jaký je ale běžný výnos houby?

Hlavním cílem práce bylo studium sekundárních metabolitů houževnatce jedlého s důrazem na sírné metabolity, jak jejich strukturu, tak mechanismus tvorby i biologické vlastnosti. Cíle jsou formulovány jasně a srozumitelně.

K metodice je možno uvést, že v práci bylo provedena izolace senzoryicky aktivních látek, izolace kyseliny lentinové, gama-glutamyltransferázy a C-S lyázy, syntéza lenthioninu, monitoring rozkladu lentinové kyseliny a testování cytotoxických, antimikrobiálních a protizánětlivých a antioxidačních účinků extraktů získaných z různě tepelně ošetřených plodnic houby.

V práci jsou na str. 4 popsány 2 typy houby. Se kterým typem autorka pracovala? Dá se použitý materiál charakterizovat stářím nebo fází vývoje houby v jaké je v uvedené organizaci sklizen a dodáván do prodeje a ve které byl tedy pravděpodobně i použit pro analýzu?

Lze doplnit, jaké stáří asi měli použité plodnice či nějak definovat jejich růstovou fázi? Autorka uvádí, že u testu antioxidační aktivity metodou DPPH byl jako slepý vzorek použit metanol, pro testování lenthioninu byl ale použit ethanolový roztok. Proč tomu tak bylo?

Statistické hodnocení je uvedeno u měření protizánětlivé aktivity, u ostatních testů chybí, ačkoliv autorka v části výsledky a diskuzi uvádí, že mezi varianta mi byly či nebyly statistické rozdíly.

Výsledky jsou prezentovány formou přehledných tabulek, ale i obrázků a grafů a současně diskutovány s dostupnou literaturou. Proč v tabulkách není uvedeno IC₅₀? U popisů tabulek a grafů chybí poznámka, co znamená hodnota za $\pm$, pravděpodobně se jedná o směrodatnou odchylku? Podobně u grafů by byla vhodná zmínka, co ukazují rozptylové úsečky. U obr. 32 znamenají *** nad lenthioninem statistickou

průkaznost? U tohoto grafu lze také vytknout anglické popisky na rozdíl od ostatních obrázků.

Část výsledků týkající se biologické aktivity lenthioninu již byla odeslána do redakce vědeckého časopisu a je připravena ke zveřejnění, což potvrzuje jejich vědeckou hodnotu. Získané výsledky přispěly k rozšíření informací o biologické aktivitě extraktů z plodnic i lethioninu, možnosti jeho syntézy a také o přítomnosti dalších sekundárních metabolitů v houževnatci jedlém.

Použitá literatura vychází z rozsáhlého souboru cca 172 citací vědecké literatury téměř výhradně zahraničních autorů. Zahrnuje jak práce starší (před rokem 2000), tak i nové aktuální zdroje.

K práci mám následující dotazy:

- 1) V práci byl detekován methyendisulfid v čerstvých i mražených houbách, může autorka konstatovat, ve které formě úpravy ho bylo obsaženo více?
- 2) Jak velké produkce dosahuje houževnatce jedlého je v ČR? Jaký je jeho průměrný výnos?
- 3) Existují různé „odrůdy“ houževnatce jedlého?
- 3) Jakou kulinářskou úpravu by autorka doporučila z hlediska zdravotního účinku této léčivé houby jako nejvhodnější?

Závěrem je možno konstatovat, že předložená dizertační práce má i přes drobné formální chyby vysokou hodnotu zejména pro další studium biologicky aktivních látek houževnatce jedlého i jejich potenciální využití v lékařství. Práce je zpracována věcně, srozumitelně a na vysoké vědecké úrovni. Autorka splnila stanovené cíle. Zjištěné výzkumné výsledky jsou aktuální, nové a cenné pro další výzkum. Autorka prokázala, že má smysl pro vědeckou práci, umí experimentální materiál nejen získávat, ale i zpracovat a prezentovat.

Na základě uvedených skutečností doporučuji oponentní radě dizertační práci Ing. Kristýny Kupcové přijmout k dalšímu řízení a po jejím úspěšném obhájení udělit jmenované akademický titul „Doktor“.

V Českých Budějovicích dne 20.12.2017



Vypracovala: doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.
Zemědělská fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Posudek oponenta disertační práce

Disertační práce:

Sekundární sirné metabolity houževnatce jedlého

Autor: Mgr. Kristýna Kupcová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

Práce Mgr. Kristýny Kupcové je zaměřena na studium chemických změn sirných sloučenin houby houževnatce jedlého - shiitake (*Lentinula edodes* (Berk) Pegler). Prekurzorem těchto změn je lentiniková kyselina, sirný dipeptid s velmi zvláštní strukturou, který se, po narušení pletiva houby, enzymově rozkládá na celou řadu těkavých sirných sloučenin, z nichž je nejvýznamnější lenthionin. Autorka rovněž zmiňuje přítomnost dalších biologicky aktivních látek neobsahujících síru, z nichž nejvýznamnější je polysacharid lentinan ze skupiny (1→3, 1→6)-β-glukanů. Druhá část práce je zaměřena na testování biologické aktivity extraktů čerstvého a kulinárně zpracovaného shiitake a izolovaného lenthioninu. Testována byla antioxidační, cytostatická, antimikrobiální, imunomodulační a protizánětlivá aktivita. Práce naznačuje vysokou vědeckou erudici Mgr. Kristýny Kupcové a její schopnost samostatně vědecky pracovat. Toto asi nejlépe dokládá skutečnost, že výsledky, které jsou tématem disertační práce, byly v letošním roce publikovány v impaktovaném časopise *International Journal of Medicinal Mushrooms*.

Souhrn práce plně odpovídá jejímu obsahu. Úvod stručně a jednoznačně uvádí čtenáře do řešené problematiky. Teoretická část ukazuje, že uchazečka umí dobře pracovat s vědeckou literaturou. Seznam citací je zpracován s velkou pečlivostí a neobsahuje naprosto žádné nedokonalosti. Využití velkého množství publikovaných dat dává této části odpovídající kvalitu. Cíle práce jsou formulovány přesně dle požadavků stručně a jasně.

V teoretické části mi naopak chybí poněkud podrobnější zmínka o biologických vlastnostech lentinanu, který samozřejmě není sirnou sloučeninou a tudíž se trochu vymyká tématu práce, ale je zřejmě nejznámější a nejvýznamnější biologicky aktivní látkou shiitake. Chtěl bych požádat disertantku o doplnění tohoto při obhajobě.

Praktická část práce je zpracována velmi precizně. Zabývá se metodikou sledování vzniku (včetně separace a identifikace) těkavých i netěkavých sirných sloučenin a metodikou testování biologické aktivity. Tato část je přehledná a srozumitelná, pracovní postupy jsou popsány velmi přesně a logická stavba experimentu je naprosto zřejmá. Výsledky jsou velmi

přehledně uspořádány v tabelární nebo grafické formě, cenné jsou i časosběrné mikroskopické snímky kultivace mikroorganismů při sledování biologické aktivity. Velmi oceňuji identifikaci a průkaz biologické účinnosti adenosinu (str. 66). Diskuse výsledků je na vynikající úrovni. Rovněž mimořádně oceňuji již zmíněnou publikaci článku v impaktovaném časopise.

Závěry práce jsou formulovány stručně, přehledně a srozumitelně a korespondují s vytyčenými cíli. Jazykové, grafické a formální zpracování práce je vynikající.

K práci mám několik doplňujících dotazů:

- Chybí mi úvaha, případně s podporou literárních zdrojů, co se děje s aktivními látkami v trávicím traktu člověka.
- Na str. 68 autorka konstatuje, že se nepodařilo optimalizovat metodu. Má ale autorka nějakou úvahu, jak by bylo možné zlepšit v tomto případě účinnost separace?
- Jsou velké rozdíly ve výsledcích antioxidační aktivity měřené metodou DPPH a ABTS. Lze tyto rozdíly vysvětlit s přihlédnutím ke složení látek s antioxidační aktivitou?

K práci mám ještě několik víceméně formálních připomínek:

- Str. 15, 2. odst.: Formaldehyd je mimořádně důležitým kontaminantem. V té souvislosti mi zde chybí již před lety publikované stanovisko EFSA zabývající se bezpečností konzumace shiitake.
- Str. 18: V prvním odstavci o antivirálních vlastnostech je použita již hodně zastaralá literatura a nejsem si jist spolehlivostí publikovaných dat.
- Str. 27: Druhý bod cílů práce je formulován poněkud nešťastně. Biologická aktivita extraktů se neporovnávala s lenthioninem, ale s danými standardy, např. ATB.
- Str. 40: V kap. 4.12.1. se píše, že „Působení proteázy bylo zastaveno přidáním vhodného média“. Co je to „vhodné médium“?
- Str. 58, poslední odstavec: Možná se dalo pokusit o nějakou predikci – minimálně u kultury PaTu – houby se jedí vždy tepelně upravené.
- Str. 62, 1. odst.: Naznačená strukturní podobnost chemoterapeutik s lenthioninem je zavádějící, jde o zcela odlišné sloučeniny; např. bleomycin je glykopeptid, busulfan je butandiolsulfonát atd.

- V některých případech jsou uvedeny hodně spekulativní úvahy – např. na str. 62 v posledním odstavci ...“sčítání nebo násobení účinků“...; na str. 74 poslední dvě ukončené věty.
- Některé formulace, např. kohoutková voda nebo trypsinizace, znějí poněkud nevědecky.

Využití velkého množství naměřených a publikovaných dat a precizní zpracování dávají této práci velmi vysokou kvalitu. Veškerá data jsou podrobena kritickému posouzení a jsou z nich vyvozeny patřičné závěry.

Z výše uvedených důvodů

doporučuji

přijmout disertační práci Mgr. Kristýny Kupcové k obhajobě.



V Praze dne 29.12.2017

doc. Ing. Jan Pánek, CSc.

oponent

Posudek oponenta na disertační práci Kristýny Kupcové: Sekundární sirné metabolity houževnatce jedlého.

Předkládaná disertační práce si vytýčila dva hlavní cíle. V první části se autorka pokusila osvětlit výskyt předpokládaných meziproductů enzymatického rozkladu kyseliny lentinikové v houževnatci jedlém za pomoci moderních analytických technik. Druhá část je pak zaměřena na vliv kulinářských úprav na bioaktivitu vodných extraktů houževnatce a porovnání těchto efektů s bioaktivitami jednoho z hlavních sirných metabolitů houževnatce a to lenthioninu.

Po formální stránce je práce velmi pěkně vypracována: Na prvních 27 stranách nás autorka seznamuje s problematikou bioaktivních obsahových látek v houževnatci, přičemž tato pasáž je napsána srozumitelně s minimem formálních a věcných nedostatků (viz níže). Metodická část práce (str. 28-46) je rozebrána velmi podrobně s dostatečným množstvím detailů nutných pro pochopení postupu prací a též ilustrující šíři metod, jež autorka během práce použila nebo se s nimi alespoň seznámila. Výsledky a diskuze (str. 49-75) jsou též napsány srozumitelně. Výsledková část obsahuje poměrně velké množství negativních výsledků (zejména v první části stanovených cílů), ale osobně to považuji za normální při výzkumném úkolu jenž je pouští na nejistou půdu. Dále práce obsahuje stručné shrnutí ve formě závěru, seznam literatury čítající 172 odborných článků, seznam zkratk a přílohy ve formě obrázků. K práci jsou přiloženy 3 publikace: jedna v mezinárodním časopise *International Journal of Medicinal Mushrooms* a dvě česky psané publikace ze sborníku „Symposia o Nových Směrech Výroby a Hodnocení Potravin“. Tolik k formální a obsahové stránce práce.

K jednotlivým oddílům mám následující připomínky a dotazy:

Úvod:

- Jaký je faktický rozdíl mezi bodem a) a bodem c) v podkapitole 2.4.1 Shitake jako antioxidant“ (str. 16): a) přímý antioxidační efekt k udržení takové úrovně antioxidantů, která je nutná k prevenci produkce volných radikálů a za c) eliminace již vytvořených radikálů. Respektive prosím dovysvětlete bod za a)
- Na straně 17 autorka nejdříve popisuje antioxidační vlastnosti fenolických látek a poté pokračuje větou v dalším odstavci, cituji: „Farmakologický efekt podání polysacharidové frakce ze shitake byl také testován *in vivo* na myších.“ Osobně se mi tato věta zdá mimo kontext, jelikož se o polysacharidech v této části práce píše vůbec

poprvé. Nebo se za polysacharidovou frakci se zde počítají též rozpustné polyfenoly o kterých je celá předešlá kapitola?

- V kapitole o antimykotických vlastnostech (str. 20) autorka několikrát hovoří o „antifungicidních látkách“, což je zjevně špatná formulace, jelikož se jedná buď o látky fungicidní nebo antimykotické jak ostatně je i v nadpisu.
- Osobně bych preferoval u konkrétně uvedených bioaktivních látek (antimikrobiálních či cytostatických) uvést též údaj o efektivitě těchto látek (hodnota IC_{50} či MIC), aby měl čtenář představu v jakých řádech se potence těchto látek pohybuje.

Metodika:

- Na str. 37 je uvedeno že čistota syntetizovaného lenthioninu byla měřena pomocí HPLC-PDA, GC-MS a NMR, přičemž dle prvních dvou zmíněných metod byla cca 98%, jaké byla čistota dle NMR? Osobně si myslím, že NMR spektra by měla být součástí práce (alespoň v příloze). To stejné platí o určení chemické identity kyseliny lentinikové na str. 35.

Výsledky a diskuze:

- V první výsledkové části autorka přináší přímé důkazy o vzniku 1,2-dithiiranu (a následně formaldehydu) enzymatickým rozkladem lentinikové kyseliny, což jsou jistě velmi zajímavá data, zejména pokud jsou to opravdu první přímá experimentální data jak autorka píše. Navržená biochemická dráha vzniku lenthioninu a příbuzných sloučenin však počítá ze vznikem 1,2-dithiiranu samovolným rozkladem thiosulfinátu, jenž nebyl za pomoci HPLC-HRMS ve směsi detekován. Mohla by autorka vznést na obhajobě nějaký náznak či hypotézu jak by mohl 1,2-dithiiran vznikat beze vzniku thiosulfinátu?
- HPLC-MS analýza byla zaměřena na přítomnost thiosulfinátu, jenž nebyl nalezen na základě monoisotopické hmoty. Pokusila se autorka hledat ve vzorcích též kyselinu sulfonovou popřípadě jakékoliv intermediáty podobné molekulární váhy obsahující větší množství atomů síry (tato vlastnost by byla dobře vystopovatelná na základě tvaru isotopické obálky)?
- Nepokusila se autorka kvantifikovat množství lenthioninu, popřípadě množství formaldehydu ve svých vodných extraktech použitých na testování bioaktivity,

popřípadě jsou takováto data u houževnatce jedlého známá? Dotaz směřuje na vysvětlení některých bioaktivit přítomností těchto látek, popřípadě významnost obsahu těchto látek v celkové bioaktivitě extraktu.

- S interpretací cytotoxické bioaktivitní části práce veskrze souhlasím, až na jednu drobnost. Autorka správně ve shrnutí výsledků píše, že protirakovinný potenciál lenhioninu je spíše zanedbatelný, oproti tomu na str. 75 pak zmiňuje „Vzhledem k zanedbatelným protinádorovým vlastnostem lenhioninu...“ Tato tvrzení jsou v rozporu a myslím, že správné je to první.
- Velmi mne potěšilo a zároveň trochu překvapilo nalezení adenosinu v houževnatci jako bioaktivní látky zodpovědné za cytotoxický efekt. Jak autorka píše extracelulární adenosin opravdu může v určitých koncentracích způsobovat cytotoxické či proapoptické efekty. Existuje nějaký důvod proč by vodný extrakt houževnatce mohl obsahovat velké koncentrace této látky?
- Autorka příliš nediskutuje rozdílné výsledky obdržené u vodných extraktů houževnatce ve dvou antioxidačních esejích ABTS a DPHH. Mohla by autorka pouze krátce na obhajobě zmínit rozdíl mezi těmito dvěma esejemi, nikoliv metodický ale co se týče mechanismu a spektra detekovaných látek.
- Proč je v antibakteriální části výsledků a diskuze zmiňován alicin? bylo zkoumání antibakteriálního efektu alicinu součástí této studie, pokud ano, proč tyto výsledky nejsou součástí tabulky č.7. Pokud odkazuje věta na str. 70 na jinou studii měla by být tato studie citována.

Závěrem bych chtěl říci, že výše zmíněné body nesnižují nijak kvalitu práce. Myslím si, že autorka odvedla dobrý kus práce a použila ke studiu problematiky sirných metabolitů houževnatce široké spektrum metod. Doufám, že spíše negativní výsledky v analytické části práce povedou v budoucnu k rozřešení této problematiky a k odhalení jak ke vzniku sirných sloučenin v houževnatci dochází. Vlastní práci považuji za velmi pěkně vypracovanou srozumitelně napsanou a rozhodně ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 27.12.2017


Pavel Hrouzek