

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**Katedra farmaceutické botaniky a ekologie**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Biologická aktivita makromycet I.**  
**Biological activity of macromycetes I.**

Vedoucí diplomové práce: Ing. Kateřina Macáková, PhD.

Hradec Králové 2012

Juraj Vyletelka

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2012

Podpis

Rád bych poděkoval Ing. Kateřině Macákové, PhD. za odborné vedení této diplomové práce. Její zkušenosti a rady mi pomohly při experimentálních měřeních v laboratoři a rovněž při psaní práce. Děkuji stejně tak i studentům postgraduálního studia a ostatním zaměstnancům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za jejich podporu a pomoc a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Velice si vážím i pomoci autorů fotografií hub, díky kterým vznikla obrazová dokumentace sledovaných taxonů.

Tato práce vznikla v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2012 SVV265002 a za podpory grantu FRVŠ 664/2011.

## ***OBSAH***

1. ÚVOD .....	4
2. CÍL PRÁCE.....	6
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
3.1. CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH DRUHŮ HUB .....	7
3.1.1. Oddělení Ascomycota .....	7
3.2.2. Oddělení Basidiomycota .....	7
3.2. CHEMICKÁ STAVBA HUB .....	16
3.2.1. Primární metabolity .....	16
3.2.2. Sekundární metabolity.....	18
3.3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA HUB.....	18
3.4. ALZHEIMEROVA NEMOC.....	20
3.4.1. Charakteristika onemocnění .....	20
3.4.2. Klinické příznaky .....	21
3.4.3. Možnosti léčby .....	21
3.4.4. Role oxidačního stresu u Alzheimerovy nemoci .....	22
3.5. VOLNÉ RADIKÁLY A ANTIOXIDANTY .....	23
3.5.1. Co to jsou volné radikály?.....	23
3.5.2. Vznik volných radikálů .....	24
3.5.3. Reaktivní formy kyslíku .....	25
3.5.4. Reaktivní formy dusíku .....	27
3.5.5. Antioxidační systém organismu .....	28
3.5.5.1. Endogenní enzymatické antioxidanty.....	28
3.5.5.2. Endogenní neenzymatické antioxidanty.....	29
3.5.5.3. Nízkomolekulární antioxidanty .....	29
3.5.5.4. Exogenní antioxidanty.....	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
4.1. POTŘEBY .....	34
4.1.1. Chemikálie.....	34
4.1.2. Rozpouštědla .....	34
4.1.3. Testované druhy hub .....	35
4.2. OBECNÉ POSTUPY .....	36

4.2.1. Odpařování extraktů .....	36
4.2.2. Sušení extraktů .....	36
4.2.3. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) .....	36
4.3. PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ.....	37
4.4. HODNOCENÍ EXTRAKTŮ POMOCÍ TLC.....	37
4.5. HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY .....	37
4.5.1. Hodnocení inhibice acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy .....	37
4.5.2. Metoda vychytávání DPPH radikálu s využitím SIA .....	39
4.5.3. Metoda vychytávání ABTS <sup>+</sup> radikálu s využitím SIA .....	39
4.5.4. Stanovení celkového množství fenolických látek .....	40
5. VÝSLEDKY .....	41
5.1. VÝTĚŽKY EXTRAKCE.....	41
5.2. HODNOCENÍ PŘÍTOMNOSTI ALKALOIDŮ .....	41
5.3. HODNOCENÍ INHIBICE ACETYL- A BUTYRYLCHOLINESTRÁZY .....	42
5.4 HODNOCENÍ ANTIRADIKÁLOVÉ AKTIVITY .....	43
5.5. STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ FENOLICKÝCH LÁTEK .....	44
6. DISKUZE .....	45
7. ZÁVĚR.....	47
8. ABSTRAKT .....	48
9. ABSTRACT .....	49
10. LITERATURA.....	50

## ***SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK***

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
AD	Alzheimerova nemoc
ATP	Adenosin-trifosfát
APP	Amyloidový prekurzorový protein
Ach	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
$\beta$ A	Beta amyloid
BuChE	Butyrylcholinesteráza
cAMP	Cyklický adenosin-monofosfát
cGMP	Cyklický guanosin-monofostát
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyllový radikál
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
FC činidlo	Folin-Ciocalteuovo činidlo
GPx	Glutathionperoxidáza
GSH	Glutathion (redukovaná forma)
GSSG	Glutathion disulfid (oxidovaná forma)
KAT	Kataláza
KM	Kyselina močová
KoQ	Koenzym Q
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
RFD	Reaktivní formy dusíku
RFK	Reaktivní formy kyslíku
RFKD	Reaktivní formy kyslíku a dusíku
SIA	Sekvenční injekční analýza
SOD	Superoxiddismutáza
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TLC	Tenkovrstvá chromatografie

## 1. ÚVOD

Říše hub (Fungi) představuje jednu ze tří hlavních větví vývoje mnohobuněčných organizmů. Houby jsou eukaryontní, heterotrofní, rostou typicky jako větvená vlákna zvané hyfy, tvoří výtrusy (spory) a jejich buněčná stěna obsahuje chitin a glukany (Deacon, 2005).

V této práci se držíme definice Changa a Milese (1992), která popisuje houby (anglicky „mushrooms“) jako makromycety s charakteristickými plodnicemi, které mohou být buď podzemní nebo nadzemní a jsou dostatečně velké na to, aby byly viditelné pouhým okem a daly se ručně sbírat. Z taxonomického hlediska sem tedy patří hlavně oddělení Basidiomycota a někteří zástupci oddělení Ascomycota. Známych je nejméně 14 000, ale některé odhady předpokládají existenci více než 100 000 druhů (Lindequist et al., 2005).

Houby jsou organizmy produkující širokou škálu sekundárních metabolitů. V mnoha případech je nám jejich význam nejasný. Avšak zájem o tyto látky stoupá, protože mnoho z nich se uplatňuje v průmyslu, zemědělství a lékařství. Některé jsou škodlivé (např. mykotoxiny), jiné naopak prospěšné (antibakteriální látky)(Calvo et al., 2002).

První záznamy o použití hub pro své léčebné vlastnosti pocházejí ze starověké Indie a Číny a jejich věk se odhaduje na stovky až tisíce let před naším letopočtem. Dnes je dokázáno, že řada houbových metabolitů vykazuje antivirotické, antibiotické, protizánětlivé, hypoglykemické, hypocholesterolemické a hypotenzivní účinky. Podrobně se studují i jejich protinádorové a imunomodulační vlastnosti (Borchers et al., 1999). V neposlední řadě je slibný výzkum antioxidantních látek hub a látek s účinkem na centrální nervový systém (Lindequist et al., 2005).

S ohledem na poslední dva uvedené fakty vědci zaměřují svůj výzkum na onemocnění jejichž etiologie zahrnuje i oxidativní stres vyvolaný volnými radikály (reaktivními formami kyslíku a dusíku), které jsou v organismu normálně nepostradatelné a plní pozitivní funkce. Na druhou stranu, jejich nadprodukce může vést k poškození buněčných struktur včetně lipidů a membrán, proteinů a DNA. Proto se počítá s podílem volných radikálů na vzniku mnoha onemocnění např. plic, kardiovaskulárního systému, onkologických a neurodegenerativních onemocnění atd. (Kimáková et al., 2011; Valko a Mazúr, 2008).

Mnohokrát se upřednostňují přírodní antioxidanty před syntetickými, protože i přes jejich často nižší aktivitu se považují za všeobecně bezpečné (Pokorný, 2007).

Nerovnováha v oxidativním metabolismu se dává do souvislosti i s Alzheimerovou nemocí, kdy dochází k narušení tvorby neurotransmiterů, zejména pak acetylcholinu. Na farmaceutickém trhu existují léčiva jakými jsou donezepil, rivastigmin a galanthamin působící anticholinesterázovým mechanismem. Současný výzkum hledá tzv. duální inhibitory účinkující

proti lidské acetylcholinesteráze (AChE) i butyrylcholinesteráze (BuChE), popřípadě dalším strukturám zapojených do patofyziologie Alzheimerovy nemoci. I přes značný pokrok jejich účinnost není uspokojivá a hledají se další možnosti jako například duálně působící (anticholinesterázově a antioxidačně) hybridy tacrinu a melatoninu (Patyar et al., 2011; Žigová, 2011)

Přírodní rostlinné extrakty působící inhibičně na cholinesterázy obsahují značné množství alkaloidů, což podporuje fakt, že inhibitory AChE mají ve své molekule většinou dusík. Proto jsme se v této práci zaměřili i na zjištění obsahu alkaloidů, které jsou v některých houbách popisovány (Filho et al., 2006; Ribeiro et al., 2008).

Řada studií představuje makromycety jako zajímavý zdroj látek s biologickou aktivitou. Patří sem fenolické látky s dokumentovaným antioxidačním působením, dále terpenoidy a polysacharidy s protirakovinnými účinky a již vzpomínané alkaloidy (Cheung et al., 2003; Greve et al., 2010; Ribeiro et al., 2008; Zhang et al., 2007).



## ***2. CÍL PRÁCE***

Touto prací pokračujeme v měření biologických aktivit makromycet, které na katedře farmaceutické botaniky a ekologie dlouhodobě probíhá.

Cílem této práce je příprava lyofilizovaných extraktů 25 různých druhů makromycet, následná tenkovrstvá chromatografie těchto vzorků pro zjištění obsahu alkaloidů s indikací Dragendorffovým činidlem.

V neposlední řadě chceme stanovit celkové množství fenolických látek ve vzorcích Folin-Ciocolteuovou metodou.

Dalším úkolem je stanovení antioxidační aktivity extraktů metodou sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu a ABTS<sup>+</sup> radikálu.

Posledním z cílů je zjistit inhibiční aktivity extraktů vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze Ellmanovou spektrofotometrickou metodou.

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1. CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH DRUHŮ HUB

##### 3.1.1. Oddělení Ascomycota

###### 3.1.1.1. Leotiales

###### *Leotia lubrica* (Scop.) Pers. – Patyčka rosolovitá (Leotiaceae) (Obr. 1)



Obrázek 1.: *Leotia lubrica* (Scop.) Pers.  
(© Renée Lebeuf, 2008)

Je to 2-7 cm vysoká houba s voskovitě rosolovitými plodnicemi. Klobouk šířky 1-2 cm, v mládí polokulovitý, později nepravidelně laločnatý, na povrchu slizký, žlutozelený až žlutoolivový. Třeň je mírně rozšířený, dutý, slizký na povrchu, okrově žlutý. Roste skupinově ve vlhké holé lesní půdě (Antonín et al., 2006).

##### 3.2.2. Oddělení Basidiomycota

###### 3.2.2.1 Agaricales

###### *Agaricus lanipes* (Møller & J. Schäff) Sing. – Žampion vlnatý (Agaricaceae) (Obr. 2)



Obrázek 2.: *Agaricus lanipes* (Møller & J. Schäff) Sing. (© Thierry Duchemin, 1992 web mycodb)

Klobouk široký 6-14 cm, s plochým temenem a zbytky plachetky na okraji, s hnědými až červenavě hnědými vláknitými šupinami. Lupeny v mládí narůžovělé, později masově načervenalé, potom hnědé až černé. Třeň válcovitý, na bázi většinou hlízovitě ztloustlý, na vrcholu hladký, pod prstenem vločkatý, bělavý až nahnědlý. Prsten tlustoblanný, zvrchu bělavý a rýhovaný, ze spodní strany hnědě vločkatý. Dužina tvrdá, pevná, bělavá až šedohnědá. Roste v listnatých lesích a parcích. Jedlá houba (Hagara, 1998).

***Agaricus macrosporus* (Møller & J. Schäff.) Pilát – Žampion velkovýtrusý (Agaricaceae)**  
(Obr. 3)

Klobouk šířky 5-25 cm, dlouho uzavřený, tlustomasý, na temeni lysý, jinak vločkatý,



krémový, na otláčených místech kožově žloutnoucí. Lupeny husté, krémové, později šedočervenavé, nakonec černohnědé. Třeň v mládí široký jako klobouk a nápadně šupinatý, bělavý, později až světle okrový. Dužina tlustá, pevná, voní anýzově v mládí, ve stáří nepříjemně. Roste na loukách i v jehličnatých lesích. V mládí chutný, staré plodnice se nekonzumují (Hagara, 1998).

Obrázek 3.: *Agaricus macrosporus*  
(Møller & Schäff.) (© Rob Foster, 2009)

***Cortinarius cotoneus* Fr. – Pavučinec vlnatý (Cortinariaceae)** (Obr. 4)



Klobouk široký 4-12 cm, zvoncovitý, poté sklenutý, masitý a rozložený. Jemně šupinkatá, plstnatá pokožka, olivově zelená, stářím olivově nahnědlá. Lupeny tlusté, oddálené, olivově hnědé barvy. Třeň přímý, kyjovitý, nažloutlý, u lupenů často s olivovými pásy. Dužina voní ředkvičkou, sladce nahořklé chuti. Roste v listnatých lesích. Slabě jedovatý (Kubička, 1980).

Obrázek 4.: *Cortinarius cotoneus* Fr.  
(© Manuel Martínez Rey, 2011)

***Cortinarius praestans* Cordier – Pavučinec náramkovcový (Cortinariaceae)** (Obr. 5)

Patří mezi největší evropské pavučince. Klobouk má v průměru 10-20 cm, v mládí je malý,



závojem spojený s třeněm. Později je klenutý, kaštanově hnědý s fialovým odstínem. Málo slizký. Pokožka je vláknitá, pokrytá drobnými vločkami. Lupeny bělavé, u třeně vykrojené. Kyjovitý třeň obaluje plachetka bělavé až fialové barvy. Dužina je bílá, později nažloutlá, nemění se, je nevýrazné chuti a téměř bez zápachu. Jedlá a chutná houba (Dermek, 1976; Svrček a Vančura, 1987).

Obrázek 5.: *Cortinarius praestans* Cordier  
(© Stefano Vianello, 2010)

***Galerina marginata* (Batsch) Kühner – Čepičatka okrajová (Strophariaceae) (Obr. 6)**



Obrázek 6.: *Galerina marginata* (Batsch) Kühner  
(© Lasse Christensen, 2010)

Roste na podzim na odumřelé dřevní hmotě jehličnanů. Klobouk je 15-50 mm široký, klenutý, za vlhka mírně naslizlý, žlutohnědé barvy. Lupeny husté, skořicově hnědé. Třeň 2-6 cm dlouhý, zbarven podobně jako klobouk, nahoře s blanitým opadavým prstencem. Výtrusný prach rezavě hnědý. Jedná se o jedovatou houbu obsahující  $\alpha$ -amanitin (Svrček a Vančura, 1987; Klán, 1989).

***Hygrophorus capreolarius* Kalchbr. – Šťavnatka vínová (Hygrophoraceae) (Obr. 7)**



Obrázek 7.: *Hygrophorus capreolarius*  
Kalchbr. (© Renée Lebeuf, 2007)

Svrček a Vančura (1987) uvádí, že do čeledi Hygrophoraceae patří různě zbarvené houby, jejichž společným znakem jsou velmi tlusté a řídké, sbíhavé nebo na třeň přirostlé lupeny. Povrch plodnic často pokrytý slizem.

Barva plodnice této šťavnatky je narůžovělá až vínově červená.

***Hygrophorus chrysodon* (Batsch) Fr. – Šťavnatka žlutolupenná (Hygrophoraceae) (Obr. 8)**



Obrázek 8.: *Hygrophorus chrysodon* (Batsch) Fr.  
(© Renée Lebeuf, 2010)

Velikost klobouku 3-7 cm, na okraji podvinutý a hustě pokrytý žlutými vločkami, pokožka víceméně slizká, v mládí bělavá, brzy zlatožlutá. Lupeny nepřilíživé, husté, bělavé, u velmi malých plodnic se žlutě vločkatým ostřím. Třeň válcovitý, v mládí plný, později vycpaný, v horní třetině pokrytý žlutými vločkami a často drobnými kapičkami. Dužina je poměrně masitá, šťavnatá, bělavá, pod pokožkou nažloutlá. Roste především v bučinách. Jedlá (Hagara, 1998).

***Limacella guttata* (Pers.) Konr. & Maubl. – Slizobedla slzivá (Amanitaceae) (Obr. 9)**

Houba dosti podobná muchomůrkám. Klobouk 50-120 mm, kožově žlutý, okrový nebo



červenohnědý, nejdřív polokulovitý, později zvonkovitý až klenutý, pak plochý, za vlhka šupinatý, na okraji hladký a nerýhovaný. Lupeny husté, bílé a u třeně volné. Třeň válcovitý, na bázi ztlustělý, bělavý, v horní třetině s bílým blanitým prstenem, na kterém bývají žlutozelenavé kapénky, za sucha mizící. Dužina bílá, s mírnou chutí a moučnou vůní. Jedlá, zřídka houba (Dermek, 1976).

Obrázek 9.: *Limacella Guttata* (Pers.) Konr. & Maubl. (© Erminio Ferrari, 2008)

***Pholiota aurivella* (Batsch) P. Kummer – Šupinovka zlatozávojná (Strophariaceae) (Obr. 10)**



Klobouk má velký 4-12 cm, v mládí polokulovitý, s podvinutým okrajem, slizký a mazlavý za deště, zlatě žluté barvy s řídkými šupinami. Lupeny vysoké a husté, narezavělé, u třeně zoubkem vykrojené. Třeň dorůstá do 12 cm, plný, suchý, v mládí pokrytý šupinkami. Dužina nažloutlá s nenápadnou vůní a natrpklou chutí. Roste na dřevě listnáčů (Dermek, 1976; Hagara, 1998).

Obrázek 10.: *Pholiota aurivella* (Batsch) P. Kummer (© Jason Sturner, 2008)

***Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. – Hlíva plicní (Pleurotaceae) (Obr. 11)**

Podobně jako ostatní hlívy, klobouk má 5-12 cm, lopatkovitý nebo lasturovitý, v mládí nízce



sklenutý a na okraji podvinutý. Lupeny pružné, husté, daleko sbíhající na třeň, bélavé až krémové. Třeň excentrický, často až boční, bílý, často rýhovaný. Dužina mladých plodnic pružná a šťavnatá, ve stáří tuhá a sušší, bílá, nasládlé chuti. Roste v trsech na živém i odumřelém dřevu různých listnáčů, zejména buků. Velmi chutná houba v mládí, avšak starší houževnaté plodnice jsou hůře stravitelné (Dermek, 1976).

Obrázek 11.: *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (© Otto Loesel, 2008) substrát: *Gymnocladus*

***Tricholoma lascivum* (Fr.) Gillet – Čirůvka smrdutá (Tricholomataceae) (Obr. 12)**

Je dosti podobná čirůvce bílé, která má klobouk široký 50-100 mm, kuželovitě klenutý,



hedvábně lesklý, bílý až krémový příp. žlutohnědý. Lupeny připojené zoubkem. Třeň je válcovitý, zakřivený, nahoře vločkatý, níže vláknitý, bělavý. Č. smrdutá se od č. bílé liší tedy hlavně pachem, který je za mládí stejně sladkastý nebo moučný, ale později dužina starých plodnic nabyde protivný svítiplynový zápach (Antonín et al., 2006).

Obrázek 12.: *Tricholoma lascivum* (Fr.) Gillet  
(© Christophe Quintin, 2010)

***Tricholoma portentosum* (Fr.) Quél. – Čirůvka havelka (Tricholomataceae) (Obr. 13)**

Je to šedá, masitá houba s kloboukem 3-10 cm širokým, zpočátku kuželovitým a



s podvinutým okrajem, později nízce sklenutým a zvlněným, zpravidla s hrbolkem, za vlhka trochu slizkým, barvou hnědošedý až černošedý, často s olivovým nebo fialovým odstínem. Třeň a lupeny bílé s citronově žlutým nádechem. Dužina bělavá, s moučnou vůní a s chutí lískových oříšků, ve třeni roztrhaná. Roste v jehličnatých lesích na písčité půdě. Je to jedlá a lahodná houba (Dermek, 1976; Hagara, 1998; Svrček a Vančura, 1987).

Obrázek 13.: *Tricholoma portentosum* (Fr.) Quél.  
(© Ina Dijkstra, 2011)

**3.2.2.2. Boletales**

***Aureoboletus gentilis* (Quél.) Pouzar – Hřib pružný (Boletaceae) (Obr. 14)**



Klobouk šířky 2-7 cm, slizký za vlhka, za sucha lesklý, šedorůžový, masově červenavý, karmínový. Rourky pružné, zářivě zlatožluté, ve stáří s olivovým nádechem. Třeň je válcovitý, trochu lepkavý, v horní třetině síťovaný nebo rýhovaný sbíhajícími rourkami. Pokožka na vrcholu zlatožlutá. Roste v teplých lesích, pod duby a buky, na vápnatých půdách (Antonín et al., 2006).

Obrázek 14.: *Aureoboletus gentilis* (Quél.) Pouzar  
(© Jindřich Poříz, 2011 web BioLib)

### ***Boletus pinophilus* Pilát & Dermek – Hřib borový (Boletaceae) (Obr. 15)**

Velice oblíbená jedlá houba. Klobouk 6-25 cm, v mládí polokulovitý, ve stáří rozprostřený,



masitý, vrásčitý, tmavě červenohnědý. Rourky krémové, ve stáří olivovožluté. Třeň je vejcovitý, robustní, většinou kyjovitý, krémově načervenalý, pod kloboukem dlouho bělavý. Dužina bílá, nemění barvu na řezu, příjemné houbové vůně a chuti. Výtrusy olivovohnědé. Roste hlavně v borových lesích, preferuje písčitou půdu (Dermek, 1976; Hagara, 1998).

Obrázek 15.: *Boletus pinophilus* Pilát et Dermek  
(© Juraj Komár, 2007)

### ***Pseudoboletus parasiticus* (Bull.) Šutara – Hřib cizopasný (Boletaceae) (Obr. 16)**

Jde o cizopasnou houbu parazitující na plodnicích pestřice obecného - *Scleroderma citrinum*



Pers. Má klobouk široký 25–55 mm, sametový, žlutohnědý až olivovozelený. Rourky jsou hnědožluté až olivovohnědé, póry jsou dlouhé až 1 mm. Třeň válcovitý, dlouhý 26-65 mm, dolů zúžený, žlutý, jemně vločkatý a vláknitý. Dužina je bledožlutá, mírné chuti a nevýrazné vůně. Vyskytuje se zřídka v létě a na podzim na rašelinových půdách. Z pestřice obecného vyrůstá zpravidla 3-8 plodnic. Je jedlý, ale zřídka a chráněný (Antonín, 2006; Dermek, 1976; Klán 1989).

Obrázek 16.: *Pseudoboletus parasiticus* (Bull.) Šutara  
(© Renée Lebeuf, 2011)

### **3.2.2.3. Geastrales**

#### ***Geastrum rufescens* Pers. – Hvězdovka červenavá (Geastraceae) (Obr. 17)**

V Evropě roste asi 30 druhů hvězdovek a všechny patří mezi skvosty naší přírody. Plodnice je cibulovitá. Má narůžovělou zákrovku, kterou se liší od ostatních podobných druhů.

Vnější zákrovka puká na 5-9 končistých a nestejných cípů, které jsou nejdřív velice tlusté a hnědavé, později vysychají, ztenčují se a tmavnou na hnědočerveno. Vnitřní zákrovka kulovitá, světle okrová až tabákově hnědá, umístěná na krátkém krčku velkém nanejvýš 5 mm. Rostou v jehličnatých lesích, nezřídka v listnatých, ale i na místech ovlivněných hospodářskou činností. Nejedlá (Svrček a Vančura 1987; Antonín et al. 2006).



Obrázek 17.: *Geastrum rufescens* Pers.  
(© Juraj Komár, 2009)

### 3.2.2.4. Gomphales

#### *Ramaria apiculata* (Fr.) Donk – Kuřátka nazelenalá (Gomphaceae) (Obr. 18)



Obrázek 18.: *Ramaria apiculata* (Fr.) Donk  
(© Ron Wolf, 2011)

Plodnice je značně rozvětvená, 4-10 cm vysoká. Větvičky jsou nahuštěny na sebe, nažloutlé, žlutohnědé až tmavě hnědé. Rostoucí vrcholy nazelenalé. Jsou zakončeny ozubenými špičkami. Dužina houževnatá, pevná, bílá, na řezu tmavnoucí. Roste v seskupeních na dřevě nebo v půdě sdružená s rozkládajícími se částmi jehličnanů (Nasim et al., 2008).

### 3.2.2.5 Phallales

#### *Mutinus caninus* (Huds.) Fr. – Psivka obecná (Phallaceae) (Obr. 19)



Obrázek 19.: *Mutinus caninus* (Huds.) Fr.  
(© Tamara Horová, 2010 web BioLib)

V prvním vývinovém stádiu je tato houba vejčitá, vysoká 2-4 cm, široká 1,5 – 3 cm. Bílý blanitý obal má na bázi provázkovité mycélium. V čase zralosti se obal trhá a vyrůstá z něj bílý nebo červenooranžový nosič s nasazeným kuželovitým kloboukem, povlečený olivovozeleným slizkým obalem (glébou). Po vymizení gléby je klobouk oranžový, jamkatý. Roste v létě ve stinných lesích, často na odumřelém dřevě. Nejedlá (Dermek, 1976).



### 3.2.2.6. Polyporales

#### *Sparassis nemecii* Pilát & Veselý – Kotrč Němcův (Sparassidaceae) (Obr. 20)

Houba velice podobná kotrči kadeřavému - *Sparassis crispa* (Wulf.) Fr rostoucímu na



borovici. Na rozdíl od něj je kotrč Němcův vázán na jedli (*Abies alba*). Plodnice je mohutnější, skládá se z velkého množství srostlých větviček, na koncích lupenovitě zploštělých a zvlněných, krémové barvy, ne tak kadeřavých. Dosti tuhá dužina voskovitého vzhledu. Jedlá houba (Antonín et al., 2006).

Obrázek 20.: *Sparassis nemecii* Pilát & Veselý  
(© Stanislav Krejčík, 2005 web BioLib)

### 3.2.2.7. Russulales

#### *Lactarius subdulcis* (Pers.) Gray – Ryzec nasládlý (Russulaceae) (Obr. 21)

Pro ryzce je typický obsah mléčnic, ze kterých po nařiznutí vytéká mléku podobná látka. Velikost klobouku u r. nasládlého je 2-7 cm, většinou s hrbolem uprostřed, matný, suchý,



červenohnědý, později kožově nahnědlý. Lupeny jsou husté, sbíhající na třeň, světle krémové až okrové. Třeň bývá dlouhý 30-75 mm a tlustý 3-10 mm, ve stáří dutý, s rezavě oranžovým odstínem. Dužina bělavá až okrově narezlá, popisován je pach po plošticích. Výtrusný prach krémově nažloutlý. Roste v listnatých lesích pod duby a buky. Nejedlý pro nepříjemnou chuť a pach (Dermek, 1976; Hagara, 1998, Klán 1989).

Obrázek 21.: *Lactarius subdulcis* (Pers.) Gray  
(© Václav Hrdina, 2010 web BioLib)

***Russula amara* Kučera – Holubinka hořká (Russulaceae) (Obr. 22)**



Obrázek 22.: *Russula amara* Kučera  
(© Ina Dijstelberge, 2011)

Klobouk široký 4-7 cm, tmavě fialový nebo lilákově růžový, šeříkový, mírně prohloubený, na středu s malým hrbolkem. Pokožka lysá, je výrazně hořká, stejně tak pokožka třeně. Roste v mykorrhize s borovicemi (Antonín et al, 2006; Veselý et al, 1972).

***Russula fragilis* Fr. – Holubinka křehká (Russulaceae) (Obr. 23)**



Obrázek 23.: *Russula fragilis* Fr.  
(© Renée Lebeuf, 2008)

Má klobouk široký 2-7 cm, sploštělý, uprostřed prohlouben, fialově purpurový, fialově červený, uprostřed někdy bledší, někdy šedozelený, jindy tmavší, fialově černý. Na okraji bledne. Lupeny bílé, jemně pilkovité. Třeň je válcovitý, naspodu rozšířený, bílý, na poraněných místech žlutne. Dužina bílá, s kyslastou vůní a velmi pálivou chutí. Roste hojně v lesích, na kyselých půdách (Antonín et al., 2005).

***Russula undulata* Velen. – Holubinka zprohýbaná (Russulaceae) (Obr. 24)**



Obrázek 24.: *Russula undulata* Velen.  
(© Pieter Gordijn, 2007)

Klobouk 5-10(-15) cm, polokulovitý v mládí, v dospělosti zploštělý, nebo prohloubený, nápadně zvlněný, na okraji až laločnatě vykrajovaný, tvrdý, pevný. Pokožka hladká, sklovitě lesklá, červenofialová až černofialová. Lupeny jsou husté, velmi nízké, křehké, bělavé až světle krémové. Třeň válcovitý nebo úzce kyjovitý, bělavý nebo šedavý bez červených nebo fialových tónů. Dužina tvrdá, suchá, bělavá, za vlhka naředlá, pod pokožkou fialově nadechlá. Roste zejména v doubravách a borech. Nejedlá (Hagara, 1998).

***Russula virescens* (Shaeff.) Fr. – Holubinka nazelenalá (Russulaceae) (Obr. 25)**

Holubinka nazelenalá má klobouk velký 5-12 cm, polokulovitý v mládí, později sklenutý, na středu až vtlačený a pevný, s neslupitelnou, políčkovitě rozpraskanou pokožkou černoolivové nebo měděnkově zelené barvy s rezavě hnědými skvrnami. Lupeny široké 5-11 mm, husté, bělavé až světle krémové. Třeň válcovitý, vysoký 6-12 cm, v mládí velice pevný a plný, později komůrkově dutý a drobný. Dužina bílá, hnědnoucí, nenápadné oříškové chuti. Roste v doubravách a březinách. Jedlá houba (Dermek, 1976; Hagara, 1998; Klán 1989).



Obrázek 25.: *Russula virescens* (Shaeff.) Fr.  
(© Erminio Ferrari, 2008)

### 3.2. CHEMICKÁ STAVBA HUB

Houby jsou heterotrofní organizmy, tudíž hmotu pro stavbu svých těl získávají z látek rostlinného nebo živočišného původu a to buď saprofyticky (rozkládají odumřelé organizmy) nebo paraziticky, rozšířená je i symbióza hub s rostlinami (Klán, 1989).

Charakteristickou složkou buněčných stěn vláknitých hub je chitin. Je přítomen v podhoubí i plodnicích a považuje se za příčinu těžší stavitelnosti hub, i když na druhé straně podporuje peristaltiku střev. V buněčných stěnách jsou dále složeny cukry a bílkoviny (Semerdžieva a Veselský, 1986).

V plasmě houbových buněk najdeme vodu (70-95 %), bílkoviny, cukry, tuky, minerální látky a řadu látek, které řadíme mezi sekundární metabolity. Mohou jimi být isoprenoidy, alkaloidy, aromatické sloučeniny, organické kyseliny a další, které budou dále rozebrány. Důležitou roli hrají i enzymy, které umožňují katalýzu metabolických dějů houbových buněk. Některé houby, jak známo, obsahují toxické látky a látky s léčebným účinkem (Semerdžieva a Veselský, 1986).

#### 3.2.1. Primární metabolity

##### 3.2.1.1. Sacharidy

Tvoří 1-6 % hmotnosti hub. K nejdůležitějším patří chitin, chitosan, glukany, galaktany, polygalakturonová kyselina, mannany a vzácně celulóza. Zásobní látkou hub je glykogen a

trehalóza. Polysacharidy se vyskytují i ve vazbě s dalšími makromolekulami a tak tvoří glykoproteiny a glykolipidy. Slizové látky jsou rovněž tvořené cukry – polyuronidy a pentózany.

Chitin je tvořen řetězcí N-acetyl-D-glukosaminových jednotek vázaných  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 vazbami. Glukany jsou větvené polymery glukózy ( $\beta$ -1,3-glukanu,  $\beta$ -1,6-glukanu,  $\beta$ -1,4-glukanu) spojené glykosidickou vazbou. Glykogen je tvořen glukózovými jednotkami spojenými v polohách  $\alpha$ - $\rightarrow$ 4 a  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6. Biosyntéza je patrně shodná s živočišnou buňkou. Trehalóza je transporní disacharid složený z glukózových jednotek (Klán, 1998; Veselý et al., 1972).

### **3.2.1.2. Lipidy**

Tvoří 0,5-1,5 % váhy hub. Nejvíce se vyskytují ve sporách a myceliu. Většinou jde o triacylglyceroly vyskytující se ve formě kapiček (tuky) nebo krystalků (ergosterol). Mají úlohu rezervních látek. V buněčných membránách se také nacházejí fosfolipidy (Klán, 1989; Semerdžieva a Veselský, 1986).

### **3.2.1.3. Proteiny**

V houbách tvoří 0,3-3,5 % hmotnosti. Základem všech proteinů jsou aminokyseliny. Houby obsahují 20 základních aminokyselin tvořících se z dusíkatých a uhlíkatých komponent. Zajímavostí je, že většina hub tvoří aminokyselinu lysin z kyseliny  $\alpha$ -aminoadipové, zatímco plísně vaječné, bakterie a vyšší rostliny vycházejí z kyseliny asparagové. To dokazuje, že se houby časně oddělily od ostatních eukaryontních organismů (Klán, 1989; Semerdžieva a Veselský, 1986).

Strukturu proteinů v houbách mají enzymy, ale i nejprudší známé jedy jako např. amanitiny, faloidin a faloin (Semerdžieva a Veselský, 1986).

### **3.2.1.4. Nukleové kyseliny**

Tyto vysokomolekulární látky se u hub nacházejí ve stejné podobě jako u ostatních organismů. Každá kyselina se skládá z nukleotidů tvořených sacharidem (ribóza nebo deoxyribóza), dusíkatou bází - purinovou (adenin, guanin) nebo pyrimidinovou (cytosin, thymin, uracil) a kyselinou fosforečnou (Klán, 1989).

### 3.2.2. Sekundární metabolity

Vláknité houby produkují rozmanité sekundární metabolity – malé molekuly, které zdánlivě nepotřebují pro normální růst a rozvoj. Tyto metabolity mají obrovský význam v lidské společnosti. Některé jsou využívány pro svoje antibiotické a farmakologické působení, jiné se podílejí na patologických interakcích s živočichy a rostlinami. Ačkoliv byly identifikovány geny zapojené do tvorby sekundárních metabolitů, jejich role v houbovém organizmu zůstává záhadou. Hodně hub žije saprofytičky a tyto molekuly je patrně chrání před jinými organizmy vyskytujícími se na stejné ekologické nise. Předpokládá se, že v blízké budoucnosti poodhalíme mnohem více o těchto molekulách a o významu, který houbovým organizmům přinášejí (Fox a Howlett, 2008).

Navíc jsou sekundární metabolity, na rozdíl od primárních, specifické pro jednotky různých taxonomických úrovní (druh, rod, čeleď). Lze jich proto často využívat pro chemické určování a klasifikaci hub (chemotaxonomii). Je pro ně příznačné, že jsou často velmi toxické již v malých koncentracích, například amanitiny obsažené v muchomůrce zelené, peniciliny produkované štětičkovcem žlutozeleným, kyselina lysergová produkovaná pyrenomycety paličkovcí nachovou a *Claviceps paspali* (Klán, 1989).

Třídy sekundárních houbových metabolitů zahrnují polyketidy (např. aflatoxin, fumonisiny), non-ribosomální peptidy (např. sirodesmin, peramin a siderofory jako ferricrocin), terpeny (např. T-2 toxin, deoxynivalenol), indolové terpeny (např. paxillin a lolitremy)(Fox a Howlett, 2008).

### 3.3. BIOLOGICKÁ AKTIVITA HUB

Je bez pochyb, že sekundární metabolity makromycet vykazují obrovskou škálu biologických aktivit. Jejich fyziologické funkce a mechanismy působení většiny z nich stále nejsou kompletně odhalené. Velká biodiverzita vyšších hub představuje možnost rozšíření známých substancí pro použití ve farmaceutické chemii (Liu, 2007; Zhong a Xiao, 2009).

Uvádíme několik příkladů za taxony, které jsme sledovali a pokud možno s uvedením látek zodpovědných za stanovovanou biologickou aktivitu.

### 3.3.1. Antimikrobiální a antimykotická aktivita

Zástupce rodu *Agaricus*, a zároveň velice běžná houba *A. bisporus*, inhiboval v podobě etanolového extraktu růst bakterii např. *S. aureus* a *B. subtilis* (Jagadish et al., 2009).

Extrakt z houby *Cortinarius praestans*, byl účinný vůči *S. aureus* i *P. aeruginosa* (Janeš et al., 2007).

Acylcyklopentendiony z plodnic *Hygrophorus chrysodon* byly podle Gilardonihho et al. (2007) účinné vůči plísni *Fusarium verticillioides*, častému patogenu rostlin.

Zajímavé metabolity jsou nacházeny v rodu *Lactarius*. Latex, který tyto houby tvoří, obsahuje seskviterpeny odpovědné za jeho pach a hořkost. Takové seskviterpeny patří nejčastěji do skupin laktaranů, sekolaktaranů, marasmanů, isolaktaranů, norlaktaranů a karyophyllanů. Rufuslakton je laktaran izolovaný z *L. rufus* a taktéž vykazuje antimykotickou aktivitu vůči rostlinným patogenům (Hrdina et al., 2004; Liu, 2007).

*Pholiota aurivella* je příkladem vzácné houby, jejíž obsahová látka bisnoryangonin vykazovala antimikrobiální aktivitu vůči *Bacillus megaterium* a *Microbacterium foliorum*, kontaminantům potravy (Shindo et al., 2007).

### 3.3.2. Antioxidační aktivita

Pět hub z rodu *Agaricus* bylo testováno ve studiích antioxidační aktivity Barrose et al. (2008). Největší aktivitu z nich měl *Agaricus sylvatica*.

Dore et al. (2007) v brazilské studii popisuje *Geastrum saccatum* jako zdroj betaglukanů s antioxidační (vychytávání hydroxylového radikálu a superoxidu v koncentraci 0,27 mg/ml), ale i protizánětlivou a cytotoxickou aktivitou.

Ferreira et al. (2007) studovali obsah fenolických látek a vychytávání volných radikálů u metanolových extraktů hub *Lactarius deliciosus* a *Tricholoma portentosum*. První z nich vykazoval lepší výsledky v DPPH testu (hodnoty EC<sub>50</sub>: 8,52 mg/ml pro *L. deliciosus* oproti 22,9 mg/ml pro *T. portentosum*) i vyšší obsah fenolických látek.

Metanolový extrakt houby *Pleurotus pulmonarius* vykazoval aktivitu ve vychytávání hydroxylového radikálu (IC<sub>50</sub> 476,7 µg/ml)(Thekkuttuparambil a Kainoor, 2007).

Metanolové extrakty hub *Ramaria flava* a *Russula delica* byly testované různými metodami včetně DPPH metody a také pro obsah fenolických látek. Antioxidační aktivita se zvyšovala s koncentracemi. *Ramaria flava* obsahovala více fenolických látek (Gursoy et. al., 2010).

Polysacharidy (galaktomannany) *Russula virescens* byly odpovědné v jedné čínské studii za vychytávání hydroxylového radikálu *in vitro* (Sun et al., 2010). Jiná čínská studie popsala fenolické látky a  $\beta$ -karoten v plodnicích *Russula virescens* a uvedla, že houba vykazovala určitý potenciál ve vychytávání DPPH radikálu (Chen et al., 2010).

### 3.3.3. Antitumorózní aktivita

Polysacharidy z hub jsou velmi účinné co do antitumorózní aktivity a na trzích se vyskytuje řada přípravků proklamujících tento účinek. Například  $\beta$ -glukany lentinan (*Lentinus edodes*) nebo pleuran (*Pleurotus spp.*) jsou intenzivně studovány (Rop et al., 2009).

Extrakt z *Agaricus bisporus* indukoval apoptózu na leukemických buňkách HL-60 (Jagadish et al., 2009).

(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukany získané z plodnic *Russula virescens* po sulfataci vykazovaly antitumorózní aktivitu *in vivo* a *in vitro* (Sun et al., 2009).

*Sparassis crispa* obsahující vysoce větvený (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glukan (sparan) vykazuje imunitně zprostředkovanou antitumorózní aktivitu (Kim et al., 2010).

## 3.4. ALZHEIMEROVA NEMOC

### 3.4.1. Charakteristika onemocnění

Alzheimerova nemoc (AD – Alzheimer's disease) je neurodegenerativní onemocnění, které vede k zániku neuronů a v poslední fázi k demenci popsanou Aloisem Alzheimerem. Demenci charakterizujeme jako stav ireverzibilních a postupujících poruch vyšších kortikálních funkcí (Žigová, 2001; Lincová et al., 2007).

Prevalence onemocnění se zvyšuje s rostoucím věkem. Lidé ve věku nad 65 let mají pravděpodobnost, že onemocní AD asi 5 %, ve věku nad 85 let již toto číslo činí 25 %. Může se objevit ale i v nižším věku při genetickém výskytu v rodině. Předpokládá se, vzhledem k prodlužujícímu se věku obyvatelstva, že náklady na léčbu a péči o nemocné bude stoupat. Proto probíhá intenzivní výzkum na poli patogeneze AD a na jejím ovlivnění farmaký (Žigová, 2001).

### 3.4.2. Klinické příznaky

Vzhledem k pomalé progresi onemocnění může AD v raných stádiích unikat pozornosti okolí. Poruchy čichu, změny motoriky a pády mohou předcházet vážným projevům. Ve stádiu lehké demence pozorujeme u pacientů krátkodobé ztráty paměti, poruchy vyjádřování a řeči, nezřídka se objevuje deprese rezistentní na léčbu, poruchy adaptace na nové prostředí, ztráta zájmu o nové činnosti, ulpívání na stereotypch. Na demenci může také upozornit ztráta věcí, které vede k podezřívavosti a konfliktům, dále nevhodné oblékání, selhání při obsluze domácích přístrojů a jiné.

Středně těžká demence se vyznačuje takovým úbytkem paměti, že nemocný není schopen vykonávat běžné činnosti. Slovní zásoba se redukuje, nemocnému uniká kontext dění kolem sebe. Bez pomoci se ztrácí mimo své obydlí. Objevují se poruchy sociálního chování až halucinace a bludy. Postižený člověk není schopen samostatné existence a je odkázán na pomoc pečovatele.

Těžké stádium je spojeno s tzv. tečkovitou pamětí, kdy nemocný ztratil schopnost ukládat do paměti nové a vybavovat si staré vzpomínky. Nemusí poznat ani blízké osoby a nechápe dění kolem sebe. S tím souvisejí stavy zmatenosti, neklidu a úzkosti. Přetrvává agitovanost, poruchy spánku. Lze pozorovat zhoršování chůze, postižený ztrácí i schopnost ovládat sfinktery. V konečném stádiu je imobilizovaný na lůžku a plně odkázaný na péči okolí (Žigová, 2001).

### 3.4.3. Možnosti léčby

Z dosavadních poznatků dokážeme ovlivnit pouze některé známé patogenetické mechanismy AD. Současně nejvíce užívaná léčiva ze skupiny antidementiv jsou donezepil, rivastigmin a galanthamin. Jejich mechanismus účinku je založen na ovlivnění nedostatku acetylcholinu (Ach) inhibicí acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BuChE). Procesy vedoucí k nedostatku acetylcholinu jsou podle tzv. amyloidní hypotézy závislé na tvorbě patologického beta-amyloidu ( $\beta$ A). Rivastigmin má duální účinek – inhibuje kromě AChE, po vzestupu neurodegenerativních změn, také BuChE. Naproti tomu duální účinek galanthaminu spočívá kromě inhibice AChE, také v alosterické modulaci nikotinových receptorů čímž dále potencuje účinek Ach.

K dalšímu typu léčiv používaných v terapii AD patří memantin. Je to nekompetitivní antagonist glutamátových NMDA (N-methyl-D-asparagová kyselina) receptorů. Mechanismus



účinku objasňuje glutamátová teorie vycházející z poznatku, že nadměrná nabídka glutamátu v neurodegenerativní kaskádě působí na neurony excitotoxicky, hlavně prostřednictvím ionotropních receptorů typu NMDA. Tato nadměrná excitace neuronů vede po vyplavení vápenatých iontů k jejich smrti, to se týká glutamatergních i cholinergních neuronů (Žigová, 2011; Lincová et al., 2007).

K přínosům symptomatické léčby inhibitory lidských cholinesteráz a memantinem je nutno dodat fakta publikovaná v zahraničním nezávislém tisku. V časopisu *Prescrire* se ohledně léčby AD píše, že „inhibitory cholinesteráz mají přinejlepším jenom mírné účinky trvající jenom několik měsíců přibližně u 10 % pacientů. Pro své cholinergní vlastnosti sdílejí gastrointestinální, neurologické, urologické a kardiologické nežádoucí účinky. Memantin, nedostatečně prozkoumané léčivo s nejistými benefity, nese riziko neurologických nežádoucích účinků. Navíc, všechna tato léčiva přinášejí vysoké riziko lékových interakcí zvyšující možnost nežádoucích účinků a také smrti.“ (Prescrire International, 2008)

Z výše uvedeného je patrná potřeba nacházet nová, bezpečnější a účinnější léčiva. Probíhají studie s látkou Rember (methylenová modř) atakující tau-protein ( $\tau$ -protein). U hypotézy s  $\tau$ -proteinem se jedná o hyperfosforylovaný protein, který způsobuje kolaps mikrotubulů neuronů. Vytváří se v důsledku stresu nebo na základě jiného poškození mozku. Patologický  $\tau$ -protein se za jistých okolností může chovat jako infekční agens, není eliminován imunitním systémem a mění i zdravý  $\tau$ -protein v okolí na patologický. Dále se zkoumají peptidy strukturně blízké  $\beta$ A, které dokáží proti němu vyvolat imunitní reakci bez nežádoucích autoimunitních a zánětlivých reakcí.

Často se mluví o antioxidantech v léčbě a prevenci AD. I když se objevují názory, že antioxidanty se mohou uplatnit spíše v prevenci a na rozvinutou nemoc nemají patrný vliv, slibně vypadá výzkum duálně působících hybridů melatoninu a tacrinu. Takové hybridy vykazují vyšší anticholinesterázovou a antioxidační aktivitu, než kdyby byly tyto látky aplikovány odděleně (Patyar et al., 2011; Žigová, 2011).

#### **3.4.4. Role oxidačního stresu u Alzheimerovy nemoci**

Oxidační stres je výsledkem metabolických reakcí využívajících kyslík a představuje narušení rovnováhy prooxidačních a antioxidačních reakcí v živých organizmech. Nadbytek reaktivních forem kyslíku a dusíku (RFKD) může poškozovat lipidy, proteiny a DNA inhibicí jejich funkce. Oxidační stres se považuje za příčinu řady onemocnění včetně procesů stárnutí.

Není náhodou, že mozek je osobitně citlivý na oxidační stres, protože pro svojí činnost využívá velké množství kyslíku. Dále obsahuje velké množství polynenasycených mastných kyselin a přítomné jsou i přechodné kovy účastníci se redoxních dějů jakými jsou ionty železa nebo mědi (Valko a Mazúr, 2008).

K typickým projevům AD patří hromadění amorfních proteinových agregátů označovaných pojmem amyloid. S tím souvisí tvorba senilních plaků. Navíc jsou histopatology zdokumentové spleti změněných neurofibril a zánik neuronů především ve frontálním, parietálním a temporálním laloku. Významně je postižen cholinergní systém (Štípek et al., 2000).

Zvýšená produkce  $\beta$ A jako preventivního antioxidantu mozku vůči poškození lipoproteinů vlivem oxidačního stresu se považuje za hlavní příčinu rozvoje AD. Přitom toxicita  $\beta$ A závisí na jeho konformačním stavu a délce řetězce.  $\beta$ A se nachází buď v amorfním, nefibrilárním (non- $\beta$ -sheet structure) stavu, který je benigní, anebo je jeho struktura organizovaná ve formě  $\beta$ -skládaného listu ( $\beta$ -sheet) fibrilární povahy s cytotoxickými vlastnostmi, generující peroxid vodíku a ostatní reaktivní formy kyslíku. Velké množství patologického  $\beta$ A je ukládáno u jedinců se změnami na genech kódujících jeden ze tří transmembránových enzymů – amyloidový prekurzorový protein (APP), presenilin-1 a presenilin-2. Preseniliny jsou regulační proteiny, které se váží na APP. Pokud jsou nefunkční, dovolují alternativní proteolýzu APP ve prospěch patologického  $\beta$ A (Butterfield et al., 2002; Štípek et al., 2000).

APP i  $\beta$ A mají schopnost vázat kovy, jakými jsou měď a zinek, mají silnou Cu-reduktázovou aktivitu (vznik  $\text{Cu}^+$  z  $\text{Cu}^{2+}$ ). Měďný iont je potentním mediátorem vysoce reaktivního hydroxylového radikálu a APP nebo  $\beta$ A-vázaný  $\text{Cu}^+$  by mohl přispívat ke zvýšenému oxidačnímu stresu charakteristickému pro mozek s AD (Butterfield et al., 2002).

### **3.5. VOLNÉ RADIKÁLY A ANTIOXIDANTY**

#### **3.5.1. Co to jsou volné radikály?**

Volné radikály jsou atomy, molekuly nebo jejich fragmenty, které mají jeden nebo více nepárových elektronů a jsou schopny, i když jen krátce, samostatné existence. Jsou buď elektroneutrální, nebo mohou mít i iontový charakter. Kdysi byly opomíjené buď proto, že se nepovažovaly za důležité a nebo proto, že se pochybovalo o jejich přítomnosti v biologických systémech. Se studiem volných radikálů jako meziproductů biochemických reakcí se však začaly volné radikály chápat i jako součást patogeneze některých lidských onemocnění. Studuje se především jejich úloha v procesech stárnutí, kancerogeneze, kardiovaskulárních, metabolických,

neurodegenerativních chorob, stejně tak i při mechanismech imunitních a autoimunitních (Ďuračková, 1998).

Tyto látky mohou pohotově reagovat s různými biologickými strukturami, jakýmiž jsou lipidy, proteiny, nukleové kyseliny, a tak je poškozovat primárně i sekundárně. Tomuto škodlivému účinku se říká pojmy oxidativní a nitrosativní stres (Valko a Mazúr, 2008). Na druhé straně ale mohou fungovat jako prostředníci přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signální molekuly buněčné regulace, což dokazuje jejich nezastupitelnou úlohu v živé přírodě (Ďuračková, 1998; Štípek et al., 2000).

Mezi nejjednodušší radikál patří atom vodíku, protože disponuje jen jedním elektronem. Dále známe volné radikály odvozené od kyslíku, dusíku, jako i radikály vázané organicky. Ačkoliv by se pojmy „volné radikály“ a „reaktivní formy kyslíku“ měli rozlišovat, pro zjednodušení se setkáme s použitím pojmu „volné radikály“ pro obě skupiny těchto látek (Ďuračková et al., 1999).

### **3.5.2. Vznik volných radikálů**

V těle vzniká celá řada reaktivních forem kyslíku (RFK) a reaktivních forem dusíku (RFD). Nejčastější formou vzniku těchto molekul v biologických systémech je elektronový přenos (redoxní děje).

Vznikem radikálu může započít sled celého řetězce dalších reakcí. To zpravidla nastává, pokud se radikál dostane do střetu s další neradikálovou sloučeninou, kterých je většina. Pokud se ale potkají dva radikály, mohou vytvořit ze svých nepárových elektronů pár a ukončit tak radikálovou řetězovou reakci (Ďuračková, 1998; Štípek et al., 2000).

Mezi endogenní zdroje tvorby volných radikálů řadíme například: xanthinoxidázu (vznik kyseliny močové při úrazech, nekrózách atd.), mitochondrie, peroxysomy, reakce katalyzované kovy přechodných prvků, fagocyty (jejich aktivace při zánětu), kaskádu kyseliny arachidonové (autooxidace prostaglandinů), intenzivní cvičení a jiné.

Mezi exogenní zdroje tvorby volných radikálů počítáme: ionizující záření, znečištěné životní prostředí, UV světlo, některá léčiva, potravu, ozón, cigaretový kouř (Kimáková et al., 2011).

### 3.5.3. Reaktivní formy kyslíku

Molekula kyslíku je ve své podstatě biradikálem – v molekulových orbitalech má dva nepárové elektrony. Přijetím jednoho elektronu se redukuje na monoradikál – superoxidový aniont ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Další elektron bude redukovat superoxid na peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Je-li v blízkosti další elektron, molekula peroxidu se rozpadne na hydroxidový aniont ( $\text{OH}^-$ ) a velice reaktivní hydroxylový radikál ( $\text{HO}\cdot$ ). Ačkoliv peroxid vodíku není radikálem, k RFK ho řadíme, protože je důležitým intermediátem při vzniku volných radikálů. K dalším neradikálovým RFK řadíme singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), kyselinu chlornou ( $\text{HClO}$ ) a ozón ( $\text{O}_3$ )(Štípek et al., 2000).

#### 3.5.3.1. Superoxid

Jak už jsme výše uvedli, superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) vzniká jedoelektronovou redukcí  $\text{O}_2$ . Jeho reaktivita je závislá především na prostředí. Z vodných roztoků rychle mizí. Je toxický hlavně kvůli tvorbě dalších reaktivních molekul, jako je peroxid vodíku, hydroxylový radikál, případně singletový kyslík. Sám může biologicky významné molekuly poškozovat jako redukční i oxidační činidlo (Ďuračková, 1998).

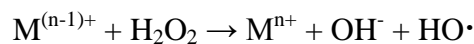
Cest, kterými může superoxid v organizmech vznikat, je řada. Patří sem enzymy jako xanthinoxidáza (ischemicko-reperfuze traumatické) a NADPH-oxidáza (metabolické vzplanutí profesionálních fagocytů) a cytochromoxidázový komplex. Oxyhemoglobin v erytrocytech je potenciálním zdrojem superoxidu a bylo dokázáno, že 3 % hemoglobinu v lidských erytrocytech denně vytváří superoxid. Erytrocyty proto mají vysoce sofistikovaný antioxidační systém (Ďuračková, 1998).

#### 3.5.3.2. Peroxid vodíku

Je nejstabilnějším intermediátem při proměně kyslíku na vodu. Z místa svého vzniku může proto difundovat na vzdálenější místo a také procházet buněčnou membránou (Ďuračková, 1998).

Peroxid vodíku je slabým oxidačním činidlem a může přímo inaktivovat některé enzymy, například oxidaci thiolových skupin, jako je tomu u glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázy. Její inhibice má za následek vyčerpání ATP. Je ale znám také jako významný antimikrobní metabolit imunocytů (tvořen ze superoxidu)(Ďuračková, 1998).

V přítomnosti přechodných prvků ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) se mechanismem Fentonovy reakce (viz níže) pohotově redukuje na hydroxylový radikál ( $\text{HO}\cdot$ ), hydroxidový aniont ( $\text{OH}^-$ ) za vzniku příslušného oxidovaného kationtu kovu (Štípek et al., 2000).



### 3.5.3.3. Hydroxylový radikál

Jako produkt tříelektronové redukce  $\text{O}_2$ , nebo jednoelektronové redukce  $\text{H}_2\text{O}_2$  je tento radikál extrémně reaktivní oxidant reagující s většinou biomolekul. I pro svůj krátký poločas existence je schopen způsobit jejich velké poškození. Může látkám odebírat vodík (reakce s deoxyribózou v DNA a její následné poškození), adovat se (například na aromatický kruh purinových nebo pyrimidinových zásad a zapříčinit mutace a smrt buněk) a nebo může přenášet elektron na jinou anorganickou nebo organickou látku. Vždy se tvoří nový typ radikálů a reakce se propagují dále (Ďuračková, 1998).

### 3.5.3.4. Singletový kyslík

Za určitých okolností se může nepárový elektron dikyslíku  $\text{O}_2$  dostat do excitovaného stavu s vyšší energetickou hladinou a přitom změnit svůj spin. Sigma singletový kyslík ( $^1\sigma\text{O}_2$ ) je nestabilní, má dva nepárové elektrony s opačným spinem a přechází na stálejší delta singletový kyslík, který již nemá nepárový elektron ( $^1\delta\text{O}_2$ ).

Jedním ze způsobů jeho vzniku jsou fotosenzibilizační reakce, kdy senzibilizátor po absorpci světelného kvanta předá excitační energii molekule  $\text{O}_2$ , čímž vznikne  $^1\text{O}_2$ . Senzibilizátory mohou být různá barviva – retinal, chlorofyl, bilirubin a mnohé jiné. Singletový kyslík může atakovat jak molekuly ve své blízkosti, tak samotný senzibilizátor, čímž změní jeho barvu (fotodynamický efekt).

Singletový kyslík je schopen peroxidace lipidů svou vazbou na atom uhlíku, za současného přesunu dvojnásobné vazby a vzniku hydroperoxidů (Štípek et al., 2000; Ďuračková, 1998).

### 3.5.3.5. Kyselina chlorná

Je syntetizovaná neutrofilními granulocyty pomocí myeloperoxidázy z  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Cl}^-$  a protonu vodíku.  $\text{HClO}$  je silným oxidantem, neutrofilny ji používají spolu s dalšími RFK a RFD jako mikrobicidní prostředek (Štípek et al., 2000).

### 3.5.4. Reaktivní formy dusíku

#### 3.5.4.1. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý ( $\text{NO}^\bullet$ ) je malá molekula obsahující v jednom ze svých molekulových orbitalů nepárový elektron, a proto ho řadíme mezi volné radikály. *In vivo* vzniká specifickou enzymatickou cestou pomocí NO syntházy, která obstarává přeměnu L-argininu na L-citrulin přes pětielektronovou oxidoredukční reakci (Ghafourifar a Cadenas, 2005).

Jeho biologická funkce spočívá v aktivaci nebo inhibici některých významných enzymů. Příkladem je reakce s hemovou částí guanylátcyklázy, jejíž výsledkem je alosterická modifikace a aktivace enzymu. Změnou poměru cGMP (cyklický guanosin-monofosfát) k cAMP (cyklický adenosin-monofosfát) v buňce se indukuje vasodilatace (Ďuračková, 1998; Lincová et al., 2007).

Kromě dalších účinků na cévní endotel, kdy  $\text{NO}^\bullet$  silně inhibuje adhezi a agregaci trombocytů, neutrofilů a monocytů, se uplatňuje v dějích nespecifické imunity svým cytotoxickým příp. cytostatickým účinkem na patogeny. Známý je i jeho účinek napodobující neurotrasmitter. Po svém vzniku v neuronech obsahujících NO synthasu, přenáší oxid dusnatý signál na neurony s guanylátcyklázou. Takto může  $\text{NO}^\bullet$  projevovat svoji cytotoxicitu vůči terčovým neuronům, což je za jistých okolností potřebné pro správný vývin mozku, ale za jiných okolností to může vést k jeho poškození (Bredt a Snyder, 1992; Ferenčík et al., 1994; Lincová et al., 2007).

Toxikologický význam oxidu dusnatého vyplývá i z jeho možné reaktivity se superoxidem a kyslíkem. V prvním případě vznikne nitrózoperoxylový aniont ( $\text{ONOO}^-$ ), ve druhém pak přes nitrózoperoxylový radikál ( $\text{ONOO}^\bullet$ ) vznikne oxid dusičitý ( $\text{NO}_2^\bullet$ ). Všechny tyto RFD se různou mírou, v závislosti na podmínkách, pravděpodobně podílejí na poškozování buněk. Předpokládá se i přímá vazba  $\text{NO}^\bullet$  na biologický cíl. Nitrosativní stres může vést k nitrosylačním reakcím, které následně mohou měnit strukturu biomolekul a znemožňovat jejich normální funkci (Czapski a Goldstein, 1995; Valko a Mazúr, 2008).

### 3.5.5. Antioxidační systém organismu

Proti toxickému působení volných radikálů si organismy vybudovali ochranné mechanismy, které buď znemožňují jejich tvorbu, anebo snižují negativní dopady již vytvořených radikálů. I když pojem antioxidant pochází původně z potravinářské chemie 40. let a úzce označoval látku schopnou zastavit řetězové radikálové reakce typu peroxidace lipidů, je antioxidační ochrana organismu, jak víme, daleko komplexnější (Ďuračková, 1998; Pláteník, 2009).

#### 3.5.5.1. Endogenní enzymatické antioxidanty

##### 3.5.5.1.1. Superoxiddismutáza

Objev superoxiddismutázy (SOD) McCordem a Fridovichem v roce 1969 znamenal velký průlom v poznání účinků volných radikálů v biologických systémech.

Obsažená v každé buňce, katalyzuje dismutaci superoxidu na molekulový kyslík a peroxid vodíku. Má několik izoform lišících se hlavně obsahy atomů kovů v aktivních centrech. Známe Cu, Zn-SOD, Mn-SOD a Fe-SOD. Přenos elektronu z jedné molekuly superoxidu na druhou obstarává v redoxním cyklu atom kovu tak, že se nejdříve redukuje a pak zpětně oxiduje ( $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Cu}^+$ - $\text{Cu}^{2+}$ ) (Štípek et al., 2000).

Jako poslední byla objevena extracelulární SOD (EC-SOD). Její přesný biologický význam zatím není objasněn, ale předpokládá se, že je významným modulátorem aktivity oxidu dusnatého a RFD, které mají vliv na relaxaci hladkého svalstva (Oury et al., 1996).

##### 3.5.5.1.2. Glutathionperoxidáza

Funkcí glutathionperoxidáz (GPx) je eliminovat peroxidy. Chemicky to jsou selenoproteiny. V aktivním centru enzymu je selén přítomen ve formě selenocysteinu (Ďuračková, 1998).

Selenocystein redukuje peroxid dvěma elektrony na hydroxylovou skupinu (nebo vodu) a sám se oxiduje na selenol (-C-Se-OH). Ten se pak regeneruje elektrony dvou glutathionů (GSH) zpět na selenocystein (Štípek et al., 2000).

Rozlišujeme dvě formy enzymu: GPx na selenu nezávislou (glutathion-S-transferáza katalyzující detoxikaci různých xenobiotik) a na selenu závislou GPx. U lidí byly dokázány čtyři rozdílné selen-závislé GPx: cytoplazmatická, plazmatická, gastrointestinální a fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidáza. Poslední dokáže redukovat fosfolipidové

hydroperoxydy na neškodné hydroxyderiváty v membránách, bez uvolnění mastných kyselin z lipidů (Ďuračková, 1998; Štípek et al., 2000).

### 3.5.5.1.3. Kataláza

Tento enzym se u člověka nachází ve všech důležitých orgánech, hlavně v játrech a erythrocytech. Intracelulárně se váže na peroxisomy. V aktivním centru katalázy (KAT) se nachází hem s koordinovaným trojmocným železem. KAT usnadňuje rozklad  $H_2O_2$  na vodu a kyslík (Ďuračková, 1998).

### 3.5.5.2. Endogenní neenzymatické antioxidanty

Do této skupiny řadíme různé bílkoviny, které vážou přechodné prvky. V tomto smyslu sem patří plazmatický **transferin** a **laktoferin** leukocytů. Vážou  $Fe^{3+}$  a zamezují mu tak vstup do Fentonovy reakce (Štípek et al., 2000).

Za antioxidační můžeme považovat i **haptoglobin** a **hemopexin**, které jsou schopné extracelulárně vázat hem obsahující prooxidační železo a inhibovat lipoperoxidaci, což bylo potvrzeno u některých patologických stavů (Gutteridge a Smith, 1988).

Dalším plazmatickým vychytávačem volných radikálů je **ceruloplazmin**. Umožňuje uvolnění železa z buněk a jeho předání transferinu. Váže měď, která je podstatná pro ferooxidázovou reakci (oxidace  $Fe^{2+}$  na  $Fe^{3+}$ ). Při ní se kyslík oxiduje čtyřmi elektrony na vodu, bez vzniku toxických meziproductů. (Attieh et al, 1999). **Albumin** doplňuje aktivitu ceruloplazminu tím, že vystupuje jako „samoobětující se“ antioxidant.  $Cu^{2+}$  iont vázaný na albumin se  $H_2O_2$  může oxidovat na toxický  $Cu^{3+}$ . Tento iont se však neuvolňuje z vazby a poškozuje jen okolní struktury na proteinu (Halliwell a Gutteridge, 1989).

**Metalothioneiny** obsahují až 33 % cysteinu a syntetizují se v buňce v určité fázi dělení. Prostřednictvím síry na cysteinu chelatují kovové ionty. Ve větší míře se syntetizují počas oxidačního stresu a jsou schopné vychytávat hydroxylový radikál (Meneghini, 1997).

### 3.5.5.3. Nízkomolekulární antioxidanty

#### 3.5.5.3.1. Kyselina askorbová (vitamin C)

Antioxidační účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje radikály řady organických i anorganických sloučenin. Při těchto reakcích ztratí elektron a změní se na dehydroaskorbát



neboli askorbylový radikál. Regeneruje se dehydrogenázou za účasti NADH zpět na askorbát nebo dismutuje na askorbát a dehydroaskorbát. Regenerační enzymy vitamínu C jsou lokalizované více v intracelulárním prostoru, proto se v průběhu oxidačního stresu v extracelulárním prostoru může jeho zásoba rychle vyčerpat. Rozmanité funkce této látky jsou shrnuty v tabulce 1 (Bendich et al., 1986; Štípek et al., 2000).

*Taülka 1.: Funkce vitamínu C v organizmu. (modifikováno podle Ďuračkové, 1998)*

<b>Funkce</b>	<b>Význam</b>
<b><i>Kofaktor hydroxyláz</i></b>	
Prolinhydroxyláza, lysinhydroxyláza	Biosyntéza kolagenu
Dopamin- $\beta$ -hydroxyláza	Přeměna dopaminu na noradrenalin
<b><i>Redukční činidlo</i></b>	
Pro $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$	Resorbce ve střevě
Pro $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{+}$	Potřeba redukované formy přechodných prvků v aktivním centru hydroxyláz
Redukce nitrososloučenin	Eliminace kancerogenů
Redukce organických radikálů	Antioxidační
Lapač $\text{O}_2^{\cdot-}$ , $\cdot\text{OH}$ , $\cdot\text{R}$	Antioxidační
Reakce s radikálem vitamínu E	Regenerace vitamínu E

### **3.5.5.3.2. $\alpha$ -tokoferol (vitamin E)**

Vitamin E zahrnuje skupinu osmi isomerů, z nichž je biologicky nejúčinnější právě  $\alpha$ -tokoferol. Jeho největším významem je antioxidační funkce, pomocí níž zastavuje radikálové reakce v lipidech membrán a lipoproteinech nebo přímo vycytává kyslíkové radikály. Takto vzniklý tokoferylový radikál se může redukovat zpět na  $\alpha$ -tokoferol askorbátem, glutathionem i ubiquinolem (Štípek et al., 2000).

### **3.5.5.3.3. Karotenoidy**

Jedná se o pigmenty rostlinného nebo mikrobiálního původu a řadíme je mezi isoprenové sloučeniny (terpeny). Živočichové je neumí syntetizovat. Známe zhruba 600 derivátů karotenoidů, mezi nimi jsou nejvýznamější  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, lykopen, lutein, zeaxantin a kryptoxantin. 10 % z nich se dokáže metabolizovat na retinol, tedy vitamin A (Ďuračková, 1998).

Jako antioxidanty jsou schopné odstraňovat organické radikály v lipidech. Mohou také zhaset singletový kyslík (Štípek et al., 2000).

Studuje se i jejich úloha v prevenci a léčbě onkologických onemocnění. Výsledky takových studií jsou ale nejednoznačné, antioxidační mechanismus nebyl na molekulové úrovni dokázán, proto je ovlivnění tzv. „volnoradikálových“ onemocnění karotenoidy zatím jen hypotézou (Rock et al., 1996).

#### **3.5.5.3.4. Ubichinon (koenzym Q)**

Koenzym Q (KoQ) je derivát benzochinonu, který má v postranním řetězci isoprenové jednotky, jejichž počet se druhově liší (u člověka 10 jednotek). Ovlivňuje vnitřní mitochondriální transmembránový protonový gradient, který má za následek tvorbu ATP (Štípek et al., 2000).

Dává se také do souvislosti s metabolismem volných radikálů jednak pro své prooxidační, ale i antioxidační vlastnosti. Tlumí radikálové reakce spolu s tokoferolem, také zřejmě napomáhá jeho regeneraci (Ďuračková, 1998; Štípek et al., 2000).

#### **3.5.5.3.5. Bilirubin**

Bilirubin vzniká při metabolismu hemu redukční reakcí z biliverdinu. V plasmě se váže na albumin. Byla zjištěna jeho schopnost působit antioxidačně při peroxidaci lipidů, také působí synergicky s vitamínem E (Dudnik, 1998).

#### **3.5.5.3.6. Kyselina močová**

Kyselina močová (KM) byla původně chápána jen jako konečný produkt metabolismu purinových látek. Předpokládá se však, že zvýšení průměrného věku lidí počas evoluce je umožněn díky vysokému obsahu KM v plasmě. Je to důsledek ztráty enzymu urikázy, která se u jiných živočichů stará o přeměnu KM na snadněji vylučitelný allantoin. Je významným zhasičem singletového kyslíku a lapačem hydroxylového radikálu (Ames, 1981).

Díky svým chelatačním schopnostem váže ionty železa a mědi do formy nepodporující radikálové reakce (Pecháň, 1995).

### **3.5.5.3.7. Glutathion**

K významným nízkomolekulovým antioxidantům patří také redukované thioly (GSH) a disulfidy (GSSG). Jako tripeptid ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin) se nachází ve všech savčích buňkách. Je to redoxní pufr buňky, snadno se oxiduje s další molekulou glutathionu na disulfid (GSSG). Odstraňuje RFK, udržuje v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů, cysteinu, koenzymu A a regeneruje tokoferol a askorbát. Jeho funkce jako substrátu glutathionperoxidázy již byla načrtnuta (Štípek et al., 2000).

### **3.5.5.3.8. Kyselina lipoová**

Bylo prokázáno, že tato nerozpustná látka je téměř univerzálním antioxidantem – reaguje s volnými radikály přímo, chelatuje ionty přechodných kovů, recykluje antioxidanty a ovlivňuje expresi genů (Duračková, 1998; Štípek et al., 2000).

## **3.5.5.4. Exogenní antioxidanty**

### **3.5.5.4.1. Přírodní antioxidanty – flavonoidy**

Jsou to látky fenolické povahy, široce rozšířené v rostlinné říši. Jsou hojně zastoupeny v lidské potravě a intenzivně se studují jejich přínosy pro zdraví. K základním strukturám, na kterých stojí chemie flavonoidů patří: flavan-3-ol, flavanon, flavon, flavon-3-ol, anthokyanidin a chalkon (Van Acker et al., 1996).

Nejvíce jsou v potravě zastoupeny flavanoly (katechiny a proanthokyanidiny). Jejich největšími zdroji jsou ovoce a nápoje (ovocné šťávy, víno, čaj, káva, čokoláda a pivo), méně pak zelenina, luštěniny a obiloviny. Denní příjem fenolických látek se odhaduje na kolem 1 g/den. Hodnoty v plazmě po podání většího množství málokdy překročí  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Chybí nám dostatečné znalosti o jejich absorpci a metabolismu (Scalbert a Williamson, 2000).

Velký vliv na antioxidační schopnosti má jejich struktura. Platí, že více fenolických skupin znamená výraznější antioxidační vlastnosti (Cao et al., 1997).

Přijímá se názor, že flavonoidy jsou přinejmenším tak dobré antioxidanty, ne-li lepší, za jaké jsou považovány vitamin C a vitamin E. Výhodou je, že jsou aktivní jak ve vodném tak i v lipofilním prostředí (Rice-Evans et al., 1996).

### 3.5.5.4.2. Syntetické antioxidanty

Antioxidační aktivitu vykazují i léčiva a další látky. Některé z nich jsou shrnuty v tabulce 2 podle Ďuračkové (1998) a Racka (2003).

*Tabulka 2.: Syntetické antioxidanty*

<b>Léčiva</b>	<b>Činidla</b>
N-acetylcystein	Butylhydroxytoluen
Allopurinol	Dimethylsulfoxid
Kaptopril	Dimetylthiourea
Probukol	
Propranolol	
Promethazin	
Statiny	
Fenylbutazon	
21-aminosteroidy (lazaroidy)	
Blokátory kalciových kanálů	

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4.1. POTŘEBY**

#### **4.1.1. Chemikálie**

Acetylthiocholin jodid 98% (Sigma, CZ)

2,2'- Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) 98% (ABTS)(Sigma, CZ)

Butyrylthiocholinjodid 98% (Sigma, CZ)

Dihydrogénfosforečnan sodný (Sigma, CZ)

5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB)(Sigma, CZ)

Dusičnan bismutitý zásaditý č. (Sigma, CZ)

Folin-Ciocalteuovo činidlo 2M (Sigma, CZ)

Galanthamin hydrobromid 98% (Changsha Organic Herb Inc., China)

Huperzin A (Tai'an Zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Jodid draselný č. (Sigma, CZ)

Kyselina askorbová č. (Sigma, CZ)

Kyselina gallová 98% (Roth, DE)

Kyselina vinná č. (Sigma, CZ)

Peroxodisíran draselný 99% (Sigma, CZ)

Skulerin – izolováno na katedře farmaceutické botaniky a ekologie

Trolox 97% (Sigma, CZ)

Uhličitan sodný č. (Sigma, CZ)

#### **4.1.2. Rozpouštědla**

Diethylamin č. (Penta, CZ)

Dimethylsulfoxid (DMSO)(Sigma, CZ)

Etanol (EtOH) 96% denaturovaný metanolem (Penta, CZ)

Chloroform (CHCl<sub>3</sub>)(Penta, CZ)

Toluen č. (Penta, CZ)

Voda superčistá (voda)

### 4.1.3. Testované druhy hub

Většina testovaných druhů hub (tab. 3) byla získána z výstavy hub, která se koná každoročně v Muzeu východních Čech v Hradci Králové. Jednotlivé druhy hub byly identifikovány paní RNDr. Věrou Samkovou, PhD.

Tabulka 3.: Testované druhy hub

<b>Taxon</b>	<b>Původ</b>	<b>Sběr</b>
<i>Agaricus lanipes</i> (Møller & Schäff.) Sing.	výstava	11.10.2010
<i>Agaricus macrosporus</i> (Møller & Schäff.)	výstava	11.10.2010
<i>Aureoboletus gentilis</i> (Quél.) Pouzar	výstava	11.10.2010
<i>Boletus pinophilus</i> Pilát & Dermek	výstava	11.10.2010
<i>Cortinarius cotoneus</i> Fr.	výstava	11.10.2010
<i>Cortinarius praestans</i> Cordier	výstava	11.10.2010
<i>Galerina marginata</i> (Batsch) K.	výstava	11.10.2010
<i>Gastrum rufescens</i> Pers.	výstava	11.10.2010
<i>Hygrophorus capreolarius</i> Kalchbr.	výstava	11.10.2010
<i>Hygrophorus chrysodon</i> (Batsch) Fr.	výstava	11.10.2010
<i>Lactarius subdulcis</i> (Pers.) Gray	výstava	11.10.2010
<i>Leotia lubrica</i> (Scop.) Pers.	výstava	11.10.2010
<i>Limacella guttata</i> (Pers.) Konrad&Maubl.	výstava	11.10.2010
<i>Mutinus caninus</i> (Huds.) Fr.	výstava	11.10.2010
<i>Pholiota aurivella</i> (Batsch) P. K.	výstava	11.10.2010
<i>Pleurotus pulmonarius</i> Fr. (Quél.)	výstava	11.10.2010
<i>Pseudoboletus parasiticus</i> (Bull.) Šutara	výstava	11.10.2010
<i>Ramaria apiculata</i> (Fr.) Donk	výstava	11.10.2010
<i>Russula amara</i> Kučera	výstava	11.10.2010
<i>Russula fragilis</i> Fr.	výstava	11.10.2010
<i>Russula undulata</i> Velen.	výstava	11.10.2010
<i>Russula virescens</i> (Schaeff.) Fr.	Hl. n/Vltavou	20.9.2010
<i>Sparassis nemecii</i> Pilát & Veselý	výstava	11.10.2010
<i>Tricholoma lascivum</i> (Fr.) Gillet	výstava	11.10.2010
<i>Tricholoma portentosum</i> (Fr.) Quél.	výstava	11.10.2010

## 4.2. OBECNÉ POSTUPY

### 4.2.1. Odpařování extraktů

Pro odpařování (zahušťování) extraktů za sníženého tlaku byla použita rotační vakuová odparka Büchi.

Nejprve byl z extraktů odpařen etanol při teplotě vodní lázně okolo 50°C. Následně, po filtraci vzniklých vodných roztoků byly tyto zahuštěné v odparce na objem vhodný pro lyofilizaci.

### 4.2.2. Sušení extraktů

Extrakty bylo nutné zbavit vody, abychom je mohli zvážít, uchovávat a používat pro plánované experimenty.

Pro odstranění zbytkové vody z extraktů bylo použito metody mrazové sublimace (lyofilizace). Po předešlém zahuštění vodných roztoků byly extrakty v lyofilizačních baňkách šetrně zmrazené pomocí tekutého dusíku tak, aby zmrazená vrstva zajímala v baňce co největší plochu.

Takto připravené extrakty byly vysušeny v lyofilizátoru za sníženého tlaku, kdy byl za několik hodin získán kyprý produkt.

### 4.2.3. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Vzorky pro analytickou TLC mající za cíl zjistit přítomnost alkaloidů v extraktech byly připravené rozpuštěním 10 mg extraktu v 1 ml rozpouštědla (etanol 50%) a dvakrát naneseny na desky. Eluce probíhala vzestupně v komoře sycené 30 minut parami eluční soustavy.

Adsorbent:	oxid hlinitý s indikátorem (10 × 20 cm)
Dráha:	8 cm
Soustava:	toluen : chloroform : ethanol : diethylamin (70 : 20 : 10 : 3)
Standard:	skulerin
Detekční činidlo:	Dragendorffovo činidlo

### **4.3. PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ**

Očištěné plodnice hub byly po zvážení rozmixovány v rozpouštědle (EtOH 70%) v množství asi 15 ml EtOH na 1 g váhy houby. Následně probíhala extrakce v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut, při laboratorní teplotě a intenzitě 10. Filtrací přes buničinu byl oddělen extrakt od pevného podílu a pevný podíl byl promýván  $3 \times 10$  ml rozpouštědla. Etanol z filtrátu byl odstraněn na rotační vakuové odparce. Do baňky s takto zahuštěným extraktem bylo přilito asi 10 ml superčisté vody. Tento roztok byl filtrován do 100ml baněk na filtračním tubusu za sníženého tlaku přes vrstvu čištěné křemeliny. Filtrační vrstva byla promyta  $3 \times 5$  ml superčisté vody. Získaný roztok byl částečně odpařen na vakuové odparce, uzavřen a byl uchováván v chladu až do lyofilizace. Po lyofilizaci byly baňky umístěny do exikátoru a další den byly extrakty přeplněné do penicilinek, ošetřené argonem a dobře uzavřeny. Takto připravené extrakty byly uchovávány v mrazu a představovaly hlavní materiál pro stanovené cíle. Výtěžnost je shrnuta v kapitole 5.1. (tab. 4).

### **4.4. HODNOCENÍ EXTRAKTŮ POMOCÍ TLC**

Jelikož za inhibici lidských AChE a BuChE jsou nejčastěji odpovědné alkaloidy (Filho et al., 2006), zajímalo nás, jsou-li v testovaných makromycetách přítomny. Proto jsme připravené extrakty podrobily tenkovrstvé chromatografii s následnou UV detekcí a postříkem Dragendorffovým činidlem (roztok dusičnanu bismutitého a jodidu draselného v kyselině). Je známo, že alkaloidy jako slabé baze tvoří s tímto činidlem komplexní tetrajodobismutité sloučeniny zbarvené na červenohnědo.

### **4.5. HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY**

#### **4.5.1. Hodnocení inhibice acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy**

Stanovení inhibice uvedených enzymů bylo prováděno pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody modifikované Bajgarem s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)(Bajgar, 1972; Ellman et al., 1961). Substrátem pro stanovení byly estery thiocholinu, které jsou štěpeny cholinesterázami na thiocholin a příslušnou kyselinu. Principem je, že uvolněná thiolová skupina se naváže na DTNB a vzniká žlutý produkt vhodný pro spektrofotometrické stanovení při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbance za jednu minutu. Pokud jsou ale enzymy inhibované, k reakci thiocholinu s DTNB nedochází a produkt žlutého zbarvení nevzniká.



Jako zdroj lidské AChE byla v experimentu použita lidská erytrocytární pouzdra. Zdrojem BuChE byla lidská plasma. Uvádíme zkrácený postup získání obou enzymů.

Čerstvě získaná lidská krev se centrifugovala 10 minut při 4000 ot./min (centrifuga Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611). Oddělená plasma byla rozplněna do mikrozkušavek. Červené krvinky byly odebrány a 3× přemyty pětinásobným množstvím 5mM fosfátového pufru (pH 7,4) s obsahem 150 mM NaCl a centrifugovány při 12000 ot./min (centrifuga Avanti J-301, rotor JA-30.50). Jeden ml očištěných červených krvinek se 10 minut míchal se 40 ml 5mM fosfátového pufru (pH 7,4). Takto vzniklá pouzdra červených krvinek se nakonec centrifugovala po dobu 10 minut při 20000 ot./min a byla třikrát promyta fosfátovým pufrům (pH 7,4).

Slepý vzorek pro měření byl připraven tak, že do jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 8,3  $\mu$ l plasmy nebo erytrocytárních pouzder; 67  $\mu$ l DTNB; 8,3  $\mu$ l rozpouštědla (EtOH); 215  $\mu$ l 100mM fosfátového pufru (pH 7,4) a 33,5  $\mu$ l roztoku substrátu.

Měření vzorků hub bylo prováděno podobně, s tím rozdílem, že místo čistého rozpouštědla byly přidávány roztoky extraktů o různé koncentraci (20,0; 10,0; 2,0; 1,0; 0,2 mg/ml). Měření bylo prováděno při teplotě 37 °C, vlnové délce 436 nm v kinetickém módu po dobu jedné minuty (sedm měření).

Z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE a BuChE byly v programu GraphPaD Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce Graph PaD Software, San Diego, CA, USA) vypočítány nelineární regresí hodnoty IC<sub>50</sub>. Zároveň byly tyto hodnoty porovnány s hodnotami známých inhibitorů cholinesteráz – galanthaminem, huperzinem A a eserinem. Výsledky jsou shrnuty v kapitole 5.3. (tab. 5 a 6).

Procenta inhibice byla vypočítána pomocí vzorce:

$$\% I = 100 - (\Delta A_{BL} / \Delta A_{SA}) \times 100$$

$\Delta A_{BL}$  – nárůst absorbance za 1 minutu u slepého vzorku

$\Delta A_{SA}$  – nárůst absorbance za 1 minutu u měřeného vzorku

#### 4.5.2. Metoda vychytávání DPPH radikálu s využitím SIA

Stanovení antioxidační aktivity extraktů bylo provedeno sekvenční injekční analýzou (SIA) se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu (Polášek et al., 2004).

Tato automatizovaná metoda je založena na známé reakci stabilního 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylového radikálu (DPPH) s antioxidanty *in vitro*, která vede k odbarvení DPPH.

Před měřením byl připraven  $1 \times 10^{-4}$  M roztok DPPH rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% EtOH, s následnou sonikací a doplněním na 100 ml superčistou vodou. Jako rozpouštědlo pro přípravu vzorků, jako slepý vzorek a nosný proud v systému byl použit 50% EtOH.

Dále byly připraveny roztoky extraktů o koncentraci 1 mg/ml a ředením byly připraveny koncentrace 1,0; 0,5; 0,25 a 0,1 mg/ml. V experimentu byla jako standard použita kyselina askorbová. Každá koncentrace byla měřena třikrát při vlnové délce 525 nm. Výsledky byly shrnuty v kapitole 5.4. (tab. 7 a 8).

Výpočet indexu zhášecí účinnosti (% Q) bylo provedeno pomocí vzorce:

$$\% Q = (1 - A_x / A_0) \times 100$$

$A_0$  – průměrná výška píku naměřená u slepého vzorku

$A_x$  – průměrná výška píku naměřená po přidání roztoku antioxidantu

Hodnota  $EC_{50}$  (50% účinná koncentrace) byla určena pomocí programu GraphPad Prism.

#### 4.5.3. Metoda vychytávání ABTS<sup>+</sup> radikálu s využitím SIA

Sekvenční injekční analýza byla použita i při stanovování antioxidační aktivity pomocí ABTS<sup>+</sup> radikálu. Experiment je založen na reakci modrozeleného ABTS<sup>+</sup> radikálu s antioxidanty vzorků *in vitro*. Měří se pokles absorbance při 734 nm (Re et al., 1999).

Nejprve byl připraven roztok ABTS<sup>+</sup> radikálu smícháním 7mM roztoku ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)) s 2,4mM peroxidisíranem draselným a jeho ponecháním přes noc při pokojové teplotě. 500  $\mu$ l bylo odpipetováno a uloženo v mrazu.

50% EtOH byl použit jako rozpouštědlo, slepý vzorek a nosný roztok v systému. Standardem byl trolox v koncentracích 0,01 mM – 0,06 mM. Z výsledků měření aktivity troloxu byla sestrojena přímka lineární regrese v programu GraphPad Prism ( $R^2 > 0,98$ ). Potom byly proměřeny různé koncentrace vzorků houbových extraktů tak, aby jejich aktivita byla 20-80 % a následně byly sestrojeny příslušné přímky závislosti antioxidační aktivity na koncentraci ( $R^2 > 0,98$ ). Měření bylo prováděno vždy třikrát u každého vzorku.

Výsledky byly v kapitole 5.4. (tab. 7 a 8) vyjádřeny jako hodnota TEAC (z angl. – trolox equivalent antioxidant capacity) podle vzorce:

$$\text{TEAC} = \text{sklon přímky vzorku} / \text{sklon přímky troloxu}$$

#### 4.5.4. Stanovení celkového množství fenolických látek

Obsah fenolických látek byl stanoven pomocí metody dle Folin-Ciocalteua (Singleton a Rossi; 1965).

V experimentu je žlutě zbarvené FC činidlo přidáno k roztoku etanolových extraktů (EtOH 50%) a spolu se 7,5% uhličitanem sodným se roztok v přítomnosti fenolických látek barví modře. Absorbance závislá na koncentraci fenolických látek byla měřena na spektrofotometru Shimadzu UV-1601 a odečítána za pomoci UV Probe softwareu. Jako standard byla použita kyselina gallová.

Kalibrační křivka byla sestrojena měřením roztoku vzniklého smícháním 0,125 ml etanolového roztoku kyseliny gallové o koncentracích 0,025 – 0,125 mg/ml; 0,625 ml FC činidla a 0,5 ml 7,5% uhličitanu sodného. Absorbance byla měřena po 30 minutách při pokojové teplotě při 765 nm.

Z každého etanolového houbového extraktu o koncentraci 1 mg/ml bylo vzato 0,125 ml a toto množství bylo smícháno se stejnými činidly jako standard a následně proměřeno za stejných podmínek.

Každý vzorek byl měřen třikrát a celkové množství fenolických látek v extraktech po odečtení na kalibrační křivce bylo vyjádřeno v kapitole 5.5. (tab. 9) jako ekvivalent kyseliny gallové na mg extraktu (GAE/mg).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. VÝTĚŽKY EXTRAKCE

Tabulka 4.: Navážené množství a konečné výtěžky při extrakci sledovaných taxonů

Taxon	Navážka (g)	Výtěžek (mg)	Extrah. látky (%)
<i>Agaricus lanipes</i> (Møller & Schäff.) Sing.	17,70	1800	10,17
<i>Agaricus macrosporus</i> (Møller & Schäff.)	16,50	1310	7,94
<i>Aureoboletus gentilis</i> (Quél.) Pouzar	4,56	780	17,11
<i>Boletus pinophilus</i> Pilát & Dermek	25,47	1070	4,20
<i>Cortinarius cotoneus</i> Fr.	24,10	810	3,36
<i>Cortinarius praestans</i> Cordier	19,80	1330	6,72
<i>Galerina marginata</i> (Batsch) K.	5,48	280	5,11
<i>Geastrum rufescens</i> Pers.	1,38	230	16,70
<i>Hygrophorus capreolarius</i> Kalchbr.	9,13	560	6,13
<i>Hygrophorus chrysodon</i> (Batsch) Fr.	5,40	530	9,81
<i>Lactarius subdulcis</i> (Pers.) Gray	1,65	180	10,90
<i>Leotia lubrica</i> (Scop.) Pers.	15,25	230	1,51
<i>Limacella guttata</i> (Pers.) Konrad&Maubl.	12,18	1080	8,87
<i>Mutinus caninus</i> (Huds.) Fr.	3,12	40	1,28
<i>Pholiota aurivella</i> (Batsch) P. K.	23,30	1060	4,55
<i>Pleurotus pulmonarius</i> Fr. (Quél.)	19,20	760	3,96
<i>Pseudoboletus parasiticus</i> (Bull.) Šutara	3,53	660	18,70
<i>Ramaria apiculata</i> (Fr.) Donk	26,40	620	2,35
<i>Russula amara</i> Kučera	10,72	900	8,40
<i>Russula fragilis</i> Fr.	9,96	400	4,02
<i>Russula undulata</i> Velen.	15,11	1280	8,47
<i>Russula virescens</i> (Schaeff.) Fr.	12,42	620	5,07
<i>Sparassis nemecii</i> Pilát & Veselý	23,82	520	2,18
<i>Tricholoma lascivum</i> (Fr.) Gillet	17,44	1420	8,14
<i>Tricholoma portentosum</i> (Fr.) Quél.	18,40	870	4,73

### 5.2. HODNOCENÍ PŘÍTOMNOSTI ALKALOIDŮ

V extraktech nebyly na základě použité metodiky zjištěny alkaloidy.

### 5.3. HODNOCENÍ INHIBICE ACETYL- A BUTYRYLCHOLINESTRÁZY

Tabulka 5.: Hodnocení inhibice AChE a BuChE

Taxon	AChE		BuChE	
	% I (500 µg/ml)	IC <sub>50</sub> µg/ml	% I (500 µg/ml)	IC <sub>50</sub> µg/ml
<i>Agaricus lanipes</i> (Møller & Schäff.) Sing.	13,79 ± 0	> 500	15,27 ± 2,72	> 500
<i>Agaricus macrosporus</i> (Møller & Schäff.) Pilát	7,24 ± 0,34	> 500	15,27 ± 2,51	> 500
<i>Aureoboletus gentilis</i> (Qué.) Pouzar	17,33 ± 0,31	> 500	29,80 ± 2,18	> 500
<i>Boletus pinophilus</i> Pilát & Dermek	-	> 500	5,26 ± 1,58	> 500
<i>Cortinarius cotoneus</i> Fr.	12,41 ± 2,07	> 500	7,88 ± 1,26	> 500
<i>Cortinarius praestans</i> Cordier	7,90 ± 1,72	> 500	19,70 ± 2,12	> 500
<i>Galerina marginata</i> (Batsch)K.	8,36 ± 0	> 500	14,74 ± 1,12	> 500
<i>Geastrum rufescens</i> Pers.	21,65 ± 2,38	> 500	12,56 ± 2,51	> 500
<i>Hygrophorus capreolarius</i> Kalchbr.	-	> 500	7,88 ± 1,26	> 500
<i>Hygrophorus chrysodon</i> (Batsch) Fr.	-	> 500	7,88 ± 2,12	> 500
<i>Lactarius subdulcis</i> (Pers.) Gray	-	> 500	18,68 ± 1,71	> 500
<i>Leotia lubrica</i> (Scop.) Pers.	25,52 ± 2,46	> 500	21,18 ± 0,92	> 500
<i>Limacella guttata</i> (Pers.) Konrad&Maubl.	-	> 500	6,16 ± 2,06	> 500
<i>Mutinus caninus</i> (Huds.) Fr.	10,36 ± 1,77	> 500	22,66 ± 2,44	> 500
<i>Pholiota aurivella</i> (Batsch) P. K.	14,55 ± 3,27	> 500	20,26 ± 0,65	> 500
<i>Pleurotus pulmonarius</i> Fr. (Qué.)	11,38 ± 1,72	> 500	20,94 ± 0,74	> 500
<i>Pseudoboletus parasiticus</i> (Bull.) Šutara	11,49 ± 0,86	> 500	12,56 ± 0,35	> 500
<i>Ramaria apiculata</i> (Fr.) Donk	33,04 ± 2,45	> 500	35,47 ± 0,35	> 500
<i>Russula amara</i> Kučera	-	> 500	9,85 ± 1,69	> 500
<i>Russula fragilis</i> Fr.	-	> 500	22,91 ± 2,29	> 500
<i>Russula undulata</i> Velen.	-	> 500	9,61 ± 1,39	> 500
<i>Russula virescens</i> (Schaeff.) Fr.	-	> 500	9,61 ± 1,39	> 500
<i>Sparassis nemecii</i> Pilát&Veselý	12,69 ± 0,62	> 500	31,32 ± 1,12	> 500
<i>Tricholoma lascivum</i> (Fr.)Gillet	17,59 ± 2,41	> 500	31,77 ± 2,54	> 500
<i>Tricholoma portentosum</i> (Fr.) Qué.	-	> 500	10,84 ± 1,39	> 500

- Extrakt nevykázal žádnou aktivitu

Tabulka 6.: Hodnoty inhibice AChE a BuChE pro standardy

Látka	AChE (IC <sub>50</sub> µg/ml)	BuChE (IC <sub>50</sub> µg/ml)
Galanthamin	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
Huperzin A	0,033 ± 0,001	> 1000
Eserin	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004

## 5.4 HODNOCENÍ ANTIRADIKÁLOVÉ AKTIVITY

Tabulka 7.: Hodnocení antiradikálové aktivity vůči DPPH a ABTS<sup>+</sup> radikálům

Taxon	DPPH		ABTS <sup>+</sup>
	% Q (1µg/ml)	EC <sub>50</sub> µg/ml	TE (mM)
<i>Agaricus lanipes</i> (Møller & Schäff.) Sing.	61,44	> 1000	0,127
<b><i>Agaricus macrosporus</i> (Møller &amp; Schäff.) Pilát</b>	<b>76,43</b>	<b>452</b>	<b>0,230</b>
<i>Aureoboletus gentilis</i> (Quél.) Pouzar	21,6	> 1000	0,108
<i>Boletus pinophilus</i> Pilát & Dermek	20,35	> 1000	0,088
<i>Cortinarius cotoneus</i> Fr.	10,87	> 1000	0,049
<i>Cortinarius praestans</i> Cordier	7,32	> 1000	0,042
<i>Galerina marginata</i> (Batsch) K.	-	-	0,044
<i>Geastrum rufescens</i> Pers.	20,63	> 1000	0,058
<i>Hygrophorus capreolarius</i> Kalchbr.	-	-	0,052
<i>Hygrophorus chrysodon</i> (Batsch) Fr.	-	-	0,028
<i>Lactarius subdulcis</i> (Pers.) Gray	-	-	0,038
<i>Leotia lubrica</i> (Scop.) Pers.	26,93	> 1000	0,093
<i>Limacella guttata</i> (Pers.) Konrad&Mauubl.	9,38	> 1000	0,021
<i>Mutinus caninus</i> (Huds.) Fr.	-	-	0,049
<i>Pholiota aurivella</i> (Batsch) P. K.	46,98	> 1000	0,135
<i>Pleurotus pulmonarius</i> Fr. (Quél.)	7,69	> 1000	0,073
<i>Pseudoboletus parasiticus</i> (Bull.) Šutara	47,33	> 1000	0,157
<i>Ramaria apiculata</i> (Fr.) Donk	27,06	> 1000	0,070
<i>Russula amara</i> Kučera	-	-	0,062
<i>Russula fragilis</i> Fr.	8,39	> 500	0,042
<i>Russula undulata</i> Velen.	-	-	0,041
<i>Russula virescens</i> (Schaeff.) Fr.	-	-	0,042
<i>Sparassis nemecii</i> Pilát&Veselý	13,21	> 1000	0,099
<i>Tricholoma lascivum</i> (Fr.) Gillet	34,47	> 1000	0,137
<i>Tricholoma portentosum</i> (Fr.) Quél.	6,19	> 1000	0,042

- Extrakt nevykázal žádnou aktivitu

Tabulka 8.: Antiradikálová aktivita standardu vůči DPPH a ABTS<sup>+</sup>

Standard	DPPH		ABTS <sup>+</sup>
	% Q (1µg/ml)	EC <sub>50</sub> µg/ml	TE (mM)
Kyselina askorbová	85,62	9	5,987

## 5.5. STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ FENOLICKÝCH LÁTEK

Tabulka 9.: Celkové množství fenolických látek v extraktech

Taxon	Fenolické látky průměr µgGA/mg ± SD	
<i>Agaricus lanipes</i> (Møller & Schäff.) Sing.	23,67	± 1,25
<i>Agaricus macrosporus</i> (Møller & Schäff.) Pilát	29,33	± 1,70
<i>Aureoboletus gentilis</i> (Quél.) Pouzar	15,33	± 0,47
<i>Boletus pinophilus</i> Pilát & Dermek	12,00	± 1,41
<i>Cortinarius cotoneus</i> Fr.	21,33	± 0,94
<i>Cortinarius praestans</i> Cordier	7,00	± 0,00
<i>Galerina marginata</i> (Batsch) K.	4,67	± 0,47
<i>Geastrum rufescens</i> Pers.	10,00	± 0,00
<i>Hygrophorus capreolarius</i> Kalchbr.	4,00	± 0,82
<i>Hygrophorus chrysodon</i> (Batsch) Fr.	1,67	± 0,47
<i>Lactarius subdulcis</i> (Pers.) Gray	3,33	± 0,47
<i>Leotia lubrica</i> (Scop.) Pers.	27,33	± 0,47
<i>Limacella guttata</i> (Pers.) Konrad&Maubl.	8,00	± 0,82
<i>Mutinus caninus</i> (Huds.) Fr.	18,67	± 0,47
<i>Pholiota aurivella</i> (Batsch) P. K.	28,67	± 0,94
<i>Pleurotus pulmonarius</i> Fr. (Quél.)	16,00	± 1,63
<i>Pseudoboletus parasiticus</i> (Bull.) Šutara	100,67	± 3,68
<i>Ramaria apiculata</i> (Fr.) Donk	9,67	± 0,94
<i>Russula amara</i> Kučera	15,33	± 0,47
<i>Russula fragilis</i> Fr.	5,33	± 0,47
<i>Russula undulata</i> Velen.	4,33	± 0,47
<i>Russula virescens</i> (Schaeff.) Fr.	4,33	± 0,47
<i>Sparassis nemecii</i> Pilát&Veselý	16,00	± 2,16
<i>Tricholoma lascivum</i> (Fr.)Gillet	28,00	± 1,63
<i>Tricholoma portentosum</i> (Fr.) Quél.	2,33	± 0,47

## 6. DISKUZE

Makromycety představují cenný zdroj látek s pestrou škálou možných biologických aktivit. Příprava etanolových extraktů zkoumaného materiálu probíhala šetrnými metodami za nízkých teplot, aby nedocházelo k rozkladu obsahových látek.

Výtěžnost se u jednotlivých druhů lišila. Největší vliv na to má patrně různý obsah vody v čerstvých plodnicích, který kolíše v rozmezí 70 – 95 % (Semerdžieva a Veselský, 1986).

Biologické aktivity většiny hub, kterým se věnuje pozornost v této práci, pravděpodobně testovány nebyly. Navíc, testování cholinesterázové inhibiční aktivity není velmi rozšířené a proto lze jen obtížně srovnávat naše výsledky s ostatními.

Vysoce aktivní extrakt druhu *Cortinarius infractus* (Pers. ex Fr.) Fr. byl testován na katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Vykazoval vysokou inhibiční aktivitu vůči lidské AChE srovnatelnou s galanthaminem ( $IC_{50} = 7,9 \mu\text{g/ml}$ ). Naproti tomu, aktivita vůči BuChE byla nízká (Macáková, 2011).

Žádný z testovaných extraktů v této práci nevykázal významnou schopnost inhibice AChE ani BuChE, a to včetně dvou zástupců rodu *Cortinarius* (*C. cotoneus* a *C. praestans*). Jak je známo z práce Filha et al. (2006), chemická povaha acetylcholinu a inhibitorů jeho esteráz naznačuje, že aktivní budou především dusíkaté sloučeniny, jakýmiž jsou například některé rostlinné alkaloidy, dnes představující základ terapie Alzheimerovy nemoci (AD)(galanthamin, huperzin A).

Alkaloidy se na chromatogramu testovaných extraktů nepodařilo dokázat, což by vysvětlovalo jednu z možných příčin jejich nízké aktivity.

Předpokládá se, že etiologie AD zahrnuje poškození neuronů plynoucí z oxidačního stresu. Jedna z nejčastěji pozorovaných a testovaných aktivit hub je právě antioxidační aktivita. Z několika možných metod se v této práci používalo měření s pomocí radikálů DPPH a ABTS<sup>+</sup> modifikováno pro sekvenční injekční analýzu (Polášek et al., 2004). Tyto metody byly vybrány pro svou nenáročnost, rychlost analýzy a vysokou reprodukovatelnost.

V zahraniční literatuře jsou rody jako *Agaricus*, *Russula* nebo *Pleurotus* na antioxidační aktivitu široce testované a představují perspektivní objekty dalšího zkoumání.

V této práci měl nejvyšší aktivitu ze všech sledovaných taxonů *Agaricus macrosporus*. V DPPH testu vykázal jeho extrakt  $EC_{50} 452 \mu\text{g/ml}$ , hodnota TEAC byla na úrovni 0,230 mM (standard kys. askorbová pro DPPH radikál  $EC_{50} = 9 \mu\text{g/ml}$ , TEAC 5,987 mM).



V extraktech jsme stanovovali fenolické látky, protože v literatuře najdeme údaje o pozitivní korelaci mezi jejich obsahem a antioxidační aktivitou (Cheung et al., 2003). Folin-Ciocalteuova metoda je pro tento účel jednou z nejpoužívanějších metod.

Z výsledků je patrné, že extrakty hub s nejvyšším naměřeným obsahem fenolických látek (*Pseudoboletus parasiticus*, *Agaricus macrosporus*, *Pholiota aurivella*) vykázali ve srovnání s ostatními extrakty lepší výsledky v antioxidačních testech. Extrakty, které nevykázali antioxidační aktivitu obsahovaly málo fenolických látek.

Je vhodné se ale zmínit o tom, že i přes vysoký obsah fenolických látek v houbě *Pseudoboletus parasiticus* ( $100,67 \pm 3,68 \mu\text{gGA}/\text{mg}$ ) tento extrakt nedosahoval antioxidační aktivity extraktu *Agaricus macrosporus*. Z toho lze usuzovat, že za vysokou antioxidační aktivitu makromycet mohou být zodpovědně i jiné metabolity, jako například polysacharidy, testované v jiných druzích (Sun et al., 2010).

## 7. ZÁVĚR

V našich zeměpisných šířkách má tradiční sběr hub velkou oblibu. Houby však mohou sloužit nejen jako zdroj nutrientů ve výživě lidí, ale mohou být i cenným zdrojem aktivních látek pro farmacii, z nichž řada nebyla testována. Především v asijských zemích je dokumentováno jejich léčebné využití a v západních zemích je o ně stále rostoucí zájem (Lindequist et al., 2005).

Pozornost dnešní medicíny neobchází studium tzv. civilizačních onemocnění, na jejichž etiologii se podílí oxidační stres. Tento stres je zapříčiněn působením vysoce reaktivních volných radikálů označovaných jako reaktivní formy kyslíku a dusíku (RFKD). Řada přírodních látek, především fenolického charakteru, má schopnost tyto radikály „vychytávat“ a tím potenciálně chránit organismy přicházející s nimi do styku.

Nemocí, u které se předpokládá podíl RFKD na jejím vzniku je Alzheimerova nemoc (AD). V dnešní době jsou nejčastěji předepisovanými léčivy u AD inhibitory cholinesteráz, z nichž většina pochází z přírodních zdrojů, nebo je na struktuře přírodních látek postavena. I látky z hub, jako je například *Cortinarius infractus*, jsou schopné lidské cholinesterázy inhibovat a tak přispět k studiu látek použitelných v terapii AD.

V rámci fytochemického výzkumu na katedře farmaceutické botaniky a ekologie jsme připravily extrakty 25 různých druhů makromycet a podrobily je testování biologických aktivit. Až na jednoho zástupce oddělení Ascomycota (*Leotia lubrica*) se jednalo o zástupce oddělení Basidiomycota.

Sledované etanolové extrakty ve srovnání se standardy nepůsobili vůči lidské AChE ani BuChE inhibičně. Bylo to způsobeno patrně absencí alkaloidů v těchto extraktech.

Nejvyšší naměřená antioxidační aktivita byla u extraktu houby *Agaricus macrosporus*. I když zdaleka nevykázal takovou aktivitu jako standardní kyselina askorbová, látky izolované z něj by mohly vykazovat vyšší hodnoty.

Měření obsahu fenolických látek mělo za cíl zjistit souvislost mezi naměřenými antioxidačními aktivitami a množstvím fenolických látek. Z výsledků vyplývá, že vyšší množství fenolických látek v extraktech má pozitivní vliv na míru antioxidační aktivity, avšak vysoké množství fenolických látek ještě nezaručuje vysokou schopnost antioxidační aktivity, na které se zřejmě podílí i jiné obsahové látky.

## 8. ABSTRAKT

Vyletelka, Juraj. Biologická aktivita makromycet I. Diplomová práce 2012. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra farmaceutické botaniky a ekologie. Vedoucí práce: Ing. Kateřina Macáková, PhD.

Klíčová slova: Ascomycota, Basidiomycota, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, alkaloidy, antioxidační aktivita, DPPH, ABTS, fenolické látky.

Makromycety jsou zdrojem biologicky aktivních látek stále ještě neúplně prozkoumaných. Je známé využití řady z nich pro léčebné účely a zájem o ně neustále roste. Tato práce se zabývá měření biologické aktivity 25 etanolových extraktů různých druhů hub. Byly podrobeny měření na acetylcholinesterázovou a butyrylcholinesterázovou inhibiční aktivitu Ellmanovou spektrofotometrickou metodou. Tenkovrstvá chromatografie měla za cíl detekovat alkaloidy. Práce se zabývá také stanovením antioxidační aktivity pomocí metod vychytávání DPPH a ABTS<sup>+</sup> radikálů modifikovaných pro sekvenční injekční analýzu. V extraktech byly stanoveny fenolické látky Folin-Ciocalteuovou metodou. Na základě výsledků uvedených experimentů bylo zjištěno, že extrakty nevykazovaly významnou inhibiční aktivitu vůči lidským cholinesterázám, nebyla zjištěna ani přítomnost alkaloidů. Extrakt z *Agaricus macrosporus* vykazoval nejvyšší antioxidační aktivitu (EC<sub>50</sub> 452 µg/ml v DPPH testu; 0,230 mM jako hodnota TEAC v ABTS<sup>+</sup> testu). Na základě porovnávání obsahu fenolických látek v jednotlivých extraktech lze soudit, že vyšší antioxidační aktivita může souviset s vyšším množstvím fenolických látek.

## **9. ABSTRACT**

Vyletelka, Juraj. Biological activity of macromycetes I. Master Thesis 2012. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology. Supervisor: Ing. Kateřina Macáková, PhD.

Key words: Ascomycota, Basidiomycota, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, alkaloids, antioxidant activity, DPPH, ABTS, total phenolics.

Macromycetes are the source of bioactive substances that still have not been completely researched. Many of them are used in treatment and they are the object of a growing interest. This work focuses on the measurement of biological activity of 25 ethanolic extracts prepared from various mushroom species. Ellman's spectrophotometric method was used to determine the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities. The aim of the thin layer chromatography was to detect alkaloids. This work also deals with the determination of antioxidant activity by DPPH and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging assays modified for use with sequential injection analysis. The content of total phenolic compounds in extracts was determined using the Folin-Ciocalteu method. Following the results of the presented methods, one may state that the extracts did not exhibit any significant inhibitory activity towards human cholinesterases. Presence of alkaloids was not detected. The extract of *Agaricus macrosporus* showed the highest antioxidant activity (EC<sub>50</sub> 452 µg/ml in DPPH assay; 0,230 mM as for TEAC value in ABTS<sup>+</sup> assay). Based upon the observation of the total phenolics content in each extract, we reached the conclusion that the higher antioxidant activity can correlate with the higher content of total phenolic compounds.

## 10. LITERATURA

Ames B.N., Cathcart R., Schiviers E., Hochstein P. (1981) Uric acid provides antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused ageing and cancer: A hypothesis. *Proceedings of National Academy of Sciences (USA)*, 78, 6858-6862. Převzato z Ďuračková, 1998.

Antonín V., Hagara L., Baier J. (2006) *Velký atlas hub*. Ottovo nakladatelství, s. 27, 72, 191, 338, 342, 376, 377, 338, 399, ISBN: 80-7360-333-0.

Attieh Z.K., Mukhopadhyay C.K., Seshadri V. et al. (1999) Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 1116-1123. Převzato z Štípek et al., 2000.

Bajgar J. (1972) Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské Zdravotnické Listy*, 41(2), 78-80.

Barros L., Falcão S., Baptista P., Freire C., Vilas-Boas M., Ferreira Isabel C.F.R. (2008) Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*, 111(1), 61-66.

Bendich A, Machlin L.J., Scandura O., Burton G.W., Wayner D.D.M. (1986) The antioxidant role of Vitamine C. *Free Radical Biology & Medicine*, 2, 419-444. Převzato z Ďuračková, 1998.

Borchers Andrea T., Stern Judith S., Robert M. Hackman Robert M., Keen Carl L., Gerschwin M. Eric (1999) Mushrooms, tumors, and immunity. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 221, 281-293.

Bredt D.S., Snyder S.H. (1992) Nitric oxide: A novel neuronal messenger. *Neuron*, 8, č. 1-20, s. 8-11. Převzato z Ďuračková, 1998.

Butterfield D.A., Castegna A., Lauderback C.M., Drake J. (2002) Evidence that amyloid-beta-peptide induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging*, 23, 655-664. Převzato z Valko M., Mazúr M., 2008.

Calvo Ana M., Wilson Richard A., Bok Jin Woo, Keller Nancy P. (2002) Relationship Between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447.

Cao G., Sofic E., Prior R.L. (1994) Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 749-760. Převzato z Ďuračková, 1998.

Chang S.T., Miles P.G. (1992) Mushrooms biology – a new discipline. *Mycologist*, 6, 64–65.

Chen X. H., Zhou H. B., Qiu G. Z.: (2010) Chemical composition and antioxidant activity of two edible mycorrhizal fungi from South China. *Journal of Chemistry*, 22 (9), 6867-6878. Abstrakt databáze CAPLUS.

Cheung L.M., Cheung Peter C.K., Ooi Vincent E.C. (2003) Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81, 249–255.

Czapski G., Goldstein S. (1995) The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach. *Free Radical Biology & Medicine*, 19(6),785-794. Převzato z Ďuračková, 1998.

- Deacon, J.W. (2005) *Fungal Biology 4th Edition*. Blackwell Publishing, s. 1-6, ISBN-10: 1-4051-3066-0.
- Dermek A. (1976) *Huby lesov, polí a lúk*. Osveta, Martin, s. 186, 220, 260, 292, 326, 364, 380, 390.
- Dore C.M.G.P., Azevedo T.C.G., de Souza M.C.R., Rego L.A., de Dantas J.C.M., Silva F.R.F., Rocha H.A.O., Baseia I.G., Leite E.L. (2007) Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of beta-glucan-rich extract from *Geastrum saecatum* mushroom. *International Immunopharmacology*, 7(9), 1160-1169. Abstrakt databáze Web of Knowledge.
- Duchemin Thierry (1992), internetová databáze:  
<http://www.mycodb.fr/fiche.php?genre=Agaricus&espece=lanipes&numphoto=2&source=list&filter=&numfiche=38>, čerpáno 15.1.2012.
- Dudnik L.B., Khrapova N.G. (1998) Characterization of bilirubin inhibitory properties in free radical oxidaton reactions. *Membrane and Cell Biology*, 12, 223-240. Převzato z Štípek et al., 2000.
- Ďuračková Z. (1998) *Volné radikály a antioxidanty v medicíne (I)*. Slovak academic press, Bratislava, s. 11, 12, 15-19, 26-30, 31-33, 43, 44, 43-65, 173, 174, 199, 200, 205-209, 224, 227, 233, 235, 241, 250-253, ISBN: 80-88908-11-6.
- Ďuračková Z., Bergendi L., Čársky J. et al. (1999) *Volné radikály a antioxidanty v medicíne (II)(Význam volných radikálov v etiológii niektorých ochorení)*. Slovak academic press, Bratislava, s. 12, ISBN: 80-88908-46-9.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Ferenčík M, Štvrtinová V., Kačáni L. (1994) Oxid dusnatý – mediátor imunitného, kardiovaskulárneho a nervového systému. *Forum Immunol*, 2( 2), 128-135. Převzato z Ďuračková, 1998.
- Ferreira Isabel C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M., Barros L. (2007) Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100, 1511–1516.
- Filho J.M.B., Medeiros K.C.P., Diniz Margareth de Fátima F.M., Batista L.M., Athayde-Filho P.F., Silva M.S., Da-Cunha E.V.L., Almeida J.R.G.S., Quintans-Júnior L.J. (2006) Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(2), 258-285.
- Fox Ellen M., Howlett Barbara J. (2008) Secondary metabolism: regulation and role in fungal metabolism. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 481-487.
- Ghfourifar P., Cadenas E. (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26,190-195. Převzato podle Valko M., Mazúr M., 2008.
- Gilardoni G., Clericuzio M., Tosi S., Zanoni G., Vidari G. (2007) Antifungal acylcyclopentenediones from fruiting bodies of *Hygrophorus chrysodon*. *Journal of Natural Products* 70(1), 137-139. Abstrakt databáze MEDLINE.
- Greve H., Mohamed I.E., Pontius A., Kehraus S., Gross H., König G.M. (2010) Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. *Phytochemistry Reviews*, 9, 537–545.
- Gursoy N., Sarikurkcü C., Tepe B., Solak M.H. (2010) Evaluation of Antioxidant Activities of 3 Edible Mushrooms: *Ramaria flava* (Schaeff.: Fr.) Quel., *Rhizopogon roseolus* (Corda) TM Fries., and *Russula delica* Fr. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 691-696. Abstrakt databáze Web of Knowledge.

Gutteridge J.M.C., Smith A. (1988) Antioxidant protection induced by haemopexin of radical damage to DNA. *Biochemical Journal*, 218, 983-985. Převzato z Ďuračková, 1998.

Hagara L. (1998) *Atlas hub*. Neografia, Martin, s. 106, 122, 186, 194, 260, 322, 332, 384, 444, 452, ISBN: 80-88892-09-0.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989) *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press, 335. Převzato z Ďuračková, 1998.

Horová Tamara (2010), internetová databáze:  
<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id128776/?taxonid=60803>, čerpáno 15.1.2012.

Hrdina Václav (2010), internetová databáze:  
<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id131457/?taxonid=60023>, čerpáno 15.1.2012.

Hrdina V., Hrdina R., Jahodář L., Martinec Z., Měrka V. (2004) *Přírodní toxiny a jedy*. Galén, Praha, s.128.

Jagadish L.K., Krishnan V.V., Shenbhagaraman R., Kaviyarasan V. (2009) Comparative study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J. E.Lange) Imbach before and after boiling. *African Journal of Biotechnology*, 8(4), 654-661.

Janeš D., Kreft S., Jurc M., Seme K., Štrukelj B. (2007) Antibacterial activity in higher fungi (mushrooms) and endophytic fungi from Slovenia. *Pharmaceutical Biology*, 45(9), 700-706.

Kim H.S., Kim J.Y., Ryu H.S., Park H.G., Kim Y.O., Kang J.S., Kim H.M., Hong J.T., Kim Y., Han S.B. (2010) Induction of dendritic cell maturation by beta-glucan isolated from *Sparassis crispa*. *International Immunopharmacology*, 10(10), 1284-1294.

Kimáková T., Krištůfek P., Bernadič M. (2011) Problematika voľných radikálov, oxidačného stresu a antioxidantov vo vzťahu k neinfekčným ochoreniam. *Monitor Medicíny SLS*, 3-4, s. 13-16.

Klán J. (1989) *Co víme o houbách*. SPN, Praha, s. 83, 100, 107, 108, 110,111,113,181, 188, 208, 250, ISBN: 80-04-21143-7.

Krejčík Stanislav (2005), internetová databáze:  
<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id63990/?taxonid=317577>, čerpáno 15.12.2012.

Kubička J., Erhart J., Erhart M. (1980) *Jedovaté houby*. Avicenum, Praha, s. 126.

Lincová D., Farghali H. et al. (2007) Základní a aplikovaná farmakologie. Praha, Galén, s. 144-146, 334-336, ISBN: 978-80-7262-373-0.

Lindequist U., Niedermeyer T. H. J. and Jülich, W.-D. (2005) The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 2(3), 285-99.

Liu J.-K. (2007) Secondary metabolites from higher fungi in China and their biological activity. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 1(2), 94-103.

Macáková K. (2011) Biological activity of selected taxons of mushrooms from divisions Ascomycota and Basidiomycota. Hradec Králové. Dizertační práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Vedoucí dizertační práce: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

McCord J.M., Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 224(22), 6049-6055. Převzato z Ďuračková, 1998.

- Meneghini R. (1997) Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 23(5), 783-792. Převzato z Ďuračková, 1998.
- Nasim G., Ali M., Shabbir A. (2008) A study of genus *Ramaria* from Ayubia National Park, Pakistan. *Mycopath*, 6(1&2), 43-46.
- Oury T.D., Day B.J., Crapo J.D. (1996) Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 957-965. Převzato z Ďuračková, 1998.
- Patyar S., Prakash A., Medhi B. (2011) Dual inhibition: a novel promising pharmacological approach for different disease conditions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 459-471.
- Pecháň I. (1995) Kyselina močová jako významný antioxidačný metabolit. *Klinická biochemie a metabolismus*, 3, 207-210. Převzato z Štípek et al., 2000.
- Pláteník J. (2009) Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi*, 11(1), 30-33.
- Pokorný J. (2007) Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 629–642.
- Polášek M., Skála P., Opletal L., Jahodář L. (2004) Rapid automated assay of anti-oxidant / radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 754-758.
- Požiz Jindřich (2011), internetová databáze:  
<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id166542/?taxonid=168986>, čerpáno 15.1.2012.
- Prescrire International (2008) Drugs for Alzheimer's disease lower ratings from French government agency. *Prescrire International*, 17(95), 130.
- Racek J. (2003) *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Praha, Galén, s 90.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Ribeiro B., Lopes R., Andrade Paula.B., Seabra Rosa M., Gonçalves Rui F., Baptista P., Quelhas I., Valentão P. (2008) Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chemistry*, 110, 47–56
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933-956. Převzato z Ďuračková 1998.
- Rock Ch.L., Jacob R.A., Bowen P.E. (1996) Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 96(7), 693-702. Převzato z Ďuračková, 1998.
- Rop O., Mlcek J., Jurikova T. (2009) Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition reviews*, 67(11), 624-631. Abstrakt databáze Willey Online Library.
- Scalbert A., Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130(8), 2073-2085.



- Semerdzieva M., Veselský J. (1986) *Léčivé houby dříve a nyní*. Academia, Praha, s. 34, 35.
- Shindo Kazutoshi, Koike Yukiko, Maruyama Mizuki (2007) Antimicrobial activities of bisnoryangonin contained in *Pholiota aurivella*. *Nippon Kasei Gakkaishi*, 58(9), 563-568. Abstrakt databáze CAPLUS.
- Singleton V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sun Y.-X., Liu J.-Ch., Yang X.-D., Kennedy J.F. (2010) Purification, structural analysis and hydroxyl radical-scavenging capacity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Russula virescens*. *Process Biochemistry*, 45, 874–879.
- Sun Z., He Y., Liang Z., Zhou W., Niu T. (2009) Sulfation of (1-3)- $\beta$ -D-glucan from the fruiting bodies of *Russula virescens* and antitumor activities of the modifiers. *Carbohydrate Polymers*, 77, 628–633.
- Svrček M., Vančura B. (1987) *Huby. Příroda*, Bratislava, s. 70, 129, 156, 258, 268.
- Štípek S. et al. (2000) *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada Publishing, Praha, s. 21, 25, 27, 54, 55, 59, 64, 197, 198, 200, ISBN: 80-7169-704-4.
- Thekkuttuparambil A. Ajith, Kainoor K. Janardhanan (2007) Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40(3), 157-162.
- Valko M., Mazúr M. (2008) *Free radicals and human disease*. Slovenská technická univerzita v Bratislave.
- Van Acker S.A.B.E, van den Berg D.-J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J.F., Bast A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(3), 331-342. Převzato z Ďuračková, 1998.
- Veselý R., Kotlaba F., Pouzar Z. (1972) *Přehled československých hub – Úvod do studia našich hub*. Academia, Praha, s. 31, 33, 373.
- Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q. (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 4-19.
- Zhong J.-J., Xiao J.-H. (2009) Secondary metabolites from higher fungi: Discovery, bioactivity, and bioproduction. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 113, 79-150.
- Žigová E. (2011) Alzheimerova choroba a jej liečba. *Medikom*, 1(3), 18-21.