

## MYCOSTEROLES — CHARACTERISTICS AND BIOLOGICAL IMPORTANCE (Oryg. Mykosterole — charakterystyka i znaczenie biologiczne)

SUŁKOWSKA-ZIAJA Katarzyna, HAŁASZUK Patrycja, MASTEJ Małgorzata,  
PIECHACZEK Małgorzata, MUSZYŃSKA Bożena

*Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków*

### Abstract

*A group of natural sterols isolated from mushrooms are mycosterols, of which derivatives the most interesting is ergosterol (5,7,22-ergostatrien-3 $\beta$ -ol) and its peroxide, which are presented in the fruiting bodies of most of the representatives of the Basidiomycota taxon. Mushroom sterols are synthesized in a similar way, but the reaction sequence, which is squalene metabolism and the stereochemistry of the major products are different. As with many derivatives of isoprene, the basic unit of the synthesis of sterols is isopentenyl pyrophosphate (IPP), which in turn is synthesized from acetyl-CoA by alternately pass away of mevalonic acid. Mycosteroles, they are considered beneficial compounds that have health promoting effects. It has been proven their ability to lower serum cholesterol, may also be effective in the prevention of certain types of cancer. Ergosterol, which is common in mushrooms, as peroxidation products thereof, also exhibits many beneficial effects. It may have the potential health benefits and influence on the improvement of essential physiological functions of human body, including reduced pain associated with the activity of inflammation, reduction in the incidence of cardiovascular disease, inhibition of the enzyme cyclooxygenase (COX) and lowering cholesterol levels. It also has antioxidant properties and inhibit the growth of fungi and bacteria.*

**Key words:** mycosterols, ergosterol, edible mushrooms, Basidiomycota

**Corresponding author:** Bożena Muszyńska e-mail: [muchon@poczta.fm](mailto:muchon@poczta.fm)

### Wstęp

Poszechnie występującą w organizmach żywych grupą związków są sterole. Są to organiczne związki chemiczne, należące do steroidów. Ze względu na pochodzenie, sterole możemy podzielić na trzy podstawowe grupy. Pierwszą z nich stanowią związki pochodzenia zwierzęcego, czyli zoosterole np.: cholesterol, lanosterol, cholesterol, czy ko-prostanol. Kolejną grupę stanowią związki pochodzenia roślinnego, tak zwane fitosterole, takie jak np.:  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kamp-esterol, brassikasterol. Ostatnią grupę naturalnych steroli tworzą związki wyodrębniane z grzybów, tzw. mykosterole, spośród których na szczególną uwagę zasługuje ergosterol oraz jego nadlitenek, które są obecne w owocnikach większości przedstawicieli *Basidiomycota* [1-3].

Sterole (dawniej steryny) są to wielopierścieniowe alkohole hydroaromatyczne, szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Występują w stanie wolnym (jako alkohole) lub związanym (glikozydy, alkaloidy, lipoproteiny). Grupa

hydroksylowa steroli może być zestryfikowana kwasem tłuszczowym, kwasem hydroksycynamonowym, bądź glikozylowana heksozą (zazwyczaj glukozą). Jest to grupa związków organicznych o złożonej budowie, zawierających układ sterydowy, czyli układ cyklopentano-perhydro-fenantrenowy, jako główną część cząsteczki. Przy węglu C3 posiadają grupę  $\beta$ -hydroksylową oraz jedno, lub kilka wiązań podwójnych w pierścieniu B i łańcuchu bocznym. Podwójne wiązanie jest zlokalizowane najczęściej przy C5, a łańcuch boczny przy C17 [1]. Ze względu na silnie hydrofobowy charakter sterole nie rozpuszczają się w wodzie, są natomiast bardzo dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych. Są to lipidy odporne na zmydlanie i można je znaleźć w znacznych ilościach we wszystkich tkankach zwierzęcych i roślinnych. Związki te mogą być sklasyfikowane również jako triterpiny, ponieważ powstają one ze skwalenu, który poprzez cyklizację, desaturację i 3- $\beta$ -hydroksylację tworzy lanosterol u zwierząt, lub cykloartenol

w roślinach.

Zazwyczaj analiza poszczególnych steroli obejmuje ekstrakcję lipidów, zmydlanie (które może być poprzedzone wcześniejszą kwasową hydrolizą), ekstrakcję frakcji, która nie uległa zmydleniu i rozdzielenie, bądź częściowe oczyszczenie steroli. Jednakże niektóre niezmydlające się związki, takie jak skwalen, czy inne liniowe węglowodory mogą przeszkadzać w analizie steroli, co wymaga dodatkowego etapu umożliwiającego oddzielenie tych związków. Zazwyczaj jest to osiągnięte za pomocą technik chromatograficznych, np. chromatografii cienkowarstwowej lub ekstrakcji w fazie stałej, bądź też tworzenia pochodnych sterolu i ich analizy metodą chromatografii gazowej lub chromatografii gazowo-cieczowej (GLC), co wymaga dodatkowo etapu wytwarzania pochodnych z trimetylosilanem. Odpowiedni rozdział może być także uzyskany za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), który jest szybszy niż analiza GLC i pracuje w niższych temperaturach i warunkach detekcji [1-10].

### Bioogeneza

Fitosterole i sterole grzybowe są syntetyzowane w podobny sposób, ale sekwencja reakcji, jakim ulega skwalen i stereochemia głównych produktów są różne. Grzyby z taksonu Basidiomycota produkują ergosterol (5,7,22-ergostatrien-3 $\beta$ -ol), jako główny związek posiadający dwa podwójne wiązania w strukturze pierścienia sterolu zamiast jednego występującego u roślin. Biosynteza steroli została opisana na przykładzie grzyba *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Podobnie jak w przypadku wielu związków pochodnych izoprenu, podstawową jednostką do syntezy steroli jest pirofosforan izopentenylu (IPP), który z kolei jest syntetyzowany z acetylo-CoA na drodze przemian kwasu mewalonowego. Na kolejnych etapach przemian IPP i jego izomer, dimetyloallilo-pirofosforan (DMAPP), ulegają kondensacji, z wytworzeniem pirofosforanu geranylu (GPP) przy udziale enzymu, transferazy prenylowej, a następnie przyłączeniu kolejnej cząsteczki IPP, co prowadzi do utworzenia pirofosforanu farnesyly (FPP). Następnie powstaje skwalen, będący prekursorem steroli, który jest tworzony poprzez kondensację dwóch cząsteczek FPP, przy udziale enzymu syntazy skwalenowej. W dalszym etapie skwalen ulega cyklizacji do układu cyklopentanofenantrenu. Zamknięcie pierścienia jest możliwe wtedy, gdy

kationy wodoru H<sup>+</sup> reagują z węglem C3 układu cyklicznego. Metabolitem pośrednim jest oksydoskwalen, z którego powstaje cykloartenol, a następnie lanosterol i inne sterole, np. sitosterol, cholesterol, stigmasterol. Przekształcanie skwalenu w oksydoskwalen przy udziale NADPH<sub>2</sub> i tlenu jest katalizowane przez epoksydazę skwalenową. W biosyntezę ergosterolu, który jest głównym sterolem występującym w grzybach, są zaangażowane dwa enzymy grupy cytochromu P450: CYP51 (14-demetylaza lanosterolu) i CYP61 (C-22 desaturaza sterolowa). Enzymy te w *Saccharomyces cerevisiae* są kodowane odpowiednio przez geny ERG11 i ERG5 [1-7]. Biosynteza ergosterolu została bardzo dokładnie przebadana i enzymy, biorące w niej udział, wyizolowane z grzybów są obecnie stosowane w przemyśle do produkcji syntetycznych steroli. Podobnie jak w biosyntezie cholesterolu u zwierząt, lanosterol jest pierwszym cyklicznym związkiem pośrednim w tworzeniu wolnych steroli w grzybach [8-15]. Większość mykosteroli ulega różnicowaniu przez metylację cholesterolu przy C24, a następnie przez serię demetylacji w pozycji C4 i C14, oraz tworzenie podwójnych wiązań, co prowadzi do powstania steroli C28 powszechnie występujących w owocnikach większości grzybów [16]. Liczne szlaki biosyntezy prowadzące do powstawania ergosterolu różnią się w zależności od sekwencji przemian podwójnego wiązania. W niektórych taksonach, biosynteza ergosterolu jest niepełna i czasem może to skutkować powstawaniem innych produktów końcowych (tj. niekonwertowanych do ergosterolu).

### Metabolizm steroli

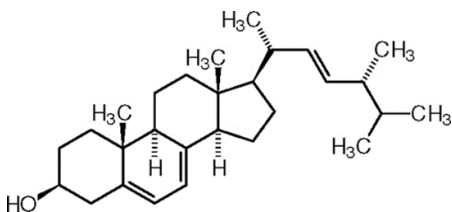
Ergosterol dostarczony doustnie do organizmu jest wchłaniany w przewodzie pokarmowym przez enterocyty i uwalniany do układu krążenia. Po tym jest akumulowany i metabolizowany w wątrobie, jelicie, płucach, skórze, śledzionie, nadnerczach oraz we krwi, z wytworzeniem nowych, aktywnych biologicznie produktów, takich jak 17,24-dihydroxyergosterol – dla którego stwierdzono hamowanie nadmiernej proliferacji komórek skóry, co wykazano na hodowlach komórkowych człowieka keratynocytów i liniach komórkowych czerniaka [11].

Enzym degradujący łańcuch boczny cholesterolu zawierający cytochrom P-450 (P-450sc) to enzym mitochondrialny, którego główną funkcją jest katalizowanie reakcji konwersji cholesterolu

do pregnenolonu. W miejscu aktywnym w cytochromie przeprowadzane są kolejne hydroksylacje łańcucha bocznego cholesterolu w pozycjach 22 i 20, a następnie odszczepienie łańcucha bocznego prowadzące do powstania pregnenolonu i aldehydu izokaproнового. Wykazano, że P-450scc katalizuje również reakcję odszczepienia łańcucha bocznego innych steroli roślinnych, w tym kampesterolu, który również posiada grupę metylową przy węglu C24. Udowodniono również, że P-450scc w odtworzonym układzie *in vitro* lub w izolowanych mitochondriach hydroksyluje ergosterol z wytworzeniem dihydroksyergosterolu (z grupami hydroksylowymi zlokalizowanymi przy C24 i C17) jako głównego produktu tej przemiany. Powinowactwo ergosterolu do miejsca aktywnego P-450scc jest dużo słabsze niż cholesterolu, co może częściowo tłumaczyć niższą szybkość reakcji hydroksylacji w porównaniu do szybkości reakcji obserwowanej przy równoważnym stężeniu cholesterolu [12]. Można więc przyjąć, że przekształcanie ergosterolu do dihydroksyergosterolu prawdopodobnie zachodzi w narządach wykazujących ekspresję cytochromu P-450scc, takich jak nadnercza, gonady, łożysko, mózg, przewód pokarmowy, nerki i skóra.

### Charakterystyka najważniejszych związków sterolowych występujących w grzybach

**Ergosterol** (24R-metylo-cholesta-5,7,22(E)-trienol) odkryty ponad 100 lat temu w sporyszu *Claviceps purpurea*, został uznany za sterol charakterystyczny dla grzybów (Ryc.1).



Ryc.1. Ergosterol

Nie jest on jednak obecny we wszystkich gatunkach [16]. Ergosterol może występować w grzybach zarówno w formie wolnej jak i zestrzyfikowanej, przy czym względny stosunek

obu tych form może się różnić pomiędzy poszczególnymi gatunkami [11]. Ergosterol jest głównym składnikiem błon komórkowych grzybów, silnie związanym z cytoplazmą. Występuje on w większości gatunków grzybów z gromady *Basidiomycota*, przy czym największą zawartość zanotowano w gatunkach saprotrofitycznych. Stanowi on 83-89% całkowitej zawartości steroli. Jest on także produktem wyjściowym do produkcji kortyzonu – hormonu kory nadnerczy o działaniu przeciwzapalnym i przeciwnadciężnym [1,17-20]. Wykazano również, że związek ten posiada wiele prozdrowotnych właściwości, jak aktywność przeciwzapalna, przeciwmutleniająca czy przeciwdziałająca hiperlipidemii. Ponadto może być zaangażowany w aktywację ekspresji określonych genów obronnych [1].

Powstawanie ergosterolu wymaga trzech reakcji, które nie występują w biosyntezie cholesterolu, są to:

- reakcja metylowania w pozycji C24,
- redukcji przy C24,
- wprowadzenia podwójnego wiązania w łańcuchu bocznym przy C22 [16].

Ponieważ, jak już wcześniej wspomniano, ergosterol stanowi istotny składnik błon komórkowych grzybów, zakłócenie jego syntezy prowadzi do zaburzenia rozmnażania grzybów i ich obumierania. W medycynie wykorzystano ten czuły punkt metabolizmu grzybów w leczeniu chorób grzybowych (mikozy, grzybic). Opracowano leki, które na różnych etapach biosyntezy ergosterolu blokują ten proces.

Ergosterol może być przekształcony do witaminy  $D_2$  poprzez działanie promieniowaniem UV. Ergosterol ulega fotolizie pod wpływem promieniowania UV o długości fali 280-320 nm, dając różne produkty. Głównym z nich jest prowitamina  $D_2$  oraz izomery ergosterolu: tachysterol i lumisterol. Prowitamina  $D_2$  ulega spontanicznemu przegrupowaniu pod wpływem ciepła do witaminy  $D_2$ . Po spożyciu witaminy  $D_2$  jest ona metabolizowana do aktywnej biologicznie postaci  $1\alpha,25$ -dihydroksywitaminy  $D_2$  poprzez formę pośrednią – 25-hydroksywitaminę  $D_2$ . Podobnie wygląda to w ludzkiej skórze, przede wszystkim w naskórku (głównie w keratynocytach warstwy rozrodczej). 7-dehydrocholesterol, czyli prowitamina  $D_3$  ulega nieenzymatycznej fotoizomeryzacji do prowitaminy  $D_3$  a następnie w ciągu kilku godzin pod

działaniem energii cieplnej jest przekształcana do witaminy D<sub>3</sub>.

W królestwie roślin i zwierząt ergosterol oraz witamina D<sub>2</sub> są praktycznie nieobecne. Występują jedynie w kilku gatunkach ryb jak łosoś, dorsz, tuńczyk, oraz w tranie. Mleko, płatki kukurydziane, margaryna oraz niektóre soki owocowe są wzbogacane w witaminę D. W związku z tym, głównym źródłem tej witaminy zarówno w północnych jak i południowych szerokościach geograficznych są grzyby. Co prawda obfitują one w ergosterol, ale ilość witaminy D powstałej pod wpływem promieniowania słonecznego, w znacznym stopniu zależy od pogody oraz od stanowiska, na którym występują.

Na niedobór witaminy D szczególnie narażone są osoby starsze mieszkające w domach opieki, ludzie o ciemnej skórze, gdyż melanina, jako naturalny filtr skóry chroni jej głębsze warstwy przed szkodliwym działaniem promieni ultrafioletowych, które wchodzą w skład promieniowania słonecznego. Powoduje to hamowanie przenikania promieni słonecznych głęboko w skórę, co skutkuje mniejszą produkcją witaminy D. Tak samo działają kremy z filtrami UV.

Witamina D sprawia, że wapń jest bardziej przyswajalny dla dzieci, osób starszych oraz kobiet po menopauzie. Deficyt witaminy D może prowadzić u dzieci do rozmiękania kości (osteomalacja), a u dorosłych do osteoporozy.

Badania kliniczne wykazały związek pomiędzy poziomem witaminy D<sub>2</sub> a prawidłowym funkcjonowaniem układu sercowo-naczyniowego. Udowodniono, że niski poziom metabolitów witaminy D może przyczynić się do zwiększonego ryzyka wystąpienia zastoynowej niewydolności serca, a co za tym idzie większej śmiertelności. Dodatkowo pojawia się coraz więcej dowodów świadczących o istnieniu związku pomiędzy odpowiednim poziomem witaminy D<sub>2</sub> a zmniejszonym ryzykiem wystąpienia raka jelita grubego, prostaty, piersi, jajnika, chorób autoimmunologicznych, cukrzycy typu I czy choroby Leśniowskiego-Crohna [11].

**Nadtlenek ergosterolu**, podobnie jak ergosterol występuje w większości gatunków grzybów z gromady *Basidiomycota*. Po raz pierwszy związek ten został wyizolowany z grzyba *Hericium erinaceum*. Posiada on szerokie spektrum aktywności biologicznej, jak np. działanie antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, czy przeciwdrobnoustrojowe

[5]. Ponadto uważa się, że nadtlenek ergosterolu występuje jako pośredni związek w reakcji utleniania enzymatycznego zależnego od H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w szlaku biosyntezy steroidowych dienów lub jako produkt detoksykacji reaktywnych form tlenu. Jego zawartość w komórkach zależy od wielu czynników, m.in. od poziomu reaktywnych form tlenu i indywidualnego stosunku pomiędzy tworzeniem nadtlenku ergosterolu i jego ponownej konwersji do ergosterolu. Możliwe jest, że obecność substancji o właściwościach przeciwutleniających w biomacie może mieć wpływ na wielkość stosunku ergosterolu do nadtlenku ergosterolu [5].

**Ergokalcylferol** (witamina D<sub>2</sub>) jest to organiczny związek chemiczny z grupy witamin D. Niektóre gatunki grzybów (jak np. *Grifola frondosa*, *Morchella* spp., *Lentinula edodes*) stanowią bogate źródło ergokalcylferolu. Związek ten jest wytwarzany w organizmach grzybów po wystawieniu na działanie światła słonecznego lub innych źródeł promieniowania UV, na skutek fotosyntezy przez konwersję ergosterolu do witaminy D<sub>2</sub> poprzez wytwarzanie nietrwałych półproduktów (tachysterol, lumisterol) [10].

**Cholekalcyferol** (witamina D<sub>3</sub>) to kolejny związek z grupy steroli występujących w owocnikach grzybów zaliczany do grupy witamin D. Jest wytwarzany w skórze człowieka z 7-dehydroergosterolu, podczas ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe [10].

### Właściwości biologiczne steroli

Sterole są istotnymi składnikami błon komórkowych wszystkich organizmów eukariotycznych. Są one uznawane za związki posiadające korzystne efekty prozdrowotne. Udowodniono ich zdolność do obniżania poziomu cholesterolu w surowicy, ponadto mogą być skuteczne w prewencji niektórych typów nowotworów. Ergosterol, który powszechnie występuje w grzybach, podobnie jak produkty jego peroksydacji, również wykazuje wiele korzystnych efektów. Może on mieć potencjalne właściwości prozdrowotne i wpływać na poprawę istotnych funkcji fizjologicznych organizmu człowieka, takich jak: zmniejszenie bólu związanego z aktywnością stanu zapalnego, zmniejszeniem częstości występowania chorób układu krążenia, hamowaniem enzymu cyklooksygenazy (COX) oraz obniżaniem poziomu cholesterolu. Posiada również właściwości przeciwutleniające i hamujące rozwój grzybów i bakterii [11,14].

### Właściwości przeciwutleniające

Liczne badania wykazały, że tlen singletowy i wolne rodniki tlenowe odgrywają ważną rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak np. reakcje enzymatyczne zachodzące w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, odtruwające reakcje układu cytochromu P450 i synteza prostaglandyn. Wolne rodniki tlenowe mogą również indukować peroksydację lipidów, co z kolei może powodować uszkodzenia materiału genetycznego w wyniku reakcji krzyżowych dialdehydu malonowego (MDA), będącego jednym z głównych produktów peroksydacji, z zasadami azotowymi wchodzącymi w skład kwasów nukleinowych [2]. Dzięki temu MDA może być użyty jako wskaźnik peroksydacji lipidów. Głównym powodem wysokiej wrażliwości lipidów błonowych na utlenianie jest znaczna zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które z łatwością ulegają peroksydacji, indukowanej przez wolne rodniki. Obecnie środowisko otaczające człowieka dostarcza wielu mutagenów i kancerogenów (czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne), które generują powstawanie wolnych rodników, a zatem spożywanie odpowiedniej ilości przeciwutleniaczy (takich jak np. tokoferol, witamina C, czy glutation) wydaje się być niezbędne, aby zmniejszyć ryzyko zachorowania na choroby cywilizacyjne. Dlatego też, przeprowadza się liczne badania substancji o potencjalnym działaniu przeciwutleniającym, które mogą być pozyskiwane z grzybów jadalnych. W celu określenia aktywności antyoksydacyjnej ekstraktów z różnych gatunków grzybów, wykorzystano lipidy mikrosomów wątroby szczura, które zostały poddane peroksydacji według metody  $Fe^{2+}$ /askorbinianu w warunkach *in vitro*. Wśród ekstraktów z 20 przebadanych gatunków grzybów, *Armillariella mellea*, *Daedalea dickinsii*, *Fomitella fraxinea*, *Pleurotus cornucopiae* wykazywały znaczące hamowanie peroksydacji lipidów (odpowiednio 22,8 %, 22,5 %, 38,3 % i 19,5%), w stężeniu 100 mg/ml, w porównaniu z grupą kontrolną. Eksperymenty wykazały, że związkiem odpowiedzialnym za aktywność przeciwutleniającą jest nadtlenek ergosterolu [4].

Nadtlenek ergosterolu wykazywał wzrastającą tendencję do hamowania peroksydacji lipidów wraz ze wzrostem jego stężenia, oraz wykazywał 46,3% inhibicji peroksydacji lipidów w stężeniu 690  $\mu$ M. Aktywność antyoksydacyjną nadtlenu ergosterolu porównano z wynikami innych znanych przeciwutleniaczy.

Nadtlenek ergosterolu wykazywał silniejsze działanie niż  $\alpha$ -tokoferol i tiomocznik (odpowiednio 19,2% i 21,5%) oraz słabsze działanie niż butylowany hydroksytoluen (BHT) i butylowany hydroksyanizol (BHA). Powyższe wyniki wskazują, że nadtlenek ergosterolu izolowany z grzybów może być stosowany jako skuteczny, naturalny przeciwutleniacz [4].

### Działanie przeciwnowotworowe

Choroby nowotworowe są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. W Europie Wschodniej, owocniki *Imonotus obliquus* były wykorzystywane w medycynie ludowej do leczenia raka i chorób żołądka już od XVI lub XVII wieku. Doświadczenia z krajów Azji i Europy Wschodniej pokazują, że grzyby mogą odegrać ważną rolę w profilaktyce i leczeniu raka. Przykładem może być *Piptoporus betulinus*, stosowany tradycyjnie w Czechach do leczenia raka odbytnicy i chorób żołądka. Efekty przeciwnowotworowe ekstraktów i izolowanych związków tego grzyba zostały przebadane na komórkach nowotworowych w testach na zwierzętach [6]. Wykazano, że cytotoksyczne działanie przeciw komórkom nowotworowym wykazują również nadtlenek ergosterolu z *Paecilomyces tenuipes* i sterole z grzybni *Cordyceps sinensis* (wśród wielu innych związków) [6]. W innych badaniach wykazano, że ergosterol i nadtlenek ergosterolu wyizolowane z jadalnego gatunku *Hypsizigus marmoreus* mogą hamować indukowane przez TPA (13-octan-12-O-tetradekanoilforbolu) zapalny obrzęk ucha i rozwój nowotworu podczas dwustopniowej kancerogenezy wywołanej przez DMBA (7,12-dimethylbenz[a]antracen) i TPA u myszy. Dlatego sterole te mogą okazać się przydatne jako czynniki chroniące przed rozwojem nowotworów [18].

Nadtlenek ergosterolu wyizolowany z *Sarcodon aspratus* hamował wzrost komórek białaczki promielocytarnej (HL60) w dawce powyżej 10  $\mu$ M. Natomiast 25  $\mu$ M (10,7  $\mu$ g/ml) nadtlenu ergosterolu wyizolowanego z *Sarcodon aspratus* zmniejszało liczbę żywych komórek do 5% w odniesieniu do grupy kontrolnej i indukowało komórki apoptotyczne i fragmentację nukleosomalnego DNA w większości komórek HL60 po 24h inkubacji. Wyniki te dowodzą, że nadtlenek ergosterolu hamował wzrost komórek HL60 poprzez indukcję apoptozy, jednakże mechanizm tego działania nie został jeszcze dokładnie poznany [13]. Ergosterol również posiada właściwości przeciwnowotworowe. Efekty takie

odnotowano w hodowli komórkowej oraz w warunkach *in vivo* u szczurów. Niektóre badania sugerują, że aktywność przeciwnowotworowa ergosterolu może być spowodowana bezpośrednim hamowaniem angiogenezy, indukowanej przez guzy lite [11]. Ponadto właściwości przeciwnowotworowe i antymutagenne witaminy D<sub>2</sub> (ergokalcyferolu), powstającej z ergosterolu, są dobrze znane, a dzięki jej niskiej toksyczności (minimalne działanie hiperkalcemiczne) hydroksylowane formy witaminy D<sub>2</sub> są uważane za potencjalne leki do leczenia nowotworów różnego typu, w tym czerniaka [12]. Kolejne badania przeprowadzone na hodowlach komórkowych wykazały aktywność biologiczną 17 $\alpha$  – i 24-dihydroxyergosterolu, polegającą na hamowaniu proliferacji keratynocytów naskórka człowieka. Wyniki te są zgodne z doniesieniami o silnym działaniu przeciwnowotworowym i antyproliferacyjnym metabolitów ergosterolu na komórki zarówno człowieka, jak i zwierząt. Należy również zauważyć, że produkt rozerwania pierścienia B w ergosterolu (witamina D<sub>2</sub>) sprzyja różnicowaniu się keratynocytów w badaniach *in vivo*, i chroni je przed fotouszkodzeniami, wywołanymi promieniowaniem UV po zastosowaniu miejscowym. Ponadto badając komórki czerniaka wykazano, że zarówno ergosterol, jak i jego metabolit dihydroksyergosterol hamują syntezę DNA, co sugeruje lokalny metabolizm ergosterolu możliwy dzięki ekspresji cytochromu P-450sc przez komórki czerniaka [12].

### Działanie przeciwzapalne

Wykazano, że ergosterol, ergosta-4-6-8 (14),22-tetraen-3-on (21) i 1-oleoilo-2-linoleoyl-3-palmitoylglycerol, wyizolowane z grzyba jadalnego *Grifola frondosa*, mogą hamować aktywność cyklooksygenazy 1 i 2, przez co wykazują one silne działanie przeciwzapalne [6]. W innych badaniach udało się wyizolować dwa znane sterole, ergosterol i 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol, które wykazały aktywność antyoksydacyjną i zdolność hamowania cyklooksygenazy. Zostały one wyizolowane z owocnika *Agrocybe aegerita* [21]. Ponadto nadtlenek ergosterolu hamuje indukowany przez 13-octan-12-O-tetradekanoiloforbolu (TPA) zapalny obrzęk ucha, oraz okazał się być selektywnie aktywny wobec enzymów PLA<sub>2</sub>, wydzielonych z jadu grzechotnika diamentowego (*Crotalus adamenteus*). Aktywność ta może sugerować możliwe medyczne wykorzystanie tego związku jako surowicy (antytoksyny) lub/i środka przeciwzapalnego [5].

### Aktywność przeciwbakteryjna, przeciwgrzybiczna i przeciwwirusowa

W strzępkach grzybów znajdują się substancje przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne. Są im potrzebne aby przetrwać w ich naturalnym środowisku. Nie jest więc zaskakujące, że związki o takich właściwościach mogą być wyizolowane z wielu gatunków grzybów i że mogą być one wykorzystane w leczeniu wielu chorób [6]. Właściwości przeciwwirusowe zostały opisane nie tylko dla całych ekstraktów z grzybów ale także dla poszczególnych związków. Mechanizm tego działania może być wynikiem inhibicji enzymów wirusa lub hamowania syntezy kwasów nukleinowych, a także hamowania adsorpcji i wychwytu wirusów w komórkach ssaków. Jak udało się wykazać w eksperymentach, nadtlenek ergosterolu obecny w wielu grzybach posiada aktywność *in vitro* przeciw wirusowi grypy typu A i B [6,9]. Nadtlenek ergosterolu wykazuje także aktywność przeciwbakteryjną wobec *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas* sp., *Candida albicans* i *Aspergillus niger*. Natomiast stwierdzono brak aktywności tego związku wobec *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Escherichia coli* (ATTC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC 27753) i *jedenastu szczepów Candida spp.* Ponadto wykazał on słabą aktywność wobec *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) [5]. Dodatkowe steroidy, takie jak 5 $\alpha$ -ergosta-7-, 22-dien-3 $\beta$ -ol lub 5,8-epidioxy-5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -ergosta-6-, 22-dien-3 $\beta$ -ol wyizolowane z *Ganoderma applanatum* wykazują niewielką aktywność w stosunku do licznych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii [6].

### Inne

Stwierdzono również, że sterole i ich biochemiczne prekursorzy w połączeniu z ubichinonem i/lub plastochinonem, oddziałują w sposób synergiczny przeciwstarzeniowo na skórę, również przeciw efektem wywołanym przez światło. Działają regenerująco w uszkodzeniach struktury skóry spowodowanej przez promieniowanie i czynniki endogenne.

### Występowanie steroli w gatunkach z gromady Basidiomycota

Liczne badania dotyczące zawartości steroli w owocnikach z taksonu *Basidiomycota*, dowiodły, że są to związki powszechnie występujące w świecie grzybów. Mogą one występować zarówno w stanie wolnym, jak i związanym. Całkowita zawartość związków o charakterze

steroli w gatunkach grzybów wielkoowocnikowych waha się w granicach 625 – 774 mg/100g suchej masy [8]. Najczęściej spotykanym steroidem grzybowym jest ergosterol, oraz jego nadtlenek, występujące u większości przedstawicieli gromady *Basidiomycota*. Ergosterol stanowi 83-89% całkowitej zawartości steroli [20]. Zawartość ergosterolu w dziko rosnących gatunkach grzybów, jak *Cantharellus tubaeformis*, *Cantharellus cibarius*, *Boletus edulis* waha się w zakresie 1,4-4,0 mg/g suchej masy. Natomiast w gatunkach grzybów uprawnych: *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* i *Pleurotus ostreatus* zawartość ergosterolu mieściła się w granicach 3,7-5,1 mg/g suchej masy. W powyższych gatunkach grzybów wykryto również takie związki jak: ergosta-7,22-dienol, ergosta-5,7-dienol, oraz ergosta-7-enol (fungisterol) [15]. Grzybami bogatymi w sterole okazały się gatunki należące do rodzaju *Tuber*. W owocnikach: *Tuber sinense*, *Tuber aestivum*, *Tuber indicum*, *Tuber himalayense* i *Tuber borchii* var. *sphaerospermum* zidentyfikowano 13 steroli. Związkami dominującymi ilościowo były brassikasterol i ergosterol (odpowiednio 17-64% i 25-67%). Pozostałe sterole to między innymi: cholesterol, 5-dihydroergosterol, kampesterol, 24(28)-dehydroergosterol, stigmasterol, stigmasta-7,24(28)-dienol, fungisterol, lanosterol,  $\beta$ -sitosterol, czy 4 $\alpha$ -metyloergosta-8(9),24(28)-dienol [14]. Z kolei w gatunkach *Piptoporus betulinus*, *Coriolus pargamentus*, *Coriolus versicolor*, *Coriolus heteromorphus*, *Fomitopsis cytisina*, *Fomitopsis piniola*, *Microporus flabelliformis*, *Gloephyllum sepiarium*, *Crytoderma citrinum* i *Grifola frondosa* oznaczono ergosterol i ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol [19]. Z gatunku *Paxillus panuoides* (*Basidiomycetes*) wyizolowano dwa związki należące do steroli: 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioksy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol, posiadające silne właściwości przeciwnowotworowe, oraz (22E,24R)-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-on [21].

Innym przykładem sterolu występującego w owocnikach grzybów jest nadtlenek ergosterolu, związek o aktywności cytotoksycznej. Związek ten po raz pierwszy został wyizolowany z grzybni jadalnego grzyba *Hericium erinaceum* [5]. Za pomocą metod densyometrycznych oznaczono ilościowo zawartość nadtlenu ergosterolu w n-heksanowych wyciągach z grzybni *Hericium erinaceum*, *Laetiporus sulfureus* i *Morchella esculenta*, czy owocników *Boletus edulis*, *Suillus bovinus* i *Boletus badius*. Zawartość nadtlenu ergosterolu w powyższych gatunkach

wynosiła odpowiednio: 15,98 $\pm$ 0,78; 10,07  $\pm$ 0,75; 13,37 $\pm$ 0,56; 29,32 $\pm$ 1,43; 17,27 $\pm$ 0,84 i 12,60 $\pm$ 0,59 mg/100g. Nadtlenek ergosterolu został ponadto wyizolowany z licznych gatunków grzybów uznanych za lecznicze oraz jadalnych jak np. *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis*, *Volvariella volvacea*, *Armillariella mellea*, grzybów mikroskopowych np. *Gibberella fujikuroi* oraz *Aspergillus* spp., czy drożdży – *Saccharomyces cerevisiae* [5].

Inne przykłady steroli grzybowych to fungisterol, (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,22E)-ergosta-6,8,22-trien-3-ol, hydroksyergosterol, izoergosterol, ergosta-7,22-dienol oraz ergosta-5,7-dienol [17].

Pierprznik jadalny (*Cantharellus cibarius* Fr.), czyli kurka jest jednym z najbardziej cenionych i obecnie najchętniej zbieranych gatunków grzybów. Posiada dużą wartość odżywczą, aromatyczny zapach i miły dla kolor. Nie robaczywieje, występuje niemal wszędzie i w dużych ilościach. Wiele badań składu chemicznego tego gatunku wykazały, że jest on bogatym źródłem ergokalcyferolu. Na dodatek, nawet po kilku latach przechowywania wysuszonych owocników zawartość witaminy D<sub>2</sub> jest wysoka i wynosi średnio 1,43  $\mu$ g/g suchej masy. Różnice w zawartości ergokalcyferolu wynikają z różnego nasłonecznienia stanowisk, z których pochodzą owocniki.

*Agaricus bisporus* (Pieczarka dwuzarodnikowa) zawiera znaczące ilości ergosterolu (średnio 61,5 mg/100 g). W niewielkich ilościach w pieczarkach występuje także ergosta-7-enol (1,73 mg/100 g), ergosta-5,7-dienol (6,05 mg/100 g) i ergosta-7,22-dienol (2,45 mg/100 g). Badania wpływu promieniowania UV-C na powstawanie witaminy D<sub>2</sub> przeprowadzone przez Centre for Plant and Food Science Uniwersytetu Australii Zachodniej, wykazały wysoki wskaźnik konwersji ergosterolu do witaminy D<sub>2</sub> po krótkotrwałej ekspozycji na to promieniowanie owocników tego gatunku w trakcie rozwoju. Stężenie ergokalcyferolu powstałego po naświetlaniu promieniowaniem UV-C przez 2,5; 5 i 10 min wynosiło odpowiednio 6,6; 15,6 i 23,1  $\mu$ g/g suchej masy. Wytworzona w ten sposób witamina D<sub>2</sub> była dobrze wchłaniana i metabolizowana, o czym świadczyła obecność 25-(OH) witaminy D<sub>2</sub> u szczurów karmionych przez 3 tygodnie grzybami wystawionymi na działanie promieniowania UV-C. Wchłanianie ergokalcyferolu zostało określone poprzez pomiar stężenia 25-hydroksywitaminy D<sub>2</sub> w osoczu szczurów karmionych owocnikami pieczarki, które nie były poddane

Tabela 1. Zawartość witaminy D oraz steroli w gatunku *Lentinula edodes*.

Lentinula edodes	Nr próbki	Witamina D <sub>2</sub> (µg/100 g śm)	Ergosterol	Ergosta-7,22-dienol	Ergosta-5,7-dienol	Ergosta-7-enol
	1	0,15	83,0	2,04	7,31	4,63
	2	1,15	107,0	2,76	7,25	6,56
	3	0,41	74,4	2,18	6,15	5,12
	4	0,03	75,4	2,05	5,34	3,79
Średnia zawartość		0,435	84,95	2,26	6,51	5,03

ekspozycji na promieniowanie UV-C 25-hydrokswitaminą D<sub>2</sub> była praktycznie niewykrywalna, w przeciwieństwie do osocza szczurów, którym podawane były grzyby naświetlone promieniowaniem UV-C. Ponadto ilość 25-OH-witaminy D<sub>2</sub> wykrytej w osoczu, zależna była od dawki. Grzyby podawane były w dawkach od 50 do 200 mg/kg masy ciała/dobę codziennie przez 3 tygodnie. Koncentracja witaminy D<sub>2</sub> w pieczarkach wynosiła średnio 17,6 mg/100 g suchej masy napromieniowanych grzybów. Podanie 50 mg naświetlonych owocników *A.bisporus*/kg masy ciała na dobę, skutecznie podniosło stężenie 25-OH-witaminy D<sub>2</sub> w surowicy krwi do 3,13 nmol/L. Natomiast naukowcy z Kalifornii prowadzili badania nad możliwością wzbogacenia tego gatunku w witaminę D<sub>2</sub> i dokonali tego poprzez naświetlanie pieczarki promieniowaniem UV-B. Stosując różne dawki (0; 0,5; 1,0 i 1,5 J/cm<sup>2</sup>), intensywność (1,0; 0,75 i 0,5 mW/cm<sup>2</sup>) oraz czas naświetlania wykazali oni bardzo dużą szybkość tworzenia witaminy D<sub>2</sub>. Ich badania dostarczyły informacji, że do wytworzenia dostatecznie dużej ilości ergokalciferolu wystarczy wysoka intensywność promieniowania oraz krótki czas naświetlania. Ponadto witamina D<sub>2</sub> powstała w ten sposób bardzo powoli ulega degradacji, co jest ważne w trakcie przechowywania zebranych owocników.

Sprzęt do naświetlania promieniowaniem UV jest tanim, a zarazem innowacyjnym rozwiązaniem, aby znacząco zwiększyć zawartość witaminy D<sub>2</sub> w grzybach. Zatem dla poprawy zdrowia konsumentów praktyczna wydaje się produkcja pieczarek wzbogaconych o ergokalciferol, uzyskaną poprzez krótkotrwałą ich ekspozycję na promieniowanie UV.

Borowik szlachetny (*Boletus edulis* Bull.) jest gatunkiem powszechnie występującym nie tylko w lasach świerkowych, liściastych i mieszanych

w Polsce, ale w Europie. Analizy chemiczne wykazały, że w owocniku występuje ok. 200 mg witaminy D<sub>2</sub> na 100 g suchej masy. Owocniki *B. edulis* zawierają ok. 500 mg ergosterolu/100 g suchej masy. Ponadto wyizolowano nadtlenek ergosterolu (30 mg/100 g) o szerokim spektrum aktywności biologicznej (w tym aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwzapalnej), a także wykazuje toksyczność wobec różnych linii komórek nowotworowych. Innymi mikosterolami wyizolowanymi z borowika są trzy, ściśle powiązane z ergosterolem: ergosta-7-enol (16,4 mg/100 g), ergosta-5,7-dienol (12,5 mg/100 g) i ergosta-7,22-dienol (11,2 mg/100 g). Związki te charakteryzują się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi i przeciwnowotworowymi. Stosunkowo wysoka zawartość ergosterolu w owocniku, jest świetnym źródłem ergokalciferolu dla wegetarian i wegan, czyli osób, które nie przyjmują go z produktów pochodzenia zwierzęcego.

Twardziak jadalny (*Lentinula edodes*) występujący także pod nazwami Twardziak uprawny i Shiitake występuje na terenach Azji Wschodniej, w Chinach, Japonii, na Półwyspie Indochińskim. W Chinach i Japonii jest grzybem uprawianym w szklarniach i na wolnym powietrzu. W Europie podjęto próby uprawy w Eberswalde w Niemczech jeszcze przed II wojną światową. Współcześnie stosowany jest do leczenia chorób cywilizacyjnych. Zawartość ergosterolu w Shiitake wynosi średnio 85 mg/100 g (Tabela 1).

Ponadto występują trzy inne mikosterole: ergosta-7,22-dienol, ergosta-5,7-dienol oraz ergosta-7-enol. Nienasylenie pierścienia B przy węglu C5 i C7 ergosta-5,7-dienolu jest analogiczne do ergosterolu i 7-dehydrocholesterolu, z których powstają witaminy D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> w wyniku ekspozycji na promieniowanie UV. W związku z tym ergosta-5,7-dienol jest podatny na konwersję do



22,23-dihydroergokalciferolu (vitamina D<sub>4</sub>) po-  
prez ten sam mekanizmon.

### Resumo

Grupo de naturaj steroloj izolitaj de fungoj estas mikosteroloj, el kiuj precipe plej interesaj estas ergosterolo (5,7,22-ergostatrien-3 $\beta$ -ol) kaj ĝia peroksido, kiuj estas plej parte enhavaĵoj en la korpoj de la reprezentantoj de la Basidiomycota taksono. Fungosteroloj estas sintezitaj en simila maniero, sed la sekvenco de kemia reakcio, kio estas metabolo de skvaleno, kaj la stereokemio de la ĉefaj produktoj estas malsamaj. Simile kiel kun multaj derivaĵoj de isopreno, la baza unuo uzata por sintezado de steroloj estas la pirofosfato de isopentenilo (IPP), kiu siavice estas sintezita de acetyl-CoA per transformado de mavelonika acido. Ĉelaj membranoj de ĉiuj eŭkariotaj organismoj enhavas mikosterolojn. Mikosteroloj estas konsideritaj kiel utilaj sanprotektaj kemiaj kombinaĵoj. Oni pruvis ĝian kapablecon por malaltigi koncentritecon de kolesterolo en serumo, krome ili povas ankaŭ esti efika en la preventado de iuj tipoj de kancero. Ergosterolo, kion fungoj ofte enhavas, simile kiel produktoj de ĝia peroksidado ankaŭ havas multajn utilajn efikojn. Ĝi povas havi porsanan efikon kaj plibonigan influon je fiziologiaj funkcioj de la homa organismo, nome malfortigon de doloro kaŭzita de inflama stato, reduktado de sangocirkuladaj malsanoj, inhibicio de la enzimo ciklooksigenazo (COX) kaj malaltigo de kolesterolo. Ĝi ankaŭ havas antioksidantan potencon kaj haltigas kreskadon de patogenaj fungoj kaj bakterioj.

### Piśmiennictwo

1. Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R.; *Food Anal Methods*. 2014, 7, 217–223.
2. Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P.; *Wiad. Lek.* 2005, 58, 453–455.
3. Kahlos, K., Kangas, L., Hiltunen, R.; 1989, 55: 389–390.
4. Kim, S.W., Park, S.S., Min, T.J., Yu, K.H.; *Bull. Korean Chem. Soc.* 1999, 20, 819–823.
5. Krzyczkowski, W., Malinowska, E., Suchocki, P., Kleps, J., Olejnik M., Herold F.; *Food Chem.* 2009, 113, 351–355.
6. Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W.D.; *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005, 2, 285–299.
7. Loto, I., Gutiérrez, M.S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V., Alcaino, J.; *BMC Microbiol.* 2012, 12, 235–240.
8. Mattila, P., Lampi, A.M., Ronkainen, R., Toivo, J., Piironen, V.; *Food Chem.* 2002, 76, 293–298.
9. Mentel, R., Meinsen, D., Pilgrim, H., Herrmann, B., Lindequist, U.; *Pharmazie.* 1994, 49, 859–860.
10. Phillips, K.M., Ruggio, D.M., Horst, R.L., Minor, B., Simon, R.R., Feeney, M.J., Byrdwell, W.C., Haytowitz, D.B.; *J Agric Food Chem.* 2011, 59, 7841–7853.
11. Shao, S., Hernandez, M., Kramer, J.K.G., Rinker, D.L., Tsao, R.T J.; *Agric Food Chem.* 2010, 58, 11616–11625.
12. Słomiński, A., Semak, I., Zjawiony, J., Wortsman, J., Gandy, M.N., Li, J., Zbytek, B., Li, W., Tuckey, R.C.; *Chem Biol.* 2005, 12, 931–939.
13. Takei, T., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., Kobori, M.; *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005, 69, 212–215.
14. Tang, Y., Li M.H., Tang, Y.J.; *Food Chem.* 2012, 13, 1207–1213.
15. Teichmann, A., Dutta, P.C., Staffas, A., Jägerstad, M.; *LWT-Food Sci Technol* 2007, 40, 815–822.
16. Weete, J.D., Abril, M., Blackwell, M.; *PLoS One.* 2010, 5, e10899.
17. Weete, J.D.: Structure and function of sterols in fungi. *Adv Lipid.* 1989, 23, 484–491.
18. Yaoita, Y., Yoshihara, Y., Kakuda, R., Machida, K., Kikuchi, M.; *Chem Pharm Bull.* 2002, 50, 551–553.
19. Yokokawa, H.; *Phytochem.* 1980, 19, 2615–2618.
20. Yuan, J.P., Kuang, H.C., Wang, J.H., Liu, X.; *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008, 80, 459–465.
21. Zhong, J.J., Xiao, J.H.; *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009, 113, 79–150.