

Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Mgr. Kristýna KUPCOVÁ
Narozen(a): 18. 11. 1985 v Českých Budějovicích
Studijní program: Chemie
Studijní obor: Zemědělská chemie
Forma studia: Prezenční
Školící pracoviště: KCH ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 4. 1. 2018, ZF JU v Č. Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Sekundární sirmé metabolity houževnatce jedlého

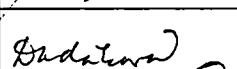
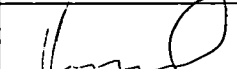
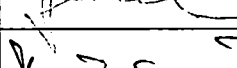
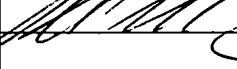
Výsledek obhajoby:

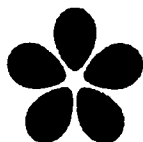
Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Ing. Jan Trška, CSc.; CVGZ AV ČR	
Členové:	doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	RNDr. Pavel Hrouzek, Ph.D.; Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň (oponent)	
	prof. Ing. Pavel Kalač, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Jan Pánek, CSc.; VŠCHT Praha (oponent)	
	doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	prof. Ing. Ivo Šafařík, CSc.; AV ČR, České Budějovice	
Školitel:	doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: Mgr. Kristýna KUPCOVÁ
Narozen(a): 18. 11. 1985 v Českých Budějovicích

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Zemědělská chemie
Forma studia: Prezenční

Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 7

počet platných hlasů: 7

počet neplatných hlasů: 0

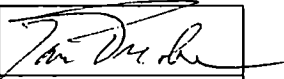
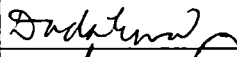
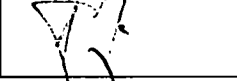
počet přítomných členů komise: 7

kladných: 7

záporných: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. Ing. Jan Tříška, CSc.; CVGZ AV ČR	
Členové:	doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	RNDr. Pavel Hrouzek, Ph.D.; Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň (oponent)	
	prof. Ing. Pavel Kalač, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	doc. Ing. Jan Pánek, CSc.; VŠCHT Praha (oponent)	
	doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	prof. Ing. Ivo Šafařík, DrSc.; AV ČR, České Budějovice	

Odpovědi k otázkám doc. Ing. Jany Pexové Kalinové, Ph.D. k disertační práci Kristýny Kupcové na téma Sekundární sirné metabolity houževnatce jedlého:

Na straně 5 uvádí autorka, že při kultivaci na pilinách je výnos houby 3-4x vyšší. Jaký je ale běžný výnos houby?

Odpověď na otázku jsem dohledala v časopise *The Mushroom Growers' Newsletter: A Small-scale agriculture alternative: shiitake mushrooms* (<https://www.mushroomcompany.com/resources/shiitake/shiitake.shtml>). Podle tohoto zdroje je možné z 2 kg pilinového substrátu získat cca 500 g hub, z dřevěného špalku o váze 2 kg přibližně 150 g. Obojí pochopitelně v závislosti na odrůdě, druhu dřeva a podmínkách kultivace.

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 organizaci sklizen a dodáván do prodeje a v které byl pravděpodobně i použit pro analýzu?

Shiitake typů je celá řada, podařilo se mi dohledat existenci 7: Donko, Koshin, Jyodonko, Namidonko, Chayori, Jyokoshin a Namikoshin. Bezpochyby jich existuje ještě více, ale protože je houba známá a vyhledávaná především v Asii, většina literatury je psaná čínsky či japonsky. Který typ jsem použila, se mi zjistit nepodařilo, ačkoli jsem o houbě chtěla znát všechny informace, které jsou prodejci známy. Stáří plodnice hub bylo v rozmezí 4–8 dní, blíže to určit nebylo možné. Houba byla sbírána ve chvíli, kdy byl její klobouk přibližně ze 70 % otevřený (při větším rozvinutí klobouku houba šíří výtrusy a stává se tenčí, což není žádoucí).

Autorka uvádí, že u testu antioxidační aktivity metodou DPPH byl jako slepý vzorek použit metanol, pro testování lenthioninu byl ale použit etanolový roztok. Proč tomu tak bylo?

Pokusila jsem se co nejvěrněji napodobit postup uvedený ve článku KIM M., LEE J. a LEE J. Effect of ultraviolet-B irradiation on antioxidative properties of aqueous extracts from shiitake (*Lentinula edodes*) mushrooms. *International Journal of Food Science and Technology*. 2014, 49, 2276–2282. V tomto článku DPPH radikál rozpouštěli v methanolu a následně k tomuto roztoku přidávali vodný extrakt *Lentinula edodes*. Já jsem lenthionin ve vodě rozpouštět nemohla, jelikož je ve vodě prakticky nerozpustný (viz 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. Pokusit se ho rozpustit v methanolu jsem zavrhl, protože u takto obtížně rozpustné sloučeniny by se mi pravděpodobně nepodařilo přesně tuto rozpustnost určit, není totiž známá (kdy je to nasycený roztok a kdy ještě suspenze?). Oproti tomu rozpustnost lenthioninu v ethanolu známá je (0,26 %, získáno opět z 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).

*Statistické hodnocení je uvedeno u měření protizánětlivé aktivity, u ostatních testů chybí, ačkoli autorka v části výsledky a diskuze uvádí, že mezi variantami byly či nebyly statistické rozdíly. Proč v tabulkách není uvedeno IC50? Co znamená hodnota za ±, 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 vytknout anglické popisky na rozdíl od ostatních obrázků.*

Pojmy „byly či nebyly statistické rozdíly“ opravdu nebyly vhodně zvoleny. U všech výsledků jsem uváděla jen směrodatnou odchylku a je to ta hodnota za $\pm$. Že se jedná o směrodatnou odchylku opravdu uvedeno být mělo. Rozptylové úsečky opět značí směrodatné odchylky. Část disertační práce, při které byla určována protizánětlivá aktivita vodných extraktů shiitake a lenthioninu, byla zpracována

na veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně a nevypracovávala jsem ji sama (jak na začátku kapitoly uvádím). Bohužel byla se spoluautory horší komunikace, proto jsem byla ráda, že jsem graf (obr. 32) získala, byť byl s anglickými popisky a se třemi hvězdičkami, které opravdu znamenaly významný rozdíl ve srovnání s buňkami ošetřenými DMSO, $p < 0,001$. Hodnoty IC50 v tabulkách uvedeny nejsou z toho důvodu, že nejméně u poloviny výsledků je nebylo možné určit bez predikčního programu. Ty z inhibičních koncentrací, které bylo možné určit bez predikčních programů, jsou uvedeny v textu práce.

V práci byl detekován methyendisulfid v čerstvých i mražených houbách. Může autorka konstatovat, ve které formě úpravy ho bylo obsaženo více?

Bohužel nikoli, analytickou techniku DART jsem používala k detekci meziproduktů rozkladu lentinikové kyseliny, nikoli k jejich kvantifikaci. Kvantifikace pomocí DART by jistě možná byla, pokud bych zvolila vhodný vnitřní standard, nicméně tím jsem se nezabývala, šlo mi především o určení kvality (tedy o detekci).

Jak velká je produkce houževnatce jedlého v ČR? Jaký je jeho průměrný výnos?

Celosvětově tvoří produkce shiitake přibližně 25 % z celkové produkce hub, která je 8 milionů tun ročně. V ČR je pouze okolo 10 pěstíren, ve kterých se pěstují převážně žampiony, kterých se vypěstuje přibližně 4 000 tun za rok. Shiitake se v ČR pěstují jen okrajově a i největší pěstírna hub v ČR – České houby, a.s. (Soběslav) – houby shiitake pro své odběratele z velké části dováží. V Evropě se shiitake pěstují nejvíce v Polsku a většina shiitake hub v našich velko i maloobchodech je právě odtud.

Existují různé odrůdy houževnatce jedlého?

Ano, shiitake odrůd je celá řada, podařilo se mi dohledat existenci 7 z nich: Donko, Koshin, Jyodonko, Namidonko, Chayori, Jyokoshin a Namikoshin. Bezpochyby jich existuje ještě více, ale protože je houba známá a vyhledávaná především v Asii, většina literatury je psaná čínsky či japonsky. V ČR jsou známe pouze dvě odrůdy a to Donko a Koshin, které jsem zmiňovala v disertační práci.

Jakou kulinářskou úpravu by autorka doporučila z hlediska zdravotního účinku této léčivé houby jako nejvhodnější?

Na tuto otázku se těžko v krátkosti odpovídá, protože u různých biologických aktivit vycházely různé tepelné úpravy jako nejvhodnější. Např. pro cytotoxickou aktivitu vůči buňkám rakoviny děložního čípku byly tepelné úpravy hodnoceny (řazeno vždy od nejvhodnější tepelné úpravy po tu nejméně vhodnou) v řadě čerstvé - pražené - vařené - sušené, vůči buňkám rakoviny jater v řadě čerstvé - vařené - sušené - pražené, vůči buňkám rakoviny slinivky v řadě čerstvé - pražené - vařené - sušené, z hlediska antioxidační aktivity pak pomocí radikálu ABTS v řadě čerstvé - vařené - pražené - sušené, z hlediska antioxidační aktivity pomocí radikálu DPPH v řadě čerstvé - pražené - vařené - sušené a z hlediska protizánětlivých vlastností v řadě pražené - sušené - vařené - čerstvé.

Odpovědi k otázkám RNDr. Pavla Hrouzka, Ph.D. k disertační práci Kristýny Kupcové na téma Sekundární sirné metabolity houževnatce jedlého:

Jaký je faktický rozdíl mezi bodem a) a bodem c) v podkapitole 2.4.1 Shiitake 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 povysvětlete prosím bod za a).

Tuto část jsem citovala z článku POUCHERET P., FONS F. a RAPIOR S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. *Cryptogamie: Mycologie*. 2006, 27, 311–333. Sama to interpretuji tak, že bod za a) v sobě zahrnuje inhibici vzniku a současně udržení nízké hladiny volných radikálů. U bodu za c) tedy mechanismus eliminuje radikály, mechanismus bodu za a) je založen na prevenci jejich vzniku.

Na straně 17 autorka nejdříve popisuje antioxidační vlastnosti fenolických látek a poté pokračuje větou v dalším odstavci, cituji: „Farmakologický efekt podání polysacharidové frakce ze shiitake 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?

Společným jmenovatelem těchto dvou odstavců jsou antioxidační vlastnosti shiitake. V kapitole byly souhrnně popsány různé látky či skupiny sloučenin, které jsou za antioxidační efekt zodpovědné, resp. o kterých se to ví (fenoly, polysacharidy a extrakty získané z organických rozpouštědel). Opravdu spolu fenolické látky a farmakologický efekt polysacharidové frakce nesouvisejí, proto jsem je oddělila odstavcem. Souhlasím s tím, že tento přechod „z jednoho na druhé“ měl být plynulejší a lépe uveden.

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.

Souhlasím, opravdu mě zmátly výrazy jako „antifungal drugs“, které se běžně ve vědecké sféře používají, ale česky nejsou správně. Děkuji za upozornění.

Osobně bych preferoval u konkrétně uvedených bioaktivních látek (antimikrobiálních či cytostatických) uvést též údaj o efektivitě těchto látek (hodnota IC50 či MIC), aby měl čtenář představu, v jakých řádech se potence těchto látek pohybuje.

Souhlasím.

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.

Na str. 37 je uvedeno (cituji): „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 $\geq 98\%$ (dle GC-MS i HPLC-PDA).“ Metoda NMR nebyla použita ke kvantifikaci ani k určení čistoty látky. Jinak souhlasím, že spektrum NMR mělo být v práci uvedeno, když už jsem se u něm zmiňovala a to jak pro lenthionin, tak i pro lentinikovou kyselinu.

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 se 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?

Mechanismus tohoto enzymatického rozkladu je poměrně složitý. Pomocí analytické techniky DART se mi podařilo během rozkladu lentinikové kyseliny detekovat pouze 3 ionty obsahující síru (právě podle izotopické obálky), a to jsou ionty následující:

				rozdíl
typ ionizace	ion	teoretická [M – H] [–] (Da)	změřená [M – H] [–] (Da)	(ppm)
negativní	[CHS ₂] [–]	76,9525	76,9514	-0,624
	[CH ₃ O ₂ S] [–]	78,9859	78,9848	-0,970
	[CH ₃ O ₂ S ₂] [–]	110,9580	110,9569	-0,246

Ion [CHS₂][–] je s velmi vysokou pravděpodobností 1,2-dithiiran. Jak by mohlo docházet k rozkladu lentinikové kyseliny za tvorby těch zbývajících dvou meziproduktů, si neodvážím odhadovat. Analytickou technikou HPLC-HRMS se nepodařilo detekovat žádný meziprodukt jejího rozkladu, a to navzdory ubývající koncentraci kyseliny lentinikové, a bohužel mechanismus rozkladu lentinikové kyseliny nejsem schopná navrhnout.

HPLC-MS analýza byla zaměřena na přítomnost thiosulfinátu, jenž nebyl nalezen na základě monoisotopické hmoty. Pokusila se autorka hledat ve vzorcích též kyselinu sulfenovou popřípadě jakékoliv intermediáty podobné molekulární váhy obsahující větší množství atomů síry (tato vlastnost by byla dobře vystopovatelná na základě tvaru isotopické obálky)?

Ano, o to jsem se pokusila. Bohužel, metodou HPLC-HRMS jsem (navzdory zřetelnému úbytku lentinikové kyseliny) žádnou sirnou sloučeninu nedetekovala. Žádná ze sirných sloučenin neionizovala.

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.

Obsah lenthioninu bývá v shiitake velmi vysoký, v rozmezí 30-100 ppm, dosahuje tedy až 0,01 % (HIRAIDE M., KATO A., NAKASHIMA T. The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* V: changes in lenthionine and lentinic acid contents during the drying process. *Journal of Wood Science*. 2010, 56, 477–482, příp. YASUMOTO K., IWAMI K. a MITSUDA H. Enzyme-catalized evolution of lenthionine from lentinic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1971, 35, 2070–2080). Rozmezí závisí na mnoha faktorech a může se lišit i řádově. Nejvíce záleží na obsahu lentinikové kyseliny (tedy potažmo na odrůdě shiitake a kultivačních podmínkách) a na způsobu zpracování hub. Co se obsahu formaldehydu týká, tak v sušených plodnicích *L. edodes* byly zaznamenány jeho mimořádně vysoké koncentrace (119–494 mg/kg) (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), přičemž v sušených shiitake byl jeho obsah i řádově vyšší nežli v houbách čerstvých (10-20 mg/kg) (LEQIN K., JINGRONG CH. a QIU SHUANG W. Effects of cultural practices on formaldehyde content of *Lentinula edodes*. *Acta Agriculturae Shanghai*. **2009**, 29, 78–81). Sama jsem v rámci disertační práce obsah lenthioninu v shiitake nekvantifikovala, stejně jako jsem nekvantifikovala obsah formaldehydu.

S interpretací cytotoxické bioaktivitní části práce veskrze souhlasím, až na jednu drobnost. Autorka správně ve shrnutí výsledků píše, že protirakovinný potenciál lenthioninu je spíše zanedbatelný, oproti tomu na str. 75 pak zmiňuje „Vzhledem k zanedbatelným protinádorovým vlastnostem lenthioninu...” Tato tvrzení jsou v rozporu a myslím, že správné je to první.

Souhlasím.

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 pro-apoptické efekty. Existuje nějaký důvod, proč by vodný extrakt houževnatce mohl obsahovat velké koncentrace této látky?

Extracelulární adenosin se v eukaryotických buňkách běžně vyskytuje, mimo buňky se dostává nejčastěji při jejím poranění, ale i membránovými kanály, aniž by buňka byla vystavena stresu. V některých tkáních ho může být přítomna koncentrace až 1 $\mu\text{mol/l}$ (PEYOT M., GADEAU A., DANDRE F., BELLOC I., DUPUCH F. a DESGRANGES C. Extracellular adenosine induces apoptosis of human arterial smooth muscle cells via A_{2b} -purinoceptor. *Circulation Research*. **2000**, 86, 76–85). Proč by extracelulárního adenosinu ale mělo být zrovna v shiitake více, netuším.

Autorka příliš nedisktuje rozdílné výsledky obdržené u vodných extraktů houževnatce ve dvou antioxidačních esejích ABTS a DPPH. Mohla by autorka pouze krátce na obhajobě zmínit rozdíl mezi těmito dvěma esejemi, nikoliv metodický, ale co se týče mechanismu a spektra detekovaných látek.

DPPH i ABTS jsou obě metody založené na eliminaci radikálů. Hlavním důvodem získání odlišných hodnot jsou podle mého názoru jiné kapaliny, ve kterých se syntetické radikály rozpouštějí a jejich odlišná stabilita. Radikál DPPH je radikál stabilní a je vhodné ho používat na sledování kinetiky. Je rozpustný v metanolu, ve vodě nerozpustný. Toto je značná nevýhoda, protože antioxidanty se v metanolu chovají odlišně od fyziologického prostředí. Radikál vykazuje absorpci při 520 nm, má fialovou barvu. Při neutralizaci se odbarvuje a žloutne. Radikál ABTS je stabilní méně a ke kinetickým studiím se moc nehodí, protože se samovolně zháší. Je ale rozpustný ve vodě, díky čemuž je možné stanovit antioxidační aktivitu ve fyziologickém prostředí. K otestování antioxidační aktivity se ABTS převede na radikálový kation přidáním persíranu sodného. Tento radikálový kation má modrou barvu a absorbuje světlo při 734 nm. Během reakce s antioxidanty se modrý ABTS radikálový kation přeneseme zpět do jeho bezbarvé neutrální formy.

Rozdíly ve výsledcích při stanovení ABTS a DPPH metodami jsou zcela běžné. Celá řada antioxidantů se jinak rozpouští v methanolu a jinak ve vodě, což pochopitelně ovlivní stanovení. Jako příklad uvádím dva velmi dobře známé antioxidanty: Rozpustnost kyseliny askorbové v metanolu je 11 mol/l, ve vodě 33 mol/l (SHALMASHI A. a ELIASSI A. Solubility of L-(+)-ascorbic acid in water, ethanol, methanol, propan-2-ol, acetone, acetonitrile, ethyl acetate, and tetrahydrofuran from (293 to 323) K. *Journal of Chemical and Engineering Data*. **2008**, 53, 1332–1334). Rozpustnost kyseliny gallové v metanolu je 28 mol/l, ve vodě 1,5 mol/l (DANESHFAR A., GHAZIASKAR H. S. a HOMAYOUN N. Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water and ethyl acetate. *Journal of Chemical and Engineering Data*. **2008**, 53, 776–778).

Proč je v antibakteriální části výsledků a diskuze zmiňován allicin? Bylo zkoumání antibakteriálního efektu allicinu 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.

V naší skupině pracujeme se strukturně podobnými sekundárními sirnými metabolity. Jejich srovnání mi přišlo zajímavé – především proto, že allicin je známější nežli lenthionin. Nicméně souhlasím, že tato studie měla být citována.

Odpovědi k otázkám doc. Ing. Jana Pánka, CSc. k disertační práci Kristýny Kupcové na téma Sekundární sirné metabolity houževnatce jedlého:

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.

Lentinan je ve vodě rozpustný polysacharid, nacházející se v plodnicích hub shiitake. Jeho molekulová hmotnost je 500 kDa a vykazuje specifickou rotaci 14–22° (NaOH). Je tvořen β -(1→3)-D-glukopyranosovými jednotkami s β -(1→6) větvením, které vytvářejí trojšroubovici. Jde o látku poměrně dobře prozkoumanou navíc s významnými biologickými vlastnostmi. Do souvislosti s léčbou rakoviny byl dán již v 70. letech minulého století (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). Dodnes se používá ke zvýšení účinnosti chemoterapeutik, především při léčbě rakoviny žaludku, prsu a střev – v roce 1985 byl schválen jako adjuvans (SMITH J.E., ROWAN N.J. a SULLIVAN R. Medicinal mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. *Cancer Research UK*, 2001) a od té doby je v Japonsku v kombinaci s chemoterapeutiky používán. Vzhledem k výsledkům posledních studií se patrně ani používat nepřestane, u 1423 pacientů s pokročilým stádiem rakoviny přežilo 1 rok o polovinu více pacientů nežli těch v kontrolní skupině (WANG H., CAI Y., ZHENG Y., BAI Q., XIE D. a YU J. Efficacy of biological response modifier lentinan with chemotherapy for advanced cancer: a meta-analysis. *Cancer Medicine*. **2017**, 6, 2222–2233). Podává se intravenózně, protože při perorálním podání je neúčinný (HAMURO J. Anticancer immunotherapy with perorally effective lentinan. *Gan To Kagaku Ryoho*. **2005**, 32, 1209–1215). Navzdory tomuto tvrzení se extrakt z shiitake obsahující lentinan prodává v lékárnách (pod komerčním názvem Lentinex) a dává se formou kapek. Kromě léčby rakoviny se používá i k léčbě HIV (opět především v Japonsku, např. GORDON M., BIHARI B., GOOLSBY E., et al. A placebo-controlled trial of the immune modulator, lentinan, in HIV-positive patients: a phase I/II trial. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1998**, 29, 305–330). Lentinan a jeho deriváty jsou totiž účinné proti nejrozličnějším druhům virálních infekcí, dokonce dokáží výrazně zpomalit výskyt symptomů doprovázejících onemocnění AIDS (MATTILA P., SUONPÄÄ K. a PIIRONEN V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*. **2000**, 16, 694–696). Důležitá úloha lentinanu spočívá v mobilizaci protilátek v organismu, kde dokáže potlačit i bakteriální infekce odolné vůči běžným antibiotikům (COATES P. M. Shiitake (*Lentinus edodes*). *Encyclopedia of dietary supplements*. 1. vyd. New York: Marcel Dekker. **2005**, 653–664). ISBN 0824747933. Též byl zaznamenán jeho pozitivní vliv při onemocnění malárií (*in vivo*, ZHOU L.D., ZHANG Q.H., ZHANG Y., LIU J. a CAO Y.M. 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) či žaludečním vředům (ZHU M., LEW T. H. a LUK C. T. Gastric protective effect of *Lentinus edodes* against ethanol-induced ulceration. *Fitoterapia*. **1997**, 68, 537–542).

Chybí mi úvaha, případně s podporou literárních zdrojů, co se děje s aktivními látkami v trávicím traktu člověka.

Jediná aktivní sloučenina, se kterou jsem v rámci disertační práce pracovala, byla hlavní sirná sloučenina vyskytující se v shiitake – lenthionin. Bohužel, co se děje s touto sloučeninou v trávicím traktu mi není známo a nepodařilo se mi to dohledat. Z vlastní zkušenosti vím, že se jedná o sloučeninu velmi stabilní, nerozkládá se ani při extrémních hodnotách pH, je velice špatně rozpustná. Osobně se tedy domnívám, že projde trávicím traktem člověka bez změny, ale je to jen můj odhad. Toto by se dalo možná otestovat na nějakém modelu trávicího traktu, ale pokud je mi známo, dokud to nikdo nezkusil.

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?

Myslím, že bych zůstala věrná chromatografickým metodám. Bohužel, HPLC-HRMS na našem pracovišti nemáme, musela jsem dojíždět na spolupracující pracoviště a ačkoli jsem se o optimalizaci pochopitelně pokusila, nepodařilo se. Pokud bych měla lepší přístup k této technice a více času, pokusila bych se zapůjčit si jinou kolonu, tedy změnit stacionární fázi, otestovat jinou mobilní fázi, lehce upravit pH vzorku rozpuštěním ve vhodném pufru a upravit gradient.

Jsou velké rozdíly ve výsledcích antioxidační aktivity měřené metodou DPPH a ABTS. Lze tyto rozdíly vysvětlit s přihlédnutím ke složení látek s antioxidační aktivitou?

DPPH i ABTS jsou obě metody založené na eliminaci radikálů. Hlavním důvodem získání odlišných hodnot jsou podle mého názoru jiné kapaliny, ve kterých se syntetické radikály rozpouštějí a jejich odlišná stabilita. Radikál DPPH je radikál stabilní a je vhodné ho používat na sledování kinetiky. Rozpouští se v methanolu, neboť je ve vodě nerozpustný. Toto je značná nevýhoda, protože antioxidanty se v methanolu chovají odlišně od fyziologického prostředí. Radikál DPPH vykazuje absorpci při 520 nm, má fialovou barvu. Při neutralizaci se odbarvuje a žlutne. Radikál ABTS je stabilní méně a ke kinetickým studiím se moc nehodí, protože se samovolně zháší. Je ale rozpustný ve vodě, díky čemuž je možné stanovit antioxidační aktivitu ve fyziologickém prostředí. K otestování antioxidační aktivity se ABTS převede na radikálový kation přidáním persíranu sodného. Tento radikálový kation má modrou barvu a absorbuje světlo při 734 nm. Během reakce s antioxidanty se modrý ABTS radikálový kation přenesení zpět do jeho bezbarvé neutrální formy.

Rozdíly ve výsledcích při stanovení pomocí ABTS a DPPH metod jsou zcela běžné. Celá řada antioxidantů se jinak rozpouští v methanolu a jinak ve vodě, což pochopitelně ovlivní stanovení. Jako příklad uvádím dva velmi dobře známé antioxidanty: Rozpustnost kyseliny askorbové v metanolu je 11 mol/l, ve vodě 33 mol/l (SHALMASHI A. a ELIASSI A. Solubility of L-(+)-ascorbic acid in water, ethanol, methanol, propan-2-ol, acetone, acetonitrile, ethyl acetate, and tetrahydrofuran from (293 to 323) K. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 2008, 53, 1332–1334). Rozpustnost kyseliny gallové v metanolu je 28 mol/l, ve vodě 1,5 mol/l (DANESHFAR A., GHAZIASKAR H. S. a HOMAYOUN N. Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water and ethyl acetate. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 2008, 53, 776–778).

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.

Doplňuji stanovisko EFSA zabývající se bezpečností konzumace shiitake v souvislosti s obsahem formaldehydu: EU Food Law, 2010, 448, 6: „navzdory vyššímu obsahu formaldehydu v shiitake oproti jiným houbám běžně kultivovaným je extrakt z nich bezpečný“.

Obsah formaldehydu v sušených shiitake je v rozmezí 100–500 mg/kg, v čerstvých potom v rozmezí 10–20 mg/kg.

Str. 18: V prvním odstavci o antivirálních vlastnostech je použita již hodně zastaralá literatura a nejsem si jist spolehlivostí publikovaných dat.

Souhlasím, bohužel novější články s původními daty (nikoli review) se mi nalézt nepodařilo.

Str. 27: Druhý bod cílů práce je formulován poněkud nešťastně. Biologická aktivita extraktů se neporovnávala s lenthioninem, ale s danými standardy, např. ATB.

Biologickou aktivitu extraktů jsem porovnávala mezi sebou, s lenthioninem i s danými standardy a toto mělo být v práci uvedeno.

Str. 40: V kap. 4.12.1. se píše, že „Působení proteázy bylo zastaveno přidáním vhodného média“. Co je to „vhodné médium“?

Vhodným médiem jsem myslela to médium, které je optimální pro kultivaci dané buněčné linie. To je pro případ buněčné linie HeLa RPMI-1640, pro linie HepG2 a PaTu je to DMEM.

Str. 58, poslední odstavec: Možná se dalo pokusit o nějakou predikci – minimálně u kultury PaTu – houby se jedí vždy tepelně upravené.

To by se jistě dalo, ale vzhledem k tomu, že výsledky nikterak „skvělé“ nebyly, o predikci jsem se ani nepokoušela.

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.

Strukturně si podobné opravdu nejsou, s tím souhlasím. Spojuje je především přítomnost atomu síry a v tom smyslu jsem to chtěla napsat.

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.

Souhlasím, tato poznámka byla spekulativního rázu.

Některé formulace, např. kohoutková voda nebo trypsinizace, znějí poněkud nevědecky.

Souhlasím.

Zahájení – přivítání členů komise, oponentů, školitele, uchazeče a hostů prof. Kalačem a prof. Třískou (předseda) a konstatování, že uchazečka splnila podmínky podle statutu ZF JU.

Předseda přečetl životopis uchazečky, seznámil s její publikační činností a doporučil práci k přijetí.

Uchazečka přednesla během 20 minut prezentaci ke své vědecké práci.

Oponenti (všichni přítomni) přednesli své oponentské posudky. Oponenti vznesli dotazy, uchazečka je postupně zodpověděla, a to velmi detailně. Všichni oponenti byli s odpověďmi (odevzdány uchazečkou písemně) spokojeni.

Zahájení vědecké diskuze, během které byly na uchazečku vzneseny dotazy, na které následně reagovala:

prof. Šafařík: Jaký je mechanismus inaktivace kultivačního roztoku?

- Buňky jsou adherentní, po nalití trypsinu se odlepí ode dna a dojde k následné inhibici.

prof. Šafařík: Ano, ale to je spíše vliv naředění, než vlastní inhibice.

- Pravděpodobně jde i o vliv nízké koncentrace, ano.

prof. Šafařík: Při testu lentioninu - byl účinnější vůči G+ nebo G- bakteriím?

- Rozdělení bakterií podle Grama jsem ve své práci neměla.

prof. Kalač: Lentinan má Mr asi 500kDa. Opravdu je rozpustný ve vodě? Vždyť je velký jako škrob!

- My sami jsme rozpustnost nezkoumali, tak je to uvedené v literatuře.

prof. Kalač: Co myslíte tím výrazem „pražení“, jak se houby upravují pražením?

- Jde v podstatě o smažení na sucho, bez oleje. Olej by mohl rušit stanovení.

prof. Kalač: V některých anglických salátech jsou syrové žampiony. Nejsou v Asii také syrové houby shiitake?

- Spíše ne, naopak, tepelnou úpravou se likvidují některé toxické látky. Ani v Anglii jsem nenarazila na salát s čerstvými neupravenými žampiony.

prof. Kalač: Shiitake je významná houba v lidovém léčitelství v Asii. Nejsou i u nás nějaké evropské houby s léčivými účinky?

- Jsou, ale v Asii má lidové léčitelství mnohem delší tradici.

prof. Kalač: Evropané mají asi i jiný přístup k houbám. Moc se v nich nevyznají, Češi říkají „prašivky“, Angličané zase „toadstool“, takže historicky se těch hub spíš bojíme než abychom je využívali.

doc. Dadáková: Ale Češi jsou zase historicky dlouhodobě na špičce mezi Evropany ve sbírání hub v lesích.

Tazatelé byli se všemi odpověďmi uchazečky spokojeni. Diskuse byla ukončena.

Po neveřejné poradě a po tajném hlasování komise jednomyslně konstatovala, že uchazečka práci obhájila a získává tak titul Ph.D.