

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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Biologická aktivita makromycet - C

Biological Activity of Macromycetes - C



Vedoucí rigorózní práce: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Hradec Králové 2011

Mgr. Jana Baroňová

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení mé rigorózní práce, Ing. Kateřině Macákové za cenné rady a připomínky k teoretické i experimentální části práce a za pomoc při měření experimentální části práce. Rovněž děkuji všem pracovníkům Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření dobrých pracovních podmínek a za umožnění využití laboratorních pomůcek a přístrojů, bez kterých by se experimentální část rigorózní práce nemohla uskutečnit.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV/2011/263002.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Seznam použitých zkratk:

ABTS - 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

AChE - acetylcholinesteráza

BHA - 2(3)-terc-butyl-4-hydroxyanizol

BHT - 3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluen

BuChE - butyrylcholinesteráza

CAT - kataláza

CNS - centrální nervová soustava

CT - computed tomography

DNA - deoxyribonukleová kyselina

DTNB - 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

EEG - elektroencefalogram

EKG - elektrokardiogram

F-C činidlo - Folin-Ciocalteu činidlo

GPx - glutathionperoxidáza

GSH - glutathion

HIV - human immunodeficiency virus

LDL - low density lipoprotein

MMSE - Mini-Mental State Examination

MPG - mercaptopropionylglycin

MR - magnetická rezonance

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

NMDA - N-metyl-D-aspartát

PAF - platelet activating factor

RNA - ribonukleová kyselina

RNS - reactive nitrogen species

ROS - reactive oxygen species

SOD - superoxiddismutáza

TLC - tenkovrstvá chromatografie

VR - volný radikál

XOD - xantinoxidoreduktáza

OBSAH

1.	ÚVOD	7
2.	CÍL PRÁCE.....	11
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH TAXONŮ	12
3.1.1	Systematické zařazení jednotlivých taxonů a jejich morfologická charakteristika.....	12
3.2	CHEMICKÁ SKLADBA HUB	21
3.2.1	Primární metabolity.....	22
3.2.1.1	Sacharidy.....	22
3.2.1.2	Bílkoviny.....	23
3.2.1.3	Lipidy	23
3.2.1.4	Nukleové kyseliny.....	24
3.2.1.5	Enzymy	24
3.2.2	Sekundární metabolity	24
3.2.2.1	Pigmenty	25
3.2.2.2	Vůně, pachy a chuťové látky hub	25
3.2.3	Minerální látky a voda	26
3.2.4	Vitaminy.....	26
3.2.5	Látky izolované z testovaných rodů hub.....	27
3.3	HOUBOVÉ TOXINY A OTRAVY HOUBAMI	31
3.3.1	Toxiny pavučinců.....	32
3.3.2	Toxiny neznámé povahy	32
3.4	BIOLOGICKÁ AKTIVITA HUB	33
3.4.1	Antimikrobiální aktivita hub rodu Cortinarius.....	33
3.4.2	Antikancerogenní aktivita hub rodu Cortinarius.....	33
3.4.3	Acetylcholinesterázová a butyrylcholinesterázová inhibiční aktivita hub rodu Cortinarius.....	34
3.4.4	Další aktivita hub rodu Cortinarius.....	34
3.5	ALZHEIMEROVA NEMOC A ROLE INHIBITORŮ ACETYLCHOLINESTERÁZY A BUTYRYLCHOLINESTERÁZY	34
3.5.1	Epidemiologie	35
3.5.2	Etiopatogeneze a patofyziologie	35
3.5.3	Klinický obraz.....	36
3.5.4	Diagnóza	37
3.5.5	Terapie.....	38
3.5.5.1	Inhibitory cholinesteráz.....	38
3.5.5.2	Inhibitory NMDA receptorů	39
3.5.5.3	Další možnosti terapie.....	40
3.6	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	41
3.6.1	Volné radikály	41
3.6.2	Reaktivní formy kyslíku a dusíku	42
3.6.3	Fyziologické působení radikálů	42
3.6.4	Oxidační stres.....	43
3.6.5	Patologické působení radikálů	44
3.6.6	Antioxidační ochrana organismu	45
3.6.7	Antioxidační terapie.....	47
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	49

4.1	POTŘEBY	49
4.1.1	Rozpouštědla	49
4.1.2	Chemikálie	49
4.1.3	Přístrojové vybavení.....	50
4.1.4	Detekční činidlo	50
4.1.5	Vyvíjecí soustava pro tenkovrstvou chromatografii	50
4.1.6	Chromatografický adsorbent.....	51
4.1.7	Testované druhy hub	51
4.2	METODY.....	52
4.2.1	Příprava extraktů	52
4.2.2	Důkaz obsahu alkaloidů barevnou reakcí na TLC	52
4.2.3	Stanovení inhibiční aktivity houbových extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE	53
4.2.3.1	Materiál	53
4.2.3.2	Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity....	53
4.2.3.3	Podmínky měření	54
4.2.3.4	Příprava erythrocytárních pouzder.....	54
4.2.3.5	Postup práce	54
4.2.4	Stanovení antioxidační aktivity ABTS ⁺ testem s využitím SIA.....	55
4.2.4.1	Přístroj použitý pro stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS ⁺	57
4.2.4.2	Program.....	57
4.2.4.3	Podmínky měření	57
4.2.4.4	Postup práce	58
4.2.5	Stanovení celkového množství fenolických látek	58
4.2.5.1	Přístroj použitý pro stanovení celkového množství fenolických látek.....	59
4.2.5.2	Podmínky měření	59
4.2.5.3	Postup práce	59
5.	VÝSLEDKY	60
5.1	VYHODNOCENÍ REAKCÍ PRO DETEKCI NA ALKALOIDY	60
5.2	VÝSLEDKY STANOVENÍ INHIBIČNÍ AKTIVITY HOUBOVÝCH EXTRAKTŮ VŮČI ERYTHROCYTÁRNÍ AChE A SÉROVÉ BuChE	62
5.3	VYHODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY HOUBOVÝCH EXTRAKTŮ	63
5.4	VÝSLEDKY STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ FENOLICKÝCH LÁTEK	64
6.	DISKUZE.....	66
7.	ZÁVĚR	69
8.	LITERATURA.....	70
9.	ABSTRAKT.....	81
10.	ABSTRACT.....	83

1. ÚVOD

Houby tvoří rozmanitou skupinu organismů a mikroorganismů, která je hodnocena jako samostatná říše – říše hub (Fungi), nepatří mezi rostliny ani živočichy. Na rozdíl od rostlin neobsahují houby chlorofyl, nemají schopnost fotosyntézy, a proto získávají svoji výživu z rozkládající se organické hmoty nebo z živých rostlin a živočichů. Některé mohou mít hostitelské vztahy vzájemně prospěšné, jde o symbiotické houby. Například tzv. mykorrhizní houby proniknutím do kořenů živých stromů získávají přístup k uhlohydrátům. Tyto houby naopak opatřují pro dřeviny minerální látky. Dalším typem symbiózy je lichenismus. Jde o pevné soužití houby a zelené řasy nebo sinice. Vzniká komplexní organismus – lišejník. Někdy může být vztah parazitický. Parazitické houby čerpají výživu přímo z živého těla rostlin nebo živočichů tím, že svými vlákny pronikají do tkáně hostitele. Houby jako např. padlí a rzi, žijící jako parazité na živých rostlinách, rostlinu poškozují, ale nezabíjejí. V jiných případech parazitická houba svého hostitele zabíjí, ale sama přetrvává v jeho mrtvé organické hmotě a stává se saprofytem (Bielli, 2001; Keizer, 1998; Kohte, 2000; Læssøe, Del Conte, 2004; Svrček, 2002).

Houby lze rozdělit do čtyř oddělení. Oddělení Myxomycota (hlenky), Chytridiomycota (prvohouby), Oomycota (řasohouby) a Eumycota (vyšší houby) (Volf et al., 1988).

Vyšší houby se člení na čtyři třídy: zygomycety (Zygomycetes) – skupina výhradně mikroskopických hub, vřeckovýtrusné (Ascomycetes), stopkovýtrusné houby (Basidiomycetes) a houby tzv. nedokonalé (Deuteromycetes) (Kohte, 2000).

Ascomycetes jsou velmi rozmanitou třídou hub. Jsou charakteristické přítomností útvarů obsahujících výtrusy, tzv. vřecek (asci, jedn. č. ascus). Typické vřecko je válcovité a obvykle obsahuje osm výtrusů, které se uvolňují vrcholem vřecka. Tato skupina obsahuje jedlé houby, např. smrže a lanýže. Mnohé houby se vyznačují miskovitými nebo terčovitými plodnicemi, zatímco jiné mají lahvovitý vzhled. Čeledi, patřící do této třídy, se liší způsobem uvolňování výtrusů z vřecek (Læssøe, Del Conte, 2004).

Mezi Basidiomycetes patří množství vzájemně nepodobných druhů: lupenaté houby, pýchavky, rosolovky, houby s kyjovitými, korálovitými, konzolovitými i rozlitymi plodnicemi a houby s výtrusným rouškem ostnitým. Pod mikroskopem je však jejich příbuznost jasná. Vytvářejí své výtrusy na mikroskopických kyjovitých

útvarech zvaných bazidie (stopky), obvykle se čtyřmi výrůstky (sterigmaty), na vrcholcích s pohlavními výtrusy (Læssøe, Del Conte, 2004).

Houby viditelné pouhým okem se nazývají makromycety. Plodnici mají větší než 1 mm a rozmnožují se výtrusy, které vznikly na základě sexuálních pochodů.

Mikromycety jsou houby s plodnicí menší než 1 mm, rozmnožují se v asexuální fázi vývojového cyklu. Nepohlavní spory, konidie, se vytvářejí na povrchu nebo uvnitř konidiofor, což jsou specializované nosiče spor (Keizer, 1998).

Převážná část životních pochodů hub probíhá, na rozdíl od většiny živočichů a rostlin, skrytě. V půdě, ve dřevě nebo v jiném organickém substrátu se nachází vlastní tělo houby skládající se z vláken zvaných hyfy, které tvoří rozvětvenou pavučinu souborně zvanou podhoubí (mycelium). Podhoubí roste v substrátu a vstřebává živiny. Každá plodnice obsahuje tisíce výtrusů, které pokud dopadnou na vhodné místo, mohou vyklíčit a vytvořit nové podhoubí. K růstu a vyklíčení výtrusů jsou zapotřebí příznivé podmínky, především vlhké a větrné počasí, charakter půdy, chemické a minerální složení půdy, pH půdy a příznivá teplota ovzduší (Kohte, 2000; Kovář, 1999; Kubát et al., 1998).

V přírodě mají jak velké, tak mikroskopické houby významné a jinými organismy nezastupitelné postavení. Vedle podílu na rozkladné činnosti organických látek je v přírodě důležitá úloha velké skupiny symbiotických hub, ať již žijí v symbióze s cévnatými rostlinami (mykorrhiza), s řasami či sinicemi (lichenismus) nebo s živočichy (Klán, 1989; Kubát et al., 1998).

Houby hrají významnou roli v některých odvětvích potravinářského průmyslu. Některé druhy nižších i vyšších hub se používají k boji proti hmyzím škůdcům v polnohospodářství, sadařství a zahradnictví (Keizer, 1998; Svrček, 2002).

Plodnice jedlých druhů velkých hub, makromycetů, se značným obsahem bílkovin jsou významnou součástí lidské výživy. Jedlé houby lze v kuchyni používat čerstvé, sušené nebo i konzervované. Mají malou energetickou hodnotu, zato vysoký podíl minerálních látek a vitamínů. Aromatické látky obsažené v houbách podporují vyměšování trávicích šťáv. Část nestravitelných bílkovin a polysacharidů působí příznivě na peristaltiku střev. Houby jsou rovněž součástí redukčních diet, protože vyvolávají pocit nasycení (Keizer, 1998; Klán, 1999; Kovář, 1999; Mikulcová, 2006).

Negativní vliv hub se projevuje napadáním živých organismů, rostlin, živočichů i člověka samotného. Houby parazitující na lidském nebo zvířecím těle vyvolávají

mykózy. Také výtrusy některých hyfomycetů mohou příležitostně pronikat do dýchacích cest a vyvolat zdravotní obtíže.

Mnohé druhy hub obsahují jak toxické látky způsobující akutní otravy, tak toxiny hromadící se v lidském těle při jejich opakovaném požití, které pak mohou narušit činnost především zažívacích orgánů (Svrček, 2002).

Houby se uplatňují také v medicíně. První zprávy o léčivých vlastnostech hub pocházejí ze starověké čínské a indické literatury. V Evropě se objevují první zprávy o léčení houbami u starořeckých filozofů a lékařů (Keizer, 1998).

Velký význam v moderní medicíně mají antibiotika, která jsou vyráběna od roku 1943. Jako první se na trhu objevil penicilin, účinný proti bakteriím. S léky vyráběnými z hub se můžeme setkat i v homeopatii. Podávání homeopatických houbových i jiných léků je pouze doplňkovou léčbou. Svůj význam mají v úzké oblasti dlouhotrvajících obtíží chronického a alergického původu (Kovář, 1999).

Mimo antibiotických účinků mají některé houby také antivirovou, antiparazitickou, cytotoxickou aktivitu. Rovněž existují druhy hub, které jsou schopné vychytávat volné radikály (Klán, 1989).

Reaktivní formy kyslíku a dusíku, jako je například superoxid, hydroxylový radikál, oxid dusnatý a další, se v lidském těle uplatňují jak při fyziologických, tak při patologických procesech. Při oxidačním stresu, kdy dochází k nerovnováze mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a dusíku a antioxidačními obrannými mechanismy, mohou být narušeny různé orgánové systémy. Poškozen může být nervový systém, srdce a krevní oběh, ledviny, játra, slinivka břišní, štítná žláza a další. Radikálové reakce se podílí na rozvoji nemocí jako je mozková mrtvice, diabetes mellitus, peptický vřed, Crohnova nemoc, pankreatitida, poškození zraku, záněty, onemocnění ledvin, nádorová onemocnění, skleróza multiplex, Parkinsonova nemoc a také Alzheimerova nemoc (Mandelker, 2009; Zima et al., 1996).

Alzheimerova nemoc je neurodegenerativní onemocnění projevující se poruchami paměti, chování a postižením běžných každodenních činností. Dochází ke ztrátě cholinergních neuronů a snížení hladin acetylcholinu, a tímto k poškození kognitivních funkcí. V léčbě Alzheimerovy nemoci se nejvíce používají inhibitory cholinesteráz – galantamin, donepezil a rivastigmin, dále inhibitory NMDA (N-metyl-D-aspartátovýh) receptorů – memantin. Scavengery volných radikálů se při léčbě Alzheimerovy nemoci používají pouze doplňkově. Předmětem zájmu řady experimentů jsou nové látky přírodního původu, které by bylo možné využít v léčbě

Alzheimerovy nemoci. Mezi zdroje těchto účinných látek patří také houby (Bednařík et al., 2010; Jedlička et al., 2005; Jiráček, 2009).

2. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce je kvantifikace antioxidační aktivity vodně-ethanolických extraktů hub rodu *Cortinarius* (metoda vychytávání ABTS^{•+} s využitím metody sekvenční injekční analýzy (SIA)).

Dále je cílem práce kvantifikace inhibiční aktivity vodně-ethanolických houbových extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody.

Poslední část rigorózní práce je zaměřena na kvantifikaci celkového množství fenolických látek v houbových extraktech s využitím Folin-Ciocalteu činidla a zjištění přítomnosti alkaloidů v extraktech pomocí tenkovrstvé chromatografie.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH TAXONŮ

Sledované taxony systematicky řadíme do čeledi Cortinariaceae (pavučincovité), řádu Agaricales (lupenaté), které patří do třídy Basidiomycetes (stopkovýtrusné), oddělení Eumycota (pravé houby), říše Fungi (houby) (Bielli, 2001).

3.1.1 Systematické zařazení jednotlivých taxonů a jejich morfologická charakteristika

Agaricales – lupenaté houby

Houby řádu Agaricales mají plodnice šťavnaté nebo pevně masité, většinou rozlišené v klobouk (pileus) a třen (stipes), který může být někdy redukován, takže plodnice přisedá přímo k substrátu. Hymenofor je lupenitý, výjimečně jsou lupeny nízké, žilkovité nebo žebrované, případně je hymenofor zcela hladký. Výtrusný prach je různě zbarvený, výtrusy jsou bezbarvé nebo zbarvené, někdy dextrinoidní nebo amyloidní, hladké nebo ornamentované. Plodnice bývá v mládí zahalena závojem (velum partiale) nebo obalem (velum universale). Obal zanechává na jejím povrchu různé zbytky (útržky na klobouku, pochvu naspodu třeně apod.). Závoj se po rozvinutí klobouku roztrhne a na třeni zůstane prstenec (annulus). Řád obsahuje asi 10 000 druhů. Jedná se o druhy jedlé i jedovaté, většinou saprofytické (Svrček, 2002; Volf et al., 1988).

Cortinariaceae – pavučincovité

Jedná se o druhou nejpočetnější čeleď z hub lupenatých. Zahrnuje houby různých velikostí a tvarů a obsahuje velice obtížně určovatelné rody. Do této čeledi patří jak houby vytvářející mykorrhizní vazby, např. vláknice (*Inocybe*), slzivky (*Hebeloma*), sluky (*Rozies*) a pavučince (*Cortinarius*), tak i bez nich, např. čepičatky (*Galerina*) a šupinovky (*Gymnopilus*). Třen pavučincovitých bývá většinou tenký a válcovitý, mimo zástupců rodu trepkovitka (*Crepidotus*), u kterých lopatkovitý klobouk přisedá k substrátu. Lupeny bývají sbíhavé nebo volné. Společným znakem pavučincovitých

je zbarvení výtrusného prachu, který mívá nejrůznější odstíny hnědé nebo rezavé (nejčastěji je hlívově nebo rezavě hnědý), jen výjimečně je bílý. Výtrusy jsou často ornamentované, bradavičnaté, většinou bez zřetelného klíčního poru. Čeleď zahrnuje 16 rodů. K nejdůležitějším rodům patří pavučinec (*Cortinarius*) vláknice (*Inocybe*), kržatka (*Naucoria*) a šupinovka (*Pholiota*). Rod pavučinec (*Cortinarius*) je poměrně dobře rozeznatelný. Mladé houby mají mezi kloboukem a třeněm silně vyvinutý pavučincovitý závoj (velum partiale). Tento závoj se při růstu plodnic pozvolna rozpouští a zanechává na třeni pouze slabě lepkavý prstencovitý proužek. Houby z čeledi pavučincovitých jsou většinou nejedlé nebo jedovaté (Bielli, 2001; Læssøe, Del Conte, 2004; Svrček, 2002).

Rod: *Cortinarius* (pavučinec)

Druh: *Cortinarius alboviolaceus* (Pers.:Fr.) Fr. (pavučinec bělofialový)

Syn: *Inoloma alboviolaceum* (Pers.: Fr.) Wünsche



Obrázek 1: *Cortinarius alboviolaceus* (Pers.:Fr.) Fr. (Opletal, 2005a)

Klobouk 3-8 cm široký, nízce vyklenutý, vyhrblý, poměrně tence masitý, bělo fialový, hedvábitě, jemně vláknitý, suchý, hladký. Lupeny zoubkem přirostlé, nehusté, šedě fialové nebo šedě namodralé, pak skořicově hnědé. Třeň válcovitý, 5-12 cm dlouhý, 8-15 mm tlustý, dolů kyjovitý, na bázi zakroucený, bělo fialový,

v polovině délky s úzkým vláknitým prstencem a pod ním s několika přerušovanými vláknitými pásky. Dužnina bělo fialová, bez zvláštního pachu a chuti. Výtrusný prach je rezavě hnědý. Roste v jehličnatých i listnatých lesích, hlavně v dubinách. Tvoří mykorrhizu s listnáči i jehličnany, často na kyselých půdách. Jedlý. Je nutno dát pozor na záměnu za p. malachitový (*C. malachius*) s šupinatým kloboukem a rostoucím v jehličnatých lesích a za p. kafrový (*C. camphoratus*) a p. kozlí (*C. traganus*), rovněž rostoucími pod jehličnany, ale s výrazným odlišným pachem (Antonín, Kotlaba, 2003; Læssøe, Del Conte, 2004; Svrček, 2002).

Druh: *Cortinarius anomalus* (Fr. ex Fr.) Fr. (pavučinec odchylný)



Obrázek 2: *Cortinarius anomalus* (Fr. ex Fr.) Fr. (Opletal, 2005b)

Klobouk nepravidelně sklenutý, průměr 5-8 cm, hedvábitě vláknitý, hebký, se suchým povrchem, šedě matný až žluto hnědý, při okrajích světle stříbřitě modrý lesk. Lupeny husté, v mládí namodralé, poté fialové až fialově hnědé se světlým ostřím. Třeň je 7-10 cm dlouhý a 10-15 mm tlustý, fialový, nad prstencovou zónou modře zbarvený a pod ní světle bělavě okrový se stříbřítými pásy, s bází krytou fialovým myceliem. Dužnina je bledě fialová. Vůně nenápadná. Barva výtrusného prachu je rezavě hnědá. Dost hojný v listnatých a smíšených lesích, v parcích a alejích na chudých písčitých i jílovitých půdách. Nejedlý (Evans, Kibby, 2007; Keizer, 2005)

Druh: *Cortinarius armillatus* (Fr.:Fr.) Fr. (pavučinec náramkovitý)



Obrázek 3: *Cortinarius armillatus* (Fr.:Fr.) Fr. (Opletal, 2005c)

Klobouk 5-10 cm široký, zvoncovitý, pak široce vyklenutý, uprostřed tupě vyhrblý, na okraji dolů zlomený a spojený s třeněm světle červeným závojem, celý cihlově až hnědě červený, suchý, jemně vláknitý. Lupeny vykrojené, zoubkem přirostlé, prořídle, nažloutlé, pak skořicově rezavé. Třeň 10-15 cm dlouhý, válcovitý, robustní, dole až na 3 cm kyjovitě až hlízovitě rozšířený, světle hnědý, obvykle s několika živě cihlově červenými, přerušovanými pásy závoje. Dužnina nahnědlá, bez zvláštního pachu a chuti. Výtrusný prach je rezavě hnědý. Roste ve skupinách v mechu a listí pod břízami ve vlhčích jehličnatých lesích a bažinatých místech na kyselých půdách. Vytváří mykorrhizu s břízou a možná i s dalšími stromy. Široce rozšířený a hojný v celém severním mírném pásmu. Nejedlý (Læssøe, Del Conte, 2004; Svrček, 2002).

Druh: *Cortinarius bolaris* (Pers.:Fr.) Fr. (pavučinec červenošupinný)



Obrázek 4: *Cortinarius bolaris* (Pers.:Fr.) Fr. (Opletal, 2005d)

Klobouk 2-6 cm široký, sklenutý, uprostřed vyhrblý, na bělavém nebo načervenalém podkladě zdobený přitisklými, rumělkově nebo vínově červenými vločkovitými šupinkami, okraj v mládí spojený bílou pavučinkou s třeněm, oschlý, vybledající, suchý. Lupeny mírně husté, vykrojeně přirostlé, světle hnědé. Třeň 5-8 cm dlouhý a 5-12 mm široký, válcovitý, nahoře bílý, ojíněně vločkatý, dole rumělkově červeně vláknitý. Dužnina bílá, pomačkáním trochu žloutnoucí, bez zvláštního pachu, nahořklé chuti. Výtrusný prach je rezavě žlutý. Roste vzácně v listnatých lesích na kyselějších půdách. Vytváří mykorrhizu s listnáči, především duby a břízami. Nejedlý (Læssøe, Del Conte, 2004; Svrček, 2002).

Druh: *Cortinarius infractus* (Pers. ex Fr.) Fr. (pavučinec olivový)



Obrázek 5: *Cortinarius infractus* (Pers. ex Fr.) Fr. (Junek, 2005a)

Klobouk 5-8 cm široký, obvykle nízce vyklenutý, slizký, s podvinutým okrajem, olivově šedý až hnědo zelený, na středu vybledávající. Lupeny jsou středně husté, k třeni připojené, olivově rezavé, později olivově hnědé. Třeň 5-10 cm dlouhý a 1-1,5 cm široký, válcovitý, s kyjovitou bází, bělavý,

stříbřitě šedý až olivově hnědavý, s pomíjivou olivově hnědou pavučinkou. Dužnina bývá olivově šedá, mramorovaná, hořké chuti. Výtrusný prach je rezavě hnědý. Roste v listnatých a jehličnatých lesích. Je barevně proměnlivý s několika odrūdami. Nejedlý (Antonín, 2006; Erhartovi, 1995; Gminder, Böhning, 2009).

Druh: *Cortinarius malachus* Fr. (pavučínec malachitový)



Obrázek 6: *Cortinarius malachus* Fr. (Kibby, 2008)

je rezavě hnědá. Mykorrhizní s jehličnany. V Evropě se vyskytuje pouze místy, světové rozšíření není známo. Roste ve skupinách na jehličí a v mechu pod jehličnany. Nejedlý (Gminder, Böhning, 2009; Læssøe, Del Conte, 2004).

Klobouk 4-8 cm široký, vyklenutý, v mládí stříbřitě fialový, poté světle žluto hnědý, někdy s hrbolkem, výrazně šupinatý. Lupeny nejsou příliš husté, světle modro šedé až rumělkově hnědé. Třeň 5-12 cm dlouhý a 1-2 cm široký, válcovitý, dole kyjovitý, žluto hnědý. Dužnina bělavá, bez výrazného pachu a chuti. Barva výtrusného prachu

Druh: *Cortinarius mucosus* (Bull. ex St. Am.) Kickx (pavučínec slizký)

Syn: *Myxacium mucosus* (sliznatka slizká)



Obrázek 7: *Cortinarius mucosus* (Bull. ex St. Am.) Kickx (Opletal, 2005e)

zubaté. Třeň válcovitý, stejně tlustý, jen na bázi krátce zúžený, 5-15 cm dlouhý a 1-2 cm široký, čistě bílý, slizký, se zbytkem závoje v podobě vyvýšeného slizovitého kroužku pod lupeny. Dužnina bělavá, bez zvláštního pachu a chuti. Barva výtrusného prachu je rezavě hnědá. Roste hojně v písčitých borech. Jedlý (Læssøe, Del Conte, 2004; Svrček, 2002).

Klobouk 5-12 cm široký, níže vyklenutý, pak rozložený, mírně vyhrblý, dost masitý, žluto hnědý, medově hnědý až kaštanově hnědý, za vlhka pokrytý tlustou vrstvou slizu, lesklý, hladký. Lupeny zoubkem přirostlé, nehmotné, světle hlínově hnědé, pak skořicově rezavé, na ostří

Druh: *Cortinarius multiformis* (Fr.) Fr. (pavučinec mnohotvárný)



Obrázek 8: *Cortinarius multiformis* (Fr.) Fr. (Jirásek, 2007)

Klobouk 4-10 cm široký, vyklentý až plochý, lepkavý, slámově žlutý, žluto hnědý až zlato žlutý, na středu s vločkami až plstnatými, bělavými zbytky vela. Lupeny jsou bělavé, později krémové, ve stáří rezavě hnědé, s jemně zubatým ostřím. Třeň 6-9 cm dlouhý a 1,5-3 cm široký, kyjovitý, na bázi někdy s odsedlou hlízou bělavý, naspodu

nažloutlý, ve stáří až okrově hnědý. Dužnina bledá, ve špičce třeně okrově žlutá, medové vůně. Výtrusný prach je rezavě hnědý. Roste v listnatých a jehličnatých lesích na vápnatých půdách. Jedlý (Antonín, 2006; Gminder, Böhning, 2009).

Druh: *Cortinarius pholideus* (Fr. ex Fr.) Fr. (pavučinec šupinonohý)



Obrázek 9: *Cortinarius pholideus* (Fr. ex Fr.) Fr. (Opletal, 2005f)

Klobouk je 5-10 cm široký, v mládí polokulovitě sklenutý, pak rozložený, s výrazným hrbolem, na šedo hnědém podkladu tmavě hnědě šupinkatý, naspodu s modravě fialovými, později skořicově zbarvenými lupeny a dolů mírně ztloustlým, brzy dutým, asi do dvou třetin tmavými šupinami pokrytým, 5-10 cm

dlouhým a 1-2 cm širokým třeněm, v horní třetině zprvu modravým. Dužnina je hnědavá a má slabou vůni po mandarinkách. Výtrusný prach je žlutě rezavý. Roste spíše nehojně až vzácně v listnatých, smíšených i jehličnatých lesích a na rašeliništích. Obvyklým mykorhizním partnerem je bříza, ale může být vázán i na jiné dřeviny. Jedlý (Antonín, Kotlaba, 2003; Læssøe, Del Conte, 2004).

Druh: *Cortinarius traganus* (Fr. ex Fr.) Fr. (pavučinec kozlí)



Obrázek 10: *Cortinarius traganus* (Fr. ex Fr.) Fr. (Opletal, 2005g)

Klobou 5-10 cm široký, vyklenutý, světle modravě fialový až okrový, který je směrem do středu tmavěji okrově hnědý. Lupeny jsou široké, jasně žlutě okrové, v dospělosti sytě rezavé. Kyjovitý třeň je světle modravě fialový až téměř bílý, v horní části krytý pavučinou.

Dužnina je masitá, hnědo oranžová,

mramorovaná a silně vonící po acetylenu nebo po zralých hruškách. Barva výtrusného prachu je rezavě hnědá. Roste jednotlivě nebo v malých trsech v listovém opadu listnatých nebo jehličnatých stromů, především na kyselých půdách, s oblibou mezi borůvkami. Nejedlý (Evans, Kibby, 2007; Gminder, Böhning, 2009).

Druh: *Cortinarius triumphans* Fr. (pavučinec zlatý)

Syn: *Phlegmatium triumphans* (pahříb vítězný)



Obrázek 11: *Cortinarius triumphans* Fr. (Opletal, 2005h)

Klobouk sklenutý až rozložený, průměr 5-14 cm, za vlhka slizký, lesklý, za sucha matný, okrově žlutý, zlato žlutý, citrónově žlutý až žluto hnědý. Lupeny bledé, bělavé, s modravým odstínem, pak smetanově nahnědlé až skořicově hnědé. Třeň 8-16 cm dlouhý a 1-3 cm široký, bělavý, okrově žlutavý až žlutý na vrcholu, s pomíjivými vláknitými i vlnatými prstenčitými zónami. Dužnina bělavá, nažloutlá, nahoře ve třeni i modravá. Chuť mírná. Vůně slabá. Barva výtrusného prachu je žluto hnědá. Roste roztroušeně pod břízami v listnatých

a smíšených lesích i mimo les na živinami bohatých půdách. Jedlý. Podobné jsou p. vřetenonohý (*C. saginus*), p. zlatožlutý (*C. sliduchus*) a p. mokvavě slizký (*C. olidus*) (Keizer, 2005; Læssøe, Del Conte, 2004).

Druh: *Cortinarius trivialis* Lange (pavučinec osikový)

Syn: *Myxacium trivialis* (sliznatka osiková)



Obrázek 12: *Cortinarius trivialis* Lange (Opletal, 2005ch)

Klobouk je 5-12 cm široký, zvoncovitý, pak rozložený, uprostřed s hrbolem, olivově žluto hnědý nebo okrově hnědý, za vlhka silně slizký, oschlý světle žlutý a lesklý. Lupeny vykrojené, zoubkem přirostlé, prořídle, zprvu světle fialové, pak hlínově hnědavé,

posléze rezavě hnědé. Třeň 4-14 cm dlouhý a 0,7-2 cm široký, válcovitý, dole zúžený, potažený slizem a pod ním světle modravý, rozpukaný v příčné, přerušované šupinovitě pásy. Dužnina bělavá nebo nažloutlá, ve vrcholu třeně namodralá, bez zvláštního pachu a chuti. Výtrusný prach je rezavě hnědý. Roste v jehličnatých i listnatých lesích. Hlavně pod osikami. Nejedlý (Keizer, 2005; Svrček, 2002).

Druh: *Cortinarius varius* (Schaeff.: Fr.) Fr. (pavučinec různý)



Obrázek 13: *Cortinarius varius* (Schaeff.: Fr.) Fr. (Jirásek, 2000)

Klobouk 5-12 cm široký, zprvu polokulovitý, pak nízce vyklenutý, vyhrblý, na okraji značně podvinutý, tlustě masitý, oranžově žlutý, žluto hnědý nebo rezavě liškově oranžový, za vlhka slizký, oschlý, lesklý, v mládí spojený s třeněm čistě bílým, hedvábite lesklým závojem. Lupeny

vykrojené, zoubkem přirostlé, nehusté, zprvu namodralé, později skořicově rezavé. Třeň válcovitý, 5-8 cm dlouhý a 1-3 cm široký, dolů zvolna kyjovitý, plný vláknitý

nebo vločkatý, bílý nebo s modravým nádechem, silný. Vlákna pavučinky nejprve spojují okraj klobouku se třeněm, později vytváří prstencovitou zónu, která je od výtrusů rezavě hnědě zbarvená. Dužnina bílá, v třeni nažloutlá, slabě houbového pachu a mírné chuti. Výtrusný prach je rezavě hnědý. Roste v jehličnatých lesích, zvláště smrkových, na vápencových podkladech. Jedlý (Laux,2006; Svrček 2002).

Druh: *Cortinarius venetus* (Fr.:Fr.) Fr. (pavučinec žlutozelený)



Obrázek 14: *Cortinarius venetus* (Fr.:Fr.) Fr. (Strauss, 2008)

s pomíjivým žlutým velem. Roste v bučinách i pod jehličnany. Nejedlý (Antonín, 2006).

Klobouk 3-6 cm, vyklenutý, s tupým hrbolem, olivově zelený, později žluto zelený až olivově hnědý, jemně vločkatě plstnatý, poté olysávající. Lupeny jsou žlutavé až olivové, následně šafránově rezavé. Třeň 5-8 cm dlouhý a 0,7-1 cm široký, kyjovitý, stejně zbarvený jako klobouk, na bázi žlutavý,

Druh: *Cortinarius violaceus* (L.) S. F. Gray em. Moser (pavučinec fialový)



Obrázek 15: *Cortinarius violaceus* (L.) S. F. Gray em. Moser (Junek, 2005b)

Klobouk je 6-14 cm široký, masitý, v mládí kuželovitý nebo polokulovitý, později až ploše rozložený, vláknitě šupinkatý, fialový, naspodu s hustými, vysokými, zoubkem přirostlými, tmavě fialovými lupeny a fialovým, vláknitým, hlízovitě kyjovitým 6-12 cm dlouhým a 1-2,5 cm širokým třeněm. Dužnina je světle fialová, nevýrazné chuti, vůně. Výtrusný prach je rezavě hnědý. Roste v malých skupinách v humózních listnatých a smíšených lesích. Nejedlý (Antonín, Kotlaba, 2003; Læssøe, Del Conte, 2004).

3.2 CHEMICKÁ SKLADBA HUB

Ze základních živin, které má houbová buňka k dispozici, se syntetizují všechny organické sloučeniny jak vysokomolekulární, tak nízkomolekulární. Syntézy probíhají postupně jako série jednoduchých chemických reakcí, které tvoří souhrnně příslušnou metabolickou dráhu.

Většina organické hmoty v buňce se skládá z relativně velkých molekul, které náležejí k nukleovým kyselinám, bílkovinám, polysacharidům a složeným lipidům. Tyto látky vznikají postupně z jednodušších látek. Nukleové kyseliny se syntetizují z nukleotidů, bílkoviny z aminokyselin, polysacharidy z jednoduchých cukrů. Složené lipidy vznikají z různých výchozích látek, jako jsou mastné kyseliny, polyalkoholy, monosacharidy, aminy a aminokyseliny. Na stavbě uvedených čtyř typů buněčných složek se účastní 60 – 70 různých nízkomolekulárních organických sloučenin. Mimo to je v buňce asi dvacet typů nízkomolekulárních sloučenin, které však nefungují jako budoucí stavební složky makromolekul, ale mají význam při katalytických reakcích v kombinaci s enzymy. Buňka musí svými metabolickými dráhami syntetizovat minimálně 100 – 200 typů nízkomolekulárních organických látek. Všechny tyto sloučeniny se syntetizují z podstatně menšího počtu typů organických látek, které v houbové buňce tvoří organickou rezervu – tzv. centrální intermediární metabolity buňky např. fosforylované sacharidy a kyselinu pyrohroznovou, kyselinu octovou, kyselinu šťavelovou, kyselinu jantarovou a kyselinu α -ketoglutarovou (Klán, 1989).

Čerstvé houby obsahují 70 – 95 % vody. Sušina hub obsahuje 5 – 30 % bílkovin. Jejich množství záleží na druhu houby a jejím stáří (nejvíce bílkovin je v mladých plodnicích). Stěny houbových buněk jsou zpravidla složeny ze sloučenin cukrů a chitinu, který je sice nestravitelný, ale zvyšuje pohyb střev, a tím v přiměřeném množství napomáhá trávení. Obsah stravitelných bílkovin je velmi proměnlivý. I když je v sušině hub mnohem méně stravitelných bílkovin než v mase a jiných živočišných produktech, kvalitativně jsou tyto bílkoviny rovnocenné. V houbách se nacházejí také tuky, ale v zanedbatelném množství (v sušině jich je 0,5 – 3,5 %), o něco bohatěji jsou v sušině hub zastoupeny cukry (1 – 6 %). Klobouk je bohatší na živiny než třeň. Dále houby obsahují minerální látky, vitamíny a další látky jako např. aromatické sloučeniny, alkaloidy, izoprenoidní lipidy (terpeny, steroidy),

kyseliny a látky podílející se na charakteristické vůni a chuti hub (Hagara, 1995; Janitor et al., 2006; Klán, 1989; Semerdžieva, Veselský, 1986; Smotlacha, 1999).

3.2.1 Primární metabolity

3.2.1.1 Sacharidy

Cukry tvoří 1 – 6 % obsahu hmotnosti. Jedná se o pentózy (xylóza, ribóza), methylpentózy (rhamnóza a fukóza), hexózy (glukóza, galaktóza, manóza), cukernaté alkoholy (mannitol, inositol, volemitol, sorbitol, erythritol, arabitol), uronové kyseliny (galakturonová a glukuronová), disacharidy (sacharóza). Jedním z cukrů obsažených v houbách, přítomným však pouze v mladých plodnicích, je disacharid trehalóza. Na štěpení tohoto cukru je potřebný enzym trehaláza, který se nachází ve střevech většiny lidí. Některé osoby však trpí poruchou tvorby tohoto enzymu, čímž se u nich vysvětluje neschopnost trávit houbové pokrmy (Hagara, 1995; Klán, 1999; Semerdžieva, Veselský, 1986; Svrček, 2002).

Polysacharidy jsou součástí jak buněčné stěny, tak plazmy hub jako rezervní cukry.

Chitin (poly- β 1 \rightarrow 4-N-acetyl-D-glukosamin, 7,5 %) je tvořen dlouhým řetězcem N-acetyl-D-glukosaminových jednotek vázaných β 1 \rightarrow 4 vazbami. Je základní složkou buněčných stěn hub, s výjimkou oomycetů, které mají celulózu. Chitin značně připomíná celulózu, u níž byla hydroxylová skupina na druhém uhlíku nahrazena acetaminoskupinou a je přítomen jak v podhoubí, tak v plodnicích (Klán, 1989; Semerdžieva, Veselský, 1986; Smotlacha, 1999).

Glukany (8 %) jsou větvené polymery glukózy (β 1 \rightarrow 3-glukan, β 1 \rightarrow 6-glukan, β 1 \rightarrow 4-glukan) spojené glykosidickými vazbami.

Zásobními sacharidy hub jsou glykogen (5 %) a trehalóza. Glykogen se skládá z glukózových jednotek uspořádaných do řetězce a spojených vazbami α 1 \rightarrow 4 a α 1 \rightarrow 6. Trehalóza je složena ze dvou jednotek glukózy a v buňce plní funkci transportního disacharidu (Klán, 1989).

3.2.1.2 Bílkoviny

Aminokyseliny jsou nezbytné pro syntézu bílkovin, jsou základní stavební složkou peptidů, které tvoří molekuly bílkovin (Klán, 1989).

Houby ve své sušině obsahují dvacet základních aminokyselin, z toho esenciálních aminokyselin je 2,6-7,6 %. Jedná se především o leucin a lysin, nejméně je methioninu. Lidské tělo si těchto osm tzv. nepostradatelných aminokyselin nedokáže samo vytvořit, a proto je musí přijímat v potravě. Některé houby (např. hříby a žampióny) obsahují více esenciálních aminokyselin než maso. V houbách jsou však i takové druhy aminokyselin, které lidské tělo nevyužívá. Předpokládá se, že některé z nich vyvolávají alergické reakce (Hagara, 1995; Klán, 1989).

Obsah bílkovin se pohybuje mezi 15 a 30 %. Obsah stravitelných bílkovin je velmi proměnlivý. Velká část z nich se váže na chitinové buněčné blány, tzv. mykochitin, který je pro člověka nestravitelný. Obsah stravitelných bílkovin se liší u jednotlivých druhů hub. Např. v liškách dosahuje pouze asi 4 %, v některých druhích žampiónů až 25 % sušiny hub. Stravitelnost hub se dá zvýšit pomletím nebo rozmixováním, čímž se zkrátí také čas vaření z 2 hodin na 10 minut při zachování maximálního obsahu výživných látek (Hagara, 1995; Janitor et al., 2006).

3.2.1.3 Lipidy

Lipidové látky jsou u hub zastoupeny v relativně malém množství. V sušině jich je 0,5 – 3,5 %. Jde o sloučeniny glycerolu a nenasycených či nasycených mastných kyselin. Většina lipidů jsou triacylglyceroly (tuky). Tuky bývají součástí buněčných struktur nebo jsou rozptýleny ve vakuolách, ergosterol v podobě krystalů, triglyceridy jako kapičky.

Tuky plní funkci energeticky hodnotných zásobních látek, podílejí se na metabolických procesech a také mohou signalizovat degeneraci buněk.

Významnou složkou buněčných membrán hub jsou fosfolipidy, které příznivě ovlivňují jejich propustnost a elasticnost. Fosfolipidy obsahují ve své molekule alkoholovou skupinu glycerolu esterifikovanou kyselinou fosforečnou, na kterou je navázána dusíkatá složka – cholin, etanolamin (Klán, 1989).

3.2.1.4 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou vysokomolekulární látky složené z nukleotidů. Ty jsou tvořeny ze sacharidu, dusíkaté báze a kyseliny fosforečné. U deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je cukrem deoxyribóza, u ribonukleové (RNA) je jím ribóza. Purinovými dusíkatými bázemi jsou adenin a guanin, pyrimidinovými jsou cytosin a thymin. V RNA je místo thyminu uracil. RNA se přímo účastní biosyntézy bílkovin. DNA je nositelem genetické informace, je tak chemickou podstatou dědičných faktorů – genů. Tvoří chromozómy lokalizované v jádře (Klán, 1989).

3.2.1.5 Enzymy

Významnou úlohu ve fyziologii houbové buňky hrají enzymy, které umožňují rozklad a využívání substrátu. Houby se podílejí částečně nebo úplně na výrobě téměř stovky enzymů. Z nejdůležitějších je to α -amyláza, amyloglukosidáza, pektinázy, β -glukanáza, celulázy, hemicelulázy, dextranázy, laktázy a proteázy. Plísně *Mucor miehei*, *M. pusillus* a vyšší houby *Endothia parasitica* se využívají jako producenti syřidlových enzymů srážejících bílkoviny v mléce na tvaroh. Díky houbám mohou být vyráběny také jogurty, kefíry a další mléčné výrobky (Klán, 1989; Kovář, 1999; Semerdžieva, Veselský, 1986).

3.2.2 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity jsou rozmanité druhy látek, jedná se o téměř čtyřicet typů a až tisíc sloučenin. Jde například o steroly, terpeny, antibiotika, pohlavní hormony, alkaloidy, indolové deriváty, deriváty pyridinu a látky odvozené od aminokyselin. Sekundární metabolity se neúčastní základních metabolických drah živých organismů, jsou to přímé produkty metabolismu. Látky podílející se na syntéze sekundárních metabolitů jsou sacharidy, aromatické aminokyseliny, kyselina mevalonová, kyselina šikimová a mastné kyseliny. Důležitou roli zde hraje především acetylkoenzym A.

Syntéza nového sekundárního metabolitu vede k produkci biologicky aktivních látek důležitých pro existenci jednotlivých druhů. Schopnost tvorby sekundárních metabolitů může být přechodná. Rovněž je typická pro různé taxonomické jednotky, čehož lze využít při rozlišování a určování hub (Klán, 1989).

3.2.2.1 Pigmenty

Jedním z důležitých rozlišovacích znaků stopkovýtrusných a vřeckovýtrusných velkých hub je barva plodnic, která však nemusí být stálá. Zbarvení je dáno chemickými látkami, které jsou souhrnně označovány jako pigmenty. Například žluté zbarvení způsobují xantony, červené zbarvení některé deriváty piperazinu a pyrazinu. Podobně chinoidní látky dávají houbám různá zbarvení (Kovář, 1999; Smotlacha, 1999).

Jednotlivé druhy hub jsou charakteristické svým zbarvením, které je ovlivněno místem výskytu hub, světelnými podmínkami, teplotou, vlhkostí, výživou a stářím plodnic. Pestře zbarvené houby obvykle rostou více v zastíněných místech, na světlých a otevřených místech rostou spíše druhy s nevýraznými bílými, šedivými a hnědavými pigmenty. Barevně pestré druhy, které se ocitnou na slunci, mají světlejší pigmentaci než stejné druhy rostoucí v lese. Každá houba má jiné chemické složení pigmentů, stejné může být jen u několika druhů (Kovář, 1999).

Chromoforní pigmenty jsou obsaženy v buňkách hub (v cytoplazmě nebo vakuolách), chromoparní pigmenty se nacházejí mimo buňku houby.

Některé houby mění svou barvu po rozříznutí nebo otlačení, což je dáno oxidací pigmentů, na jinou barevně odlišnou formu. Po usušení některých druhů hub se změní barva plodnic na tmavou až černou. To je dáno obsahem nekropigmentů.

Biologický význam pigmentace není dosud jasný. Někteří ji považují za odpadní produkt metabolismu. Ukazuje se však, že některé pigmenty mají antibiotické vlastnosti nebo fungují jako přenašeči vodíku při dýchacích pochodech nebo slouží jako ochrana před přímým UV zářením (Klán, 1989).

3.2.2.2 Vůně, pachy a chuťové látky hub

Zřejmě nejcennější složkou hub jsou aromatické látky, dále také pryskyřičné (terpenické) látky, alkaloidy, kyseliny a další. Na nich závisí vůně a chuť jednotlivých druhů hub. Svým dráždivým účinkem také podporují tvorbu slin a žaludečních šťáv, čímž podporují trávení (Hagara, 1995; Smotlacha, 1999).

Chuť hub hraje důležitou roli při jejich využití k přípravě pokrmů. Jedlé houby mají chuť nasládlou, mírnou, oříškovou, nejedlé houby se vyznačují chutí nahořklou štiplavou a palčivou. I když ne vždy je chuť rozlišujícím faktorem jedlosti nebo jedovatosti houby.

Aroma většiny druhů divoce rostoucích i pěstovaných hub obsahuje jako klíčovou vonnou sloučeninu alkohol 1-okten-3-ol, který vzniká enzymovou oxidací linolové kyseliny. Ten bývá doprovázen řadou dalších sloučenin. Pro aroma hub jsou důležité také některé netěkavé sloučeniny, zejména nukleotidy. Jako složky aroma sušených hub se uplaňují také četné karboxylové kyseliny, laktony, sírné sloučeniny a rovněž heterocyklické sloučeniny (Velíšek, 1999).

Vůně a pachy hub, vycházející z jejich chemického složení, jsou u některých druhů velmi výrazné a mohou být snadným rozlišovacím znakem při určování daného druhu (Příhoda et al., 1988).

3.2.3 Minerální látky a voda

Ve stopových množstvích jsou v houbách přítomny také minerální látky např. draslík, fosfor, vápník, železo, sodík, měď, mangan a jiné. V houbách je podstatně více minerálních látek než v zelených rostlinách. Jejich obsah závisí na místě růstu, složení půdy, věku a druhu houby. V 1 kg sušiny bedly vysoké je až 180 mg mědi, důležité např. při tvorbě červených krvinek. Houby však vstřebávají ze svého okolí také některé nežádoucí prvky, a to i jedovaté, např. rtuť, arzén, kadmium, chrom, vanad, berylium. Koncentrace těchto prvků může být v houbách několikrát vyšší než v okolní půdě. Obsah těchto látek stoupá se stářím plodnice (Hagara, 1995; Smotlacha, 1999).

V čerstvých houbách je obsaženo 70-95 % vody, po usušení se z hub většina vody odpaří a tím se její hmotnost sníží až desetinásobně (Hagara, 1995).

3.2.4 Vitaminy

Houby obsahují také některé vitaminy, především provitamin A čili karoten (nejvíce je ho v lišce obecné), vitaminy skupiny B (B₁, B₂, B₅ a B₁₂), které jsou nejvíce obsaženy v hříbech. Dále jsou zastoupeny také vitaminy D, E, K a C. Přítomnost vitamínu D v houbách je zajímavá, neboť tento vitamin není obsažen v jiných rostlinách a zůstává zachován i v sušených houbách. Tepelnou úpravou hub se obsah vitamínu C, B₁, B₁₂, kyseliny listové a vitamínu K snižuje (Hagara, 1995; Kovář, 1999; Smotlacha, 1999).

3.2.5 Látky izolované z testovaných rodů hub

V následující tabulce 1 jsou uvedeny látky izolované z některých druhů testovaných v této práci. Z druhů *C. alboviolaceus*, *C. bolaris*, *C. malachius*, *C. mucosus*, *C. multiformis*, *C. pholideus*, *C. traganus*, *C. triumphans*, *C. trivialis*, *C. varius* a *C. venetus* zatím čisté látky izolovány nebyly.

Látky izolované z dalších druhů a blíže nespecifikovaných druhů rodu *Cortinarius* jsou rovněž uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Látky izolované z hub rodu *Cortinarius*

Rod/Druh	Izolované látky	Citace
<i>Cortinarius anomalus</i>	kys. asparagová, kys. glutamová, serin, glycin, alanin, kys. γ -aminomáselná	Perseca et al., 1985
<i>Cortinarius armillatus</i>	arabitol, mannitol, trehalóza, fruktóza, kys. 4-hydroxybenzoová, cholin, kortinarin A	Badalyan et al., 1994
	dermolutein, dermorubin, endokrocin-6,8-dimethylether, cinnalutein, nordermorubin, dermorubin-6-methylether, emodin-6,8-dimethylether	Besl et al., 1978
<i>Cortinarius infractus</i>	alkaloidy - infraktopikrin, 10-hydroxy-infraktopikrin	Geissler et al., 2010
	kys. β -karbolin-1-propionová	Brondz et al., 2007
	deriváty β -karbolinu - infraktin, 6-hydroxy-infraktin	Steglich et al., 1984
<i>Cortinarius violaceus</i>	železitý komplex (R)- β -dopa	Gill, 2003
<i>Cortinarius</i> sp.	N-1- β -glukopyranosyl-3-(karboxymethyl)-1H-indol, N-1- β -glukopyranosyl-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1H-indol	Teichert et al., 2008a
	β -karbolinové alkaloidy - brunnein A–C, kys. 3-(7-hydroxy-9H- β -karbolin-1-yl)propionová	Teichert et al., 2007

Tabulka 1: Pokračování

Rod/Druh	Izolované látky	Citace
<i>Cortinarius</i> sp.	kys. 6-hydroxychinolin-8-karboxylová, kys. 4-amino-6-hydroxychinolin-8- karboxylová, kys. 7-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydroisochinolin-5-karboxylová	Teichert et al., 2008b
	3-aldehyd-2-amino-6-methoxypyridin, (R)-glycidyloktadekanoát, steroly ergostanového typu	Hu et al., 2003
	kortenuamid A ((4E,8E)-N-D-2'-hydroxytetrakosanoyl-1-O-β-D-glykopyranosyl-9-methyl-4,8-sfingdienin), kortenuamid B ((4E, 8E)-N-D-2'-hydroxytrikosanoyl-1-O-β-D-glykopyranosyl-9-methyl-4,8 sfingdienin, kortenuamid C ((4E, 8E)-N-D-2'-hydroxydokosanoyl-1-O-β-D-glykopyranosyl-9-methyl-4,8-sfingdienin), (4E, 8E)-N-D-2'-hydroxyoktadekanoyl-1-O-β-D-glykopyranosyl-9-methyl-4,8-sfingdienin, (4E,8E)-N-D-2'-hydroxypalmitoyl-1-O-β-D-glykopyranosyl-9-methyl-4,8-sfingdienin	Tan et al., 2003
	nesymetrický disulfid oxidu kortamidinu	Nicholas et al., 2001
	1,4-anthrachinonové deriváty - rufoolivacin, rufoolivacin B	Zhang et al., 2009
	rufoolivaciny A-D, (3S)-torosachryson-8-O-methylether, fyscion, 1-hydroxy-6,8-dimethoxy-3-methylanthrachinon,	Gao et al., 2010

Tabulka 1: Pokračování

Rod/Druh	Izolované látky	Citace
<i>Cortinarius</i> sp.	torachryson-8-O-methylether, citreorosein 6,8-dimethylether, sinapichinon, anhydroflavomannin-9,10-chinon 6,6',8'-tri-O-methylether	Gao et al., 2010
	(3'S,P)-anhydroflegmacin-9,10-chinon-8'-O-methylether, dermokanarin 4, kys. N-[9-(4-hydroxyphenyl)nona-2,4,6,8-tetraenoyl]glutamová (skaurin A), kys. N-[9-(3',4'-dihydroxyfenyl)nona-2,4,6,8-tetra-enoyl]glutamová (skaurin B)	Gill, 2003
	flegmacin A ₁ , B ₂	Müller et al., 2004
	dermokanarin 4	Gill et al., 1998
	(3S,3'S,P)-anhydroflegmacin-9,10-chinon 8'-O-methyl ether a jeho (2'S)-hydroxy derivát	Elsworth et al., 1999
	3-aldehyd-2-amino-6-methoxypyridin, vibratilicin (3-[3-(dimethylamino)-4-(hydroxyamino)-4-oxobutoxy]-2-(palmitoyloxy)propyl(9E,12E)-oktadeka-9,12-dienoát)	Zhong, Xiao, 2009
	8-O- β -D-gentiobiosid	Elsworth et al., 2000
	sodagnitin A–F	Sontag et al., 1999

Tabulka 1: Pokračování

Rod/Druh	Izolované látky	Citace
<i>Cortinarius</i> sp.	sinapichinon (1,2-anthrachinonový chromophor), sinapikolon (dihydroanthracenon-anthron tetramer)	Gill, Milanovic, 1999
	kys. 6-nitro-iso-vanilová	Gill et al., 1987
	styrylpyrony – hispidin bis-noryangonin	Watling et al., 1992
	leprocybin	Kopanski et al., 1982
	deoxyaustrokortilutein, deoxyaustrokortirubin	Gill, Smrdel, 1987
	cinnarubin, cinnalutein	Reininger et al., 1972
	vibratilicin - 3-[3-(dimethylamino)-4- (hydroxyamino)-4-oxobutoxy]-2- (palmitoyloxy)propyl (9E,12E)-oktadeka-9,12- dienoát, ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, 5 α ,8 α - epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol, kys. p-anizová, N-(2-hydroxyhexadekanoyl)-4-sfingenin	Wang et al., 2004
	anthrachinony - 6-methylxanthopurpurin-3- methylether, xanthorin, 1,4-dihydroxy-2- methoxy-7-methyl-9,10-anthrachinon (austrokortinin)	Archard et al., 1985
	geosmin (seskviterpenový derivát)	Breheret et al., 1999

Tabulka 1: Pokračování

Rod/Druh	Izolované látky	Citace
<i>Cortinarius</i> sp.	kortinarin A, kortinarin B, orellanin, orellin, orellinin	Hrdina et al., 2004
	kortinarin C	Caddy, 1984

3.3 HOUBOVÉ TOXINY A OTRAVY HOUBAMI

Houbové toxiny (mykotoxiny) vznikají jako přímé produkty metabolismu hub, jejich biosyntéza však není spjata se základními procesy při tvorbě biomasy (Klán, 1989).

Asi ze 6 000 evropských velkých hub je jen okolo 180 jedovatých nebo podezřelých. Jen některé z nich však mají pro život člověka nebezpečné toxiny. První údaje o jedlosti a jedovatosti hub nacházíme už u antických učenců. Převládající názor byl, že houby mohou získávat jedovatost v důsledku vnějších vlivů, např. tím, že rostly v blízkosti jedovatých rostlin nebo poblíž rezavého hřebíku a starých shnilých hadrů.

Teprve koncem 18. století se přišlo na to, že jedovatost hub je neměnná vlastnost určitých druhů a tedy vnější okolnosti nehrají žádnou roli. Ve stejné době se začaly zkoumat a charakterizovat první houbové jedy (Kohte, 2000).

Otravy, které způsobují velké houby, lze rozdělit na lehké, tj. na ty, které se projevují u zdravého člověka pouze gastrointestinálními obtížemi (nevolností, zvracením, střevními potížemi) a na těžké, tj. takové, při kterých je poškozen některý důležitý orgán těla, např. játra, ledviny, přičemž tyto otravy mohou končit smrtí.

Obsah toxinu v plodnicích každé jedovaté houby kolísá v závislosti na denní době, klimatických a půdních faktorech, stáří plodnice apod. Rovněž distribuce toxinu v plodnici není rovnoměrná.

Houbu považujeme za jedovatou, jestliže po požití malého množství nebo opakovaně malé dávky (kumulativní jedy) se dostaví zdravotní obtíže vlivem obsažených látek. Houby jedovaté pro živočichy s řízenou tělesnou teplotou nemusí

být toxické pro jiné živočichy. Rovněž i vnímavost k houbovým toxinům bývá u jednotlivých živočišných druhů různá (Klán, 1989).

3.3.1 Toxiny pavučinců

Hlavními toxiny jsou orelaniny – bipyridilové deriváty. 3,3',4,4'-tetrahydroxy-2,2'-bipyridin-*N,N'*-dioxid je chemický vzorec orelaninu. Vyskytuje se v houbě jako ve vodě rozpustná sůl nebo protonovaná nerozpustná forma. Při 150 °C se rozkládá a kondenzuje jako orelin. Fotolýzou vzniká zpočátku mono-*N*-oxid orelininu a později orelin. Orelanin a orelinin jsou stejně toxické, orelin je netoxický. Orelanin působí především na ledviny, protože se v nich hromadí a trvale poškozuje ledvinové kanálky (Klán, 1989; Hrdina et al., 2004).

První příznaky otravy se projeví teprve za 2-4 dny, někdy až za 14 dní nevolností, bolestmi hlavy, břicha a v kříži, zvracením a nadměrným močením. Z lékařského hlediska mluvíme o neurotoxickém syndromu (Klán, 1989).

Orelaninový syndrom působí tyto druhy – pavučinec plyšový (*Cortinarius orellanus*), pavučinec nádherný (*Cortinarius rubellus*) a některé vzácné druhy pavučinců (Kohte, 2000).

3.3.2 Toxiny neznámé povahy

Vyskytují se u mnoha hub, vyvolávají lehké otravy, projevují se nevolností, zvracením a průjmy za 30-120 minut po jídle. Při těžších otravách může docházet ke svalovým křečím nebo oběhovým poruchám. Mluvíme o tzv. gastrointestinálním syndromu (Klán, 1989; Kohte, 2000).

Tyto druhy hub jsou toxické za syrova, vařené i sušené, kromě hříbu satana, jehož toxiny se varem rozkládají (Klán, 1989).

Gastrointestinální otravy působí pečárka zápašná (*Agaricus xanthodermus*), hřib kříšť (*Boletus calopus*), hřib satan (*Boletus satanas*), závojenka olovová (*Entoloma sinuatum*), závojenka vmáčklá (*Entoloma rhodopolium*), závojenka jarní (*Entoloma vernum*), čechrátka podvinutá (*Paxillus involutus*), čirůvka tygrovaná (*Tricholoma pardalotum*) a další čirůvky, určité holubinky (*Russula*), ryzce (*Lactarius*), pavučince (*Cortinarius*) a voskovky (*Hygrocybe*) (Kohte, 2000).

3.4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA HUB

3.4.1 Antimikrobiální aktivita hub rodu *Cortinarius*

Historie betalaktamových antibiotik se datuje od roku 1928, kdy A. Fleming na kolonii stafylokoků pozoroval účinek antibakteriální látky, kterou produkovala kontaminující plíseň *Penicillium notatum*. Podařilo se mu připravit pouze málo stálý koncentrát účinné látky, kterou nazval penicilin. Jeho snaha o izolaci účinné látky nebyla úspěšná. Na začátku druhé světové války byla objevena metoda čištění penicilinu Floreyem a Chainem, což umožnilo v roce 1941 první pokusy s penicilinovou léčbou u lidí. Již v roce 1943 se penicilin začal vyrábět v USA (Hartl et al., 2006; Klán, 1989).

Jelikož narůstá bakteriální rezistence, je třeba hledat další potenciální zdroje antibakteriálně účinných látek. Mikromycety jsou důležitým zdrojem antibioticky působících látek. Ale zatím existuje pouze několik látek izolovaných z makromycet, které byly testovány na antimikrobiální aktivitu (Murgo et al. in Beattie et al., 2010).

Dichlormethanový extrakt z *C. elegator* vykazoval aktivitu proti *Bacillus subtilis*, dichlormethanový extrakt z *C. hercynius* vykazoval aktivitu proti *B. subtilis* a *Escherichia coli* (Yayli et al. in Beattie et al., 2010).

Kortamidin, izolovaný z některých druhů rodu *Cortinarius*, také vykazoval antimikrobiální aktivitu (Nicholas et al., 2001).

U pigmentů (antrachinon emodin, doprovázený physcinem) izolovaných z *Cortinarius basirubescens* byla prokázána antibakteriální aktivita proti G+ *Staphylococcus aureus* a proti G- *Pseudomonas aeruginosa*. Rovněž antibakteriální aktivitu proti *S. aureus* a *P. aeruginosa* vykazují lipofilní látky obsažené v druzích *C. austrovenetus*, *C. canarius*, *C. clelandii* a *C. persplendidus* (Beattie et al., 2010).

3.4.2 Antikancerogenní aktivita hub rodu *Cortinarius*

Látky účinné proti zhoubnému rakovinnému bujení byly nalezeny jak mezi mikromycety, tak mezi makromycety. Antikancerogenní aktivitu proti P388 leukemické buněčné linii testované na čeledi myšovitých vykazoval kortamidin izolovaný z *Cortinarius* sp. (Nicholas et al., 2001). Sodagnitin A a C izolované

z *C. sodagnitus* a *C. fulvoincarnatus*, sodagnitin C izolovaný z *C. arcuatorum* působí cytotoxicky proti L1210 rakovinným buňkám (Sontag et al., 1999).

3.4.3 Acetylcholinesterázová a butyrylcholinesterázová inhibiční aktivita hub rodu *Cortinarius*

Infraktopikrin a 10-hydroxy-infraktopikrin izolované z *C. infractus* vykazovaly acetylcholinesterázovou inhibiční aktivitu a dokonce vyšší aktivitu než galantamin (Geissler et al., 2010).

Jak acetylcholinesterázovou tak butyrylcholinesterázovou inhibiční aktivitu vykazoval β -karbolinový alkaloid - brunnein A izolovaný z *C. brunneus* (Teichert et al., 2007).

3.4.4 Další aktivita hub rodu *Cortinarius*

Trans-4-hydroxy-flavomannin-6,6'-di-O-methyl ether A izolovaný z *C. vitellinus* a *C. splendens* vykazoval antiplasmoidální aktivitu (Francois et al., 1999).

Dichlormethanový extrakt z *Cortinarius elegatior* vykazoval aktivitu proti měkkýši *Biomphalaria glabrata* (Yayli et al. in Beattie et al., 2010).

3.5 ALZHEIMEROVA NEMOC A ROLE INHIBITORŮ ACETYLCHOLINESTERÁZY A BUTYRYLCHOLINESTERÁZY

Alzheimerova nemoc je progresivní neurologické onemocnění charakterizované demencí, především úbytkem paměti a dále poruchami chování a postižením běžných životních činností. Vzniká na podkladě degenerativního zániku mozkových neuronů, který mimo jiné vede k nedostatku acetylcholinu v mozku (Bednařík et al., 2010).

3.5.1 Epidemiologie

Demence je jedním z nejčastějších zdravotních problémů stáří. Její prevalence v populaci starší 65 let dosahuje 10 %, přičemž s rostoucím věkem se výskyt zvyšuje a demence postihuje více než 30 % osob starších 80 let. Alzheimerova nemoc je čtvrtou až pátou nejčastější příčinou smrti (Jedlička et al., 2005).

Statisticky nejvýznamnějším rizikovým faktorem vzniku Alzheimerovy nemoci je věk. Vedlejšími rizikovými faktory jsou ženské pohlaví, nízké vzdělání a výskyt Alzheimerovy nemoci nebo Downova syndromu v rodině, cerebrovaskulární onemocnění a trauma hlavy v osobní anamnéze. Arteriální hypertenze, jejíž vztah k rozvoji cévního onemocnění mozku a vaskulární demence je znám, byla odhalena jako významný rizikový faktor také pro rozvoj Alzheimerovy nemoci (Bednařík et al., 2010).

3.5.2 Etiopatogeneze a patofyziologie

Hypotetické představy o příčině a mechanismech rozvoje Alzheimerovy nemoci se průběžně vyvíjejí v souladu s novými poznatky. Alzheimerova nemoc je převážně sporadické onemocnění, ale jsou popsány familiární případy s autozomálně dominantní dědičností. Genetické markery a specifické geny zjištěné u familiárních forem Alzheimerovy nemoci však u nemocných se sporadickou formou nemusí být přítomny, i když i zde genetické činitele nejspíše také hrají svou roli.

Pravděpodobně klíčovým patogenetickým mechanismem vzniku Alzheimerovy nemoci je tvorba a ukládání patologického proteinu β -amyloidu. V neuronech je přítomna přirozená bílkovina amyloidový prekurzorový protein. Amyloidový prekurzorový protein je štěpen enzymem α -sekretázou na fragmenty o délce do 39-40 aminokyselin. Tyto fragmenty (β -peptid) jsou stabilní a mají své role. Za patologických podmínek se u Alzheimerovy nemoci uplatňují na štěpení amyloidového prekurzorového proteinu i enzymy β - a γ -sekretáza, které štěpí delší fragmenty o 42 i 43 aminokyselinách. Tyto fragmenty pak přestávají být solubilní, srážejí se v extracelulárním prostoru a polymerizují. Tak vzniká β -amyloid, který tvoří základ Alzheimerových plaků. V oblasti plaků dochází k zániku synapsí, k degenerativním projevům a postupnému zániku neuronů, k aktivaci gliových elementů a ke sterilní zánětlivé reakci včetně aktivace cyklooxygenázy II. Dále

k uvolnění řady látek, jako jsou volné kyslíkové radikály, excitační aminokyseliny, cytokiny a další, které jsou v nadbytku škodlivé a působí další neurodegenerativní změny. Patogenetické teorie Alzheimerovy nemoci zohledňují nejružnější mechanismy (akcentovaná apoptóza, excitotoxické děje, toxické působení aluminia a dalších prvků a volných radikálů, lipoperoxiční děje). Podstata chorobného procesu nicméně nebyla plně vyjasněna.

Pokud jde o patofyziologii projevů Alzheimerovy nemoci, v současnosti uznávaná cholinergní hypotéza předpokládá, že ztráta cholinergních neuronů v predilekčních oblastech mozku kůry (entorinální kůra temporálního laloku, hipokampus, později asociační oblasti neokortexu) a podkoří (nukleus basalis Meynerti) a tím způsobené snížení hladin acetylcholinu jsou hlavním podkladem kognitivních poruch. Tíže projevů onemocnění skutečně koreluje s poklesem množství cholinacetyltransferázy, enzymu tvořícího acetylcholin a se snížením hustoty receptorů v mozcích pacientů (Jedlička et al., 2005).

3.5.3 Klinický obraz

Manifestnímu rozvoji demence předchází v časných stádiích onemocnění bezpříznakové období, kdy aktivací latentní mozkové rezervy jsou ještě zajištěny normální kognitivní funkce. S postupem chorobného procesu však dochází k vyčerpání rezerv a objevují se první kognitivní poruchy a snížení funkční výkonnosti, které si již uvědomuje sám nemocný nebo jeho okolí.

Demence mírného stupně v počátečním stadiu Alzheimerovy nemoci (obvykle 1 až 4 roky od začátku onemocnění) se projevuje především poruchou schopnosti učení novým informacím s relativně zachovaným vybavováním starších údajů. Nemocný má obtíže s pozorováním, vštěpováním a vybavováním recentních událostí a běžných informací, hledá nedávno odložené předměty, zapomíná vykonávat běžné rutinní úkony. Mohou se objevit selektivní obtíže s vybavováním jmen osob a užíváním méně obvyklých slov. Pokles paměti a další poruchy jsou na překážku denním činnostem, ale neomezují ještě soběstačnost nemocného.

Střední stádium onemocnění (2 až 10 let od začátku Alzheimerovy nemoci) se vyznačuje závažnou poruchou paměti, která uchovává pouze hluboce vštípenou nebo dobře známou látku. Nové informace lze vštípit jen výjimečně a na velmi krátkou dobu. Pacient si nevybavuje ani svou domácí adresu, ani základní informace o místě,

kde se nachází, co nedávno dělal. Je dezorientovaný, ztrácí se i ve známém prostředí. Nevybavuje si jména známých osob. Soběstačnost nemocného je časem závažně narušena.

V pozdním, těžkém stádiu onemocnění (7 až 14 let od začátku onemocnění) nastává téměř úplná ztráta paměti s neschopností vstípení nové informace, vybavují se pouze nesourodé útržky dříve získaných informací. Nemocný nepoznává ani blízké osoby, je zcela nesoběstačný, vegetativní funkce probíhají spontánně.

Poruchy dalších kognitivních funkcí jsou značně interindividuálně rozdílné co do výskytu i rychlosti progresu.

Obecně lze říci, že Alzheimerova nemoc má plíživé, nenápadné začátky a průběh je chronicky progresivní, bez výraznějšího kolísání. Od zjištění prvních příznaků trvá nemoc průměrně 7 až 10 let, pak končí letálně. Trvání choroby se prodlužuje s léčebným užitím inhibitorů acetylcholinesterázy a při dobré celkové péči o postiženého (Jedlička et al., 2005).

3.5.4 Diagnóza

Klinická diagnóza vychází ze standardizovaných diagnostických kritérií demence a z kritérií pro diagnózu Alzheimerovy nemoci. Aby trvalé globální zhoršení kognitivních funkcí a intelektuální výkonnosti mohlo být prohlášeno za demenci, je nutno kromě objektivizace poruchy prokázat, že postižení je natolik těžké, že snižuje běžnou osobní a pracovní výkonnost nemocného. Nutným předpokladem klinické diagnózy je pak vyloučení jiných možných příčin demence.

Podezření na demenci se ověřuje jednoduchými klinickými testy. Nejužívanější je tzv. MMSE (Mini-Mental State Examination) skládající se ze skórovaných otázek a úkolů zaměřených na orientaci, výbavnost základních informací, recentní paměť, pozornost, řečové, zrakoprostorové a praktické schopnosti. Nevýhodou testu je malá citlivost pro lehké formy demence. Přesnějším diagnostickému rozpoznání a kvantifikaci demence slouží komplexní neuropsychologické škály. Objektivní informace o funkčních schopnostech a soběstačnosti pacienta je nutno získat od osob o pacienta pečujících, nejlépe pomocí strukturovaného dotazíku.

Hlavním účelem pomocných vyšetřovacích metod je zachytit případné léčitelné příčiny demence. Samozřejmostí je kompletní biochemické a hematologické vyšetření, endokrinologické vyšetření, EKG, rentgen plic, CT nebo MR mozku. Dále

se podle anamnézy a doprovodné symptomatiky indikuje vyšetření sérologie lues a HIV, metabolismu vitamínu B₁₂ a kyseliny listové, případně další vyšetření (EEG, lumbální punkce, toxikologie – těžké kovy aj.) U mladších dospělých je nutno myslet na pozdě nastupující vrozené metabolické vady, zejména na Wilsonovu nemoc (Jedlička et al., 2005).

3.5.5 Terapie

Zatím není možné Alzheimerovu nemoc léčit kauzálně, protože není komplexně známa etiologie. Snahou je ovlivnit známé patogenetické mechanismy. Dosavadní terapie neumožňuje vyléčení, ale pouze zpomalení progresu choroby, oddálení těžkých stádií, která jsou spojena s výrazným zhoršením kvality života pacientů, s plnou závislostí na péči okolí.

Založeny na důkazech jsou zatím pouze dva farmakoterapeutické přístupy – použití inhibitorů cholinesteráz a inhibitorů NMDA receptorů. Memantin a inhibitory cholinesteráz lze vzájemně kombinovat. Tato kombinace je terapeuticky výhodná, ale velmi nákladná (Jiráček, 2009).

3.5.5.1 Inhibitory cholinesteráz

Mezi inhibitory cholinesteráz patří jak inhibitory acetyl-, tak butyrylcholinesteráz. Správná funkce cholinergního systému mozku je nezbytná pro paměťové funkce a pro udržení kvalitativní úrovně vědomí. Cholinergní systém je první postižený neurotransmiterový systém u Alzheimerovy nemoci. Je snížena tvorba a výdej acetylcholinu. Tyto látky vedou k bloádě enzymů odbourávajících v synaptické štěrbině acetylcholin (acetylcholinesterázy a u Alzheimerovy choroby patologicky zmnožené, jinak minoritní butyrylcholinesterázy), a tím zlepšují porušenou acetylcholinergní transmissi. Některé inhibitory mozkových cholinesteráz blokují pouze acetylcholinesterázy, jiné i butyrylcholinesterázy. V současné době jsou klinicky používané tři látky.

Donepezil je velmi dobře tolerovaný a má malý výskyt nežádoucích efektů (Jiráček, 2009).

Galantamin je alkaloid původně izolovaný z *Galanthus nivalis* (sněžienka podsněžník). I dnes je izolován z přírodních zdrojů, synteticky je produkován

v menší míře. Jedná se o poměrně čistý inhibitor acetylcholinesterázy a kromě toho i alosterický modulátor nikotinových receptorů. Má kratší poločas, podává se 1x denně ve formě s prodlouženým uvolňováním nebo 2x denně v neretardované formě. Je obvykle dobře snášen a má minimum nežádoucích efektů (Isensee et al., 2007; Jirák, 2009).

Rivastigmin je jak inhibitor mozkových acetylcholinesteráz, tak i butyrylcholinesteráz. Má proto o něco více nežádoucích gastrointestinálních efektů, zpravidla pouze přechodných. Velmi dobře ovlivňuje psychotické příznaky. Je také používán k léčbě parkinsonských demencí. Má naprosté minimum lékových interakcí.

Výhodné z hlediska úspěšnosti léčby je jejich použití u počínajících demencí. Inhibitory mozkových cholinesteráz jsou kontraindikovány u aktivní vředové choroby gastrointestinální a u těžších převodních poruch srdce. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou gastrointestinální, především dyspepsie, nechutenství, nauzea, výjimečně vomitus. Zřídka se vyskytuje zpomalení srdeční frekvence, křeče, cefalalgie a neklid (Jirák, 2009).

3.5.5.2 Inhibitory NMDA receptorů

Zatím je z inhibitorů N-metyl-D-aspartátových receptorů (NMDA) glutamátergního systému používán pouze memantin. **Memantin** je parciální inhibitor NMDA receptorů. Tyto receptory jsou spojeny s otevřením iontových kanálů pro Ca^{2+} a Na^{+} ionty. U Alzheimerovy choroby dochází v pozdějších stádiích k excitotoxicitě – k nadměrnému uvolňování excitačních aminokyselin (glutamát, aspartát), které pak vedou k hyperexcitaci svých receptorů včetně NMDA typu. Tato aktivita je navíc zvýšena tím, že v některých oblastech mozku dochází ke snížení zpětného vychytávání glutamátu. Tím dochází k nadměrnému vstupu kalciových buněk do neuronů, k aktivaci některých enzymů, měnících strukturu proteinů, ke zvýšené expresi některých genů, v důsledku čehož nastává zvýšená apoptóza neuronů. Excitotoxicitou je také rušen jeden ze základních mechanismů učení – dlouhodobé potenciace, který probíhá na receptorech NMDA typu. Memantin výrazně snižuje excitotoxické působení na neurony. Další pozitivní efekt memantinu je inhibice proteinkinázy $\text{GSK3}_{\text{beta}}$ (glykogen syntáza kináza), která spouští degeneraci neuronálního tau proteinu. Memantin je dobře snášený s minimem

nežádoucích efektů. Pokud se vyskytnou, projevují se nejčastěji jako nežádoucí excitace nebo přechodný výskyt halucinací či jiných psychotických symptomů (Jirák, 2009).

3.5.5.3 Další možnosti terapie

Dále existuje řada jiných farmakoterapeutických přístupů, které vycházejí z ovlivnění známých patogenetických řetězců, ale jejichž použití není založeno na důkazech. Tyto přístupy jsou používány jako doplňkové, neboť vyžadují důkladnější, rozsáhlejší a sofistikovanější klinické studie. Mezi tyto přístupy patří užití nootropik, extraktů z *Ginkgo biloba*, scavengerů volných radikálů, látek zvyšujících tvorbu nervových růstových faktorů, estrogenní hormonální substituce u postklimakterických žen. U většiny však klinické studie nepotvrdily dostatečný terapeutický efekt, u některých se uvažuje o určitém preventivním efektu (Jirák, 2009).

Poruchy chování, emoční labilita a agitace časem vyžadují symptomatickou psychotropní léčbu. V případě nutnosti antipsychotické či antidepressivní léčby mají přednost přípravky s minimem anticholinergních účinků, aby se neprohluboval základní chorobný deficit acetylcholinu. K tlumení agitace a psychotických projevů se zvláště u starých nemocných osvědčuje tiaprid. Vhodná jsou také novější atypická neuroleptika risperidon, olanzapin, quetiapin a jiné. K uvolnění deprese se nabízejí moderní antidepressiva ze skupiny SSRI (citalopram, fluoxetin), je možné použít také látky ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání noradrenalinu a serotoninu (venlafaxin) nebo reverzibilní inhibitory monoaminoxidázy (moclobemid). Oxazepam se osvědčuje u epizodické úzkosti, ale benzodiazepiny jsou obecně u geriatrických a demenčních nemocných málo vhodné pro své paradoxní účinky. Pro ovlivnění poruch spánku se místo klasických hypnotik doporučuje například melatonin (Jedlička et al., 2005).

Dále jsou vyvíjeny látky zabraňující syntéze, ukládání a shlukování β -amyloidu. Jsou zkoušeny některé inhibitory proteáz, zatím však není žádný v klinickém použití. Zkoušena je také vakcinace β -amyloidem i podávání monoklonálních protilátek proti β -amyloidu. Rovněž jsou zkoušeny postupy blokující degeneraci tau proteinu i řada dalších metod (Jedlička et al., 2005; Jirák, 2009).

Nedílnou součástí léčby jsou psychotické metody a sociální podpora. Psychoterapie má význam zejména v časných stádiích, kdy lze zpomalit progresi paměťové poruchy různými technikami procvičování paměti včetně specializovaných počítačových programů. Cílený kognitivní trénink podporuje rozvoj zachovaných funkcí, tzv. realitní terapie vede k tvorbě náhradních mechanismů podporujících běžné denní aktivity (zapisování poznámek, orientační body v životním prostředí). Stejně důležitá jako péče o pacienty jsou edukace a sociální a psychotherapeutická podpora o ně pečujících osob (Jedlička et al., 2005).

3.6 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

3.6.1 Volné radikály

Většina volných radikálů v těle jsou deriváty kyslíku, nazývané reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS – reactive oxygen species) a deriváty dusíku, nazývané reaktivní sloučeniny dusíku (RNS – reactive nitrogen species) (Mandelker, 2009).

Radikál je jakákoli molekula, atom nebo ion, který má ve valenční sféře jeden nebo více nepárových elektronů. Radikály mohou vznikat buď homolytickým štěpením kovalentní vazby molekuly, při němž si každý fragment ponechá jeden elektron (např. štěpením C-H vazby v methanu CH_4 vznikne methylový radikál $\text{CH}_3\bullet$ a radikál vodíku $\text{H}\bullet$) nebo vznikají ztrátou jednoho elektronu (oxidace) či adicí jednoho elektronu (redukce). Jako volný radikál se označuje radikál, který je schopen samostatné existence po jakkoli krátkou dobu. Volný elektron dává radikálům jejich vysokou reaktivitu a tím i nestabilitu (Zima et al., 1996).

Volné radikály se dostávají do organismu zvenčí, velké množství však vzniká i v průběhu metabolismu. Podle toho rozdělujeme příčiny vzniku volných radikálů na exogenní a endogenní. K exogenním příčinám patří ionizující záření, UV-světlo, modré světlo, vysoký obsah škodlivin v ovzduší, kouření, intoxikace (polychlorované bifenyly, tetrachlormethan, chloroform, alkohol), potrava (volné radikály vznikají při tepelné úpravě, drcením, vlivem světla). Mezi endogenní příčiny patří vznik kyseliny močové (v reakci katalyzované xantioxidázou, např. při úrazech, nekrotách, pooperačních stavech), rozpad fagocytů a makrofágů (záněty, popáleniny), vznik methemoglobinu, syntéza prostaglandinů, zvýšený metabolismus

estrogenů, autooxidace thiolů, hyperglykémie, reperfuze po předchozí ischemii včetně svalového výkonu na kyslíkový dluh (Racek, 2003).

Metabolické procesy probíhající v játrech představují hlavní zdroj vzniku volných radikálů (Mandelker, 2009).

3.6.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Reaktivní formy kyslíku jsou molekuly či atomy vznikající redukcí kyslíku a zahrnují volné radikálové formy, ke kterým patří superoxid ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$, nejreaktivnější z kyslíkových forem, je schopen atakovat všechny typy biologicky významných molekul, lipidy, proteiny, DNA), alkoxy radikály ($\bullet\text{RO}$), peroxylové radikály ($\bullet\text{ROO}$), hydroperoxylový radikál ($\bullet\text{HO}_2$) a neradikálové formy jako je peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná (HOCl), ozon (O_3), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Reaktivní formy kyslíku jsou produkovány z větší části v rámci normálního mitochondriálního dýchání. Důležitou úlohu v radikálových reakcích mají přechodné kovy, které mohou být donory i akceptory elektronu, a tím i účinnými iniciátory vzniku volných radikálů. V lidském organismu se uplatňují především ionty železa a mědi ($\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ nebo $\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^+$) (Kameníková, 2000/2001; Mandelker, 2009).

Mezi volné radikálové formy dusíku patří oxid dusnatý ($\bullet\text{NO}$), oxid dusičitý ($\bullet\text{NO}_2$). Mezi látky náležící do skupiny reaktivních forem dusíku, ale které nejsou volnými radikály, řadíme peroxyinitrit (ONOO^-), alkylperoxyinitrit (ROONO), nitrosyl (NO^+), nitroxid (NO^-), nitronium (NO_2^+), oxid dusitý (N_2O_3), oxid dusičitý (N_2O_4), kyselinu dusitou (HNO_2) (Kameníková, 2000/2001).

3.6.3 Fyziologické působení radikálů

V řadě fyziologických reakcí vznikají v lidském těle volné radikály. Například v dýchacím řetězci v mitochondriích, při oxidativní deaminaci aminokyselin (vznik peroxidu vodíku). Při syntéze prostaglandinů se účastní kyslíkové radikály, vznikají endoperoxidy obdobně jako při lipoperoxidaci. Radikály vznikají také při metabolismu a detoxikaci xenobiotik (např. aromatických sloučenin, halogenovodíků), ale také antibiotik (tetracyklinů) a cytostatik (doxorubicin, dactinomycin) (Mandelker, 2009; Zima et al., 1996).

Granulocyty, eozinofily, monocyty a makrofágy mají ve své buněčné membráně enzymový komplex NADPH-oxidázy, který po aktivaci těchto buněk začne produkovat obrovské množství superoxidu za současné redukce cytoplazmatického NADPH. Jeho produkce se zdá nezbytná pro usmrcení fagocytovaných mikrobů. Neutrofilů mají ještě další baktericidní systém, enzym myeloperoxidázy, který z peroxidu vodíku a chloridových aniontů vytváří kyselinu chlornou. Tvorba kyslíkových radikálů se významně podílí na destrukci tkáně v místě zánětu, u autoimunitních chorob se tyto zbraně obracejí proti vlastní tkáni. Reaktivní formy kyslíku se mohou i jinak podílet na rozvoji zánětlivé reakce. Superoxid stimuluje adhezi neutrofilů, řada produktů oxidace lipidů může působit chemotakticky. Také endoteliální buňky produkují superoxid, který se pravděpodobně podílí s oxidem dusnatým na regulaci cévního tonu. V mírných hladinách hrají reaktivní formy kyslíku a dusíku důležitou regulační úlohu jako prostředníci v mnoha buněčných signalizačních procesech. Mnohé z těchto ROS-zprostředkovaných reakcí skutečně chrání buňky proti oxidačnímu stresu a obnovují „redox homeostázu“, normální rovnováhu oxidantů a antioxidantů v buňce. Vyšší organismy využívají oxid dusnatý a ROS jako signalizační molekuly v mnoha fyziologických funkcích. Patří sem např. sledování tenze kyslíku při kontrole ventilace, výroba erythropoetinu a přenos signálu z membránových receptorů v různých fyziologických procesech. Navíc jsou ROS nezbytné pro řadu biologických funkcí. Například peroxid vodíku je nepostradatelný pro správnou funkci štítné žlázy – pomáhá připojit atomy jodu k tyreoglobulinu při syntéze tyroxinu (Mandelker, 2009; Štípek et al., 2000; Zima et al., 1996).

3.6.4 Oxidační stres

Oxidační stres lze definovat jako stav, který se vyskytuje tam, kde dochází k významné nerovnováze mezi produkcí ROS a antioxidantními obrannými mechanismy. Obecné příčiny oxidačního stresu zahrnují toxemie, infekce, hypoxie-ischemie, hyperglykemie, xenobiotika, hyperlipidemie, hyperproteinemie, onkologické procesy, záněty, fagocytární a imunitní reakce a zvýšené metabolické aktivity. Podle všeho podléhá každá buňka v některém stadiu své existence oxidačnímu stresu (Mandelker, 2009).

3.6.5 Patologické působení radikálů

Volné kyslíkové radikály mohou reagovat se všemi biologicky významnými molekulami, s lipidy, proteiny, nukleovými kyselinami a sacharidy (Zima et al., 1996).

Dobře charakterizovaný je proces neenzymové, nespecifické peroxidace nenasycených mastných kyselin - lipoperoxidace. Tento děj tvoří kaskáda reakcí, na jejímž počátku volný radikál atakuje nenasycenou mastnou kyselinu. Tyto změny ve struktuře membránových lipidů vyvolávají změny v propustnosti membrán a významně naruší funkce membrán, jako je transport iontů, rozpoznávání a signalizace receptorů a osmotické gradienty. V průběhu lipoperoxidace vznikají také vedlejší toxické produkty dále poškozující organismus i vzdáleně od místa svého vzniku (např. malondialdehyd, alkany, alkeny, alkanaly, alkenaly apod.). Malondialdehyd vyvolává zesíťování a polymeraci proteinů a bází v DNA s možnými a následnými mutacemi a kancerogenním účinkem (Mandelker, 2009; Zima et al., 1996).

Lipoperoxidace a zesíťování proteinů v membránách jsou příčinou strukturního poškození a stárnutí buňky. Radikály poškozují proteiny nejčastěji oxidací SH-skupin aminokyselin s následnou změnou struktury proteinů, dále dochází k agregaci a síťování, k fragmentaci a štěpení. Oxidované proteiny jsou v buňce rychle proteolyticky degradovány. Rovněž dochází ke změně v transportu iontů a ke změnám v aktivitě enzymů. Reaktivní formy kyslíku ovlivňují syntézu kolagenu a polymeraci kyseliny hyaluronové s následným porušením bazální membrány a uvolněním endoteliálních buněk (Kameníková, 2000/2001; Zima et al., 1996).

Všechny složky DNA i RNA mohou být napadeny a poškozeny hydroxylovým radikálem nebo singletovým kyslíkem. Enzymy opravující poškozenou DNA lze považovat také za součást antioxidační ochrany. Radikálové poškození DNA může způsobit aktivaci protoonkogenu nebo inaktivaci nádorového supresorového genu, a mít tak za následek iniciaci, propagaci a progresi nádorového bujení. Tímto mechanismem se mohou uplatňovat volné radikály v procesu kancerogeneze (Zima et al., 1996).

Příklady patofyziologických stavů, u kterých se předpokládá významná účast radikálových reakcí na jejich patogenezi, jsou diabetes mellitus, peptický vřed, Crohnova nemoc, pankreatitida, glomerulonefritida, urémie, nefrotický syndrom,

poruchy štítné žlázy, ateroskleróza, ischemicko-reperfuzní poškození (nejvíce diskutováno je v kardiologii), mozková mrtvice, trombózy, některá nádorová onemocnění, artróza, rozvoj Parkinsonovy nemoci, Alzheimerovy nemoci, sklerózy multiplex, rychlé stárnutí, záněty, dokonce i poškození plodu, šedý zákal a další, včetně poškození svalů (Fořt, 2002; Kameníková, 2000/2001; Zima et al., 1996).

3.6.6 Antioxidační ochrana organismu

Lidský organismus vytvářel po dobu své fylogeneze ochranné antioxidační systémy, které za fyziologických podmínek postačují k inaktivaci volných radikálů. Antioxidační látky mohou vychytávat reaktivní radikály (přeměna superoxidu superoxiddismutázou) nebo inhibovat jejich tvorbu (blokování aktivace fagocytů vazbou iontů železa nebo mědi, prevencí vzniku hydroxylového radikálu, rozkladem lipidových hydroperoxidů, reparací poškození (tokoferol se váže na peroxylový radikál) anebo kombinací těchto možností (Zima et al., 1996).

Antioxidanty tvoří různorodou skupinu látek a je možné je dělit podle různých hledisek.

- **podle ovlivnění tvorby volných radikálů na primární** (brání vzniku VR – volných radikálů; např. inhibitory NADPH-oxidázy či xantinoxidázy, chelatační látky, inhibitory adheze neutrofilů), **sekundární** (likvidují již vzniklé VR; látky s redukčním účinkem, katalyzátory jako např. superoxiddismutáza), **terciární** (opravují či eliminují molekuly poškozené působením VR; např. enzymy zajišťující opravu poškozené DNA či mechanismy vylučující proteiny modifikované oxidací)
- **podle původu na endogenní** (tvořící se v organism) a **exogenní** (pocházející zvenčí)
- **podle rozpustnosti ve vodě a v tucích na hydrofilní** (rozpustné ve vodě; poměrně rychle se dostávají do organismu, ale nepronikají přes buněčnou membránu do buněk ani do CNS), **lipofilní** (rozpustné v tucích; dostávají se na místo účinku pomaleji, působí však v lipoproteinech a membránách) a **amfofilní** (spojují vlastnosti obou předchozích)
- **podle lokalizace na extracelulární a intracelulární**
- **podle velikosti molekuly na vysokomolekulární** (bílkoviny) a **nízkomolekulární**

- **podle mechanismu účinku na katalyzátory (enzymy), chelatační látky** (váží přechodné kovy; stejně působí i některé bílkoviny jako transferin, haptoglobin, laktoferin), **inhibitory enzymů a ostatní**
- **podle typu volného radikálu, na který působí – antioxidanty likvidující superoxid** (superoxiddismutáza), **hydroxylový radikál** (albumin, cholesterol, mannitol, dopamin, probucol), **singletový kyslík** (histidin, vitamin C, vitamin E, β -karoten, tryptofan), **peroxid vodíku** (glutathionperoxidáza, kataláza), **oxid dusnatý** (aminoguanidin, N-metyl-L-arginin), **kyselinu chlornou** (sulfasalazin, histidin, methionin, kyselina 6-aminosalicylová) (Racek, 2003).

Antioxidační systémy lze též rozdělit do dvou skupin: na **antioxidační enzymy** a **antioxidační substráty**. **Antioxidační enzymy** zahrnují superoxiddismutázu (SOD), glutathionperoxidázu (GPx), katalázu (CAT), laktoperoxidázu a mitochondriální cytochromoxidázový systém P-450. **Antioxidační substráty** můžeme dále dělit na membránové (lipofilní) – tokoferoly, karotenoidy (retinol, lutein, zeaxantin, lykopen), flavonoidy a polyfenoly (resveratrol, kvercetin, pycnogenol), koenzym Q10, kyselina lipoová - a na nemembránové (hydrofilní) – kyselina askorbová, glutathion, thioly, cystein, ceruloplazmin, transferin, albumin, kyselina močová, bilirubin, ferritin. Mezi antioxidační substráty patří dále sylimarin, astaxantin, melatonin a *Ginkgo biloba*, který má neuroprotektivní a protistárnoucí účinky (Kameníková, 2000/2001; Mandelker, 2009; Fořt, 2002; Zima et al., 1996).

Antioxidační enzymy patří mezi metaloproteiny a organismus k jejich syntéze potřebuje dostatečné množství stopových prvků jako je zinek, mangan, měď, selen, železo.

S řadou syntetických antioxidantů se setkáváme v potravinářských výrobcích. Nejčastěji se užívají fenolové deriváty: 2(3)-terc-butyl-4-hydroxyanizol (**BHA**) a 3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluen (**BHT**). Tyto látky inhibovaly vznik některých druhů nádorů, avšak ve vyšších koncentracích naopak působily kancerogenně a dále poškozovaly organismus. U těchto látek je třeba si uvědomit zvýšené riziko infekce, protože potlačují i fyziologické baktericidní působení radikálů (Zima et al., 1996).

3.6.7 Antioxidační terapie

Cílem by mělo být snížení incidence onemocnění v rámci prevence a při terapii pozitivní ovlivnění průběhu nemoci a rekonvalescence. Antioxidační látky mají bránit rozvoji radikálového poškození vychytáváním iniciujících radikálů, vázat přechodné kovy s následnou prevencí generování radikálů, odstraňovat peroxidy a bránit dalším reakcím aktivních radikálů, ale i reparovat vzniklá poškození. Je důležité vhodně zvolit antioxidant podle místa tvorby VR. Důležitá je rovněž vhodná doba podání antioxidantů i dávka antioxidantu (Racek, 2003; Zima et al., 1996).

Možnosti antioxidační terapie lze rozdělit na použití

- **antioxidačních enzymů**
- **antioxidačních substrátů**
- **stopových prvků**
- **kombinovaných přípravků** (kombinované multivitaminových přípravků, které někdy obsahují také stopové prvky)
- **syntetických antioxidantů**
- **léčiv s antioxidační aktivitou** (Zima et al., 1996).

Mezi syntetické antioxidanty patří **chelatační látky** - chelátory - mohou snižovat tvorbu volných radikálů vyvázáním přechodných kovů, především volného železa, event. mědi. Patří zde např. Na₂EDTA, desferoxamin, penicillamin a dexrazoxan, který působí kardioprotektivně při chemoterapii (Zima et al., 1996).

Dalšími syntetickými antioxidanty jsou **inhibitory xantioxidoreduktázy** (XOD) -allopurinol, oxypurinol a dále kyselina listová, pterin-6-aldehyd, amflutizol a wolfram. **Inhibitory NADPH-oxidázy** - mezi tyto inhibitory tvorby radikálů enzymem NADPH-oxidázou v neutrofilech a makrofázích patří nesourodá řada látek: adenosin, lokální anestetika, blokátory kalciového kanálu, nesteroidní antiflogistika a také monoklonální protilátky proti NADPH-oxidáze. **Antineutrofilní látky** - antineutrofilní sérum, antiadhezní látky a PAF (platelet activating factor) inhibují adhezi neutrofilů k endotelu buněk a následný rozvoj zánětlivé reakce s tvorbou radikálů. **Thioly** chrání před ionizujícím zářením. Mezi thioly řadíme GSH (glutathion) a jeho prekurzory (cystein, cysteamin), dále dimercaprol a mercaptopropionylglycin (MPG). Acetylcystein (N-acetylcystein) má ochranné antioxidační účinky prokázané ve studiích *in vitro*. Redukovaná forma **kyseliny**

lipoové - kyselina dihydrolipoová - má schopnost vychytávat superoxid a hydroxylový radikál *in vitro*. Dietní suplementace kyselinou lipoovou preventivně chrání před vznikem ischemicko-reperfuzního poškození, preventivně působí též u diabetes mellitus. **Probucol** je lapačem hydroxylového radikálu, snižuje hladinu cholesterolu a inhibuje tvorbu oxidativně modifikovaného LDL (low density lipoprotein). Tímto mechanismem působí antiskleroticky (Zima et al., 1996).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POTŘEBY

4.1.1 Rozpouštědla

Ethanol (EtOH)

Chloroform (CHCl₃)

Voda superčistá (voda)

4.1.2 Chemikálie

Acetylthiocholin jodid

2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS)

Butyrylthiocholin jodid

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

Dusičnan bismutitý zásaditý

Folin-Ciocalteu činidlo (F-C činidlo)

Fosfátový pufr pH 7,4

Galantamin hydrobromid, (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Huperzin A, (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

Jodid draselný

Kyselina askorbová

Kyselina gallová

Kyselina vinná

Persulfát draselný

Skulerin

Trolox

Uhličitan sodný

4.1.3 Přístrojové vybavení

- Počítačově řízený (pomocí programu FIALab for Windows 5.0) FIALab 3000 analyzátor (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) opatřený pístovým čerpadlem o objemu 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, USB2000-UV/VIS spektrofotometrem s halogenovou lampou LS-1 (Ocean Optics, USA) a průtokovou detekční celou SMA-Z s optickou délkou 1 cm; objem mísící cívky je 0,6 ml a spojovací teflonové hadičky (PTFE; Watrex, Prague, Czech Rep.) mají průměr 0,72 mm.
- Spektrofotometr Shimadzu UV-1611 (Shimadzu, Columbia, Maryland, USA)
- Ultrazvuková lázeň SONOREX Super 10P (Bandelin, Německo).
- Vakuová odparka Rotavapor R-114 a vodní lázeň Waterbath B-480 (Büchi, Švýcarsko).

4.1.4 Detekční činidlo

Dragendorffovo činidlo podle Muniera

Roztok A: 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody.

Roztok B: 16 g jodidu draselného bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody.

Zásobní roztok byl připraven smícháním roztoku A a B v poměru 1:1 (v/v), který může být uchováván po několik měsíců v lednici.

Detekční roztok byl připraven rozpuštěním 10 g kyseliny vinné v 50 ml destilované vody a přidáním 5 ml zásobního roztoku. Alkaloidy byly po reakci s detekčním činidlem zbarveny oranžově (Stahl, 1969).

4.1.5 Vyvíjecí soustava pro tenkovrstvou chromatografii

S: CHCl_3 + EtOH (95%) (50:50)

4.1.6 Chromatografický adsorbent

TLC desky - oxid hlinitý 60, F₂₅₄, neutrální (Merck, Německo)

4.1.7 Testované druhy hub

V této rámci práce byly testovány sumární extrakty z:

Cortinarius alboviolaceus, *Cortinarius anomalus*, *Cortinarius armillatus*,
Cortinarius bolaris, *Cortinarius infractus*, *Cortinarius malachus*, *Cortinarius mucosus*,
Cortinarius multififormis, *Cortinarius pholideus*, *Cortinarius traganus*,
Cortinarius triumphans, *Cortinarius trivialis*, *Cortinarius varius*, *Cortinarius venetus*,
Cortinarius violaceus.

4.2 METODY

4.2.1 Příprava extraktů

V experimentech byly použity extrakty, které byly připraveny v rámci předešlých diplomových prací vypracovaných na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie. Pro ilustraci je níže popsána příprava extraktů.

Navážený očištěný vzorek plodnice hub (max. 15 g) byl po rozmixování extrahován 70% EtOH (poměr houby (g) : 70% EtOH (ml) = 1 : 15). Extrakce probíhala sonikací v ultrazvukové lázni při laboratorní teplotě, stupni intenzity 10, po dobu 30 minut. Filtrací byl oddělen pevný podíl od extraktu a pevný podíl byl promyt třikrát 10 ml 70% EtOH. Filtrát byl zahuštěn na vakuové rotační odparce při teplotě 50 °C až do odstranění ethanolu. Do baňky bylo přilito cca 10 ml superčisté vody a roztok byl zfiltrován přes křemelinu na filtračním tubusu za sníženého tlaku do 100 ml baňky. Filtrační vrstva byla promyta třikrát 5 ml superčisté vody. Extrakt byl částečně odpařen, dobře uzavřen a uschován v lednici. Poté následovala lyofilizace. Lyofilizát byl umístěn přes noc do exikátoru, kde došlo k odstranění zbytkové vody. Lyofilizovaný extrakt byl přeplněn do penicilinek, převrstven argonem a uzavřen. Takto připravené extrakty se uchovávají v mrazničce a jsou výchozím materiálem pro stanovení biologické aktivity a pro další hodnocení.

4.2.2 Důkaz obsahu alkaloidů barevnou reakcí na TLC

Vzorky pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly připraveny rozpuštěním 10 mg lyofilizátu v 1 ml 50% EtOH. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografické komoře sycené 60 minut parami eluční soustavy.

Adsorbent: TLC desky - oxid hlinitý 60, F₂₅₄, neutrální (Merck, Německo)

Dráha: 80 mm

Soustava: $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ (95%) (50:50)

Dráhy jednotlivých vzorků hub 1 - 15 (viz. tabulka 2)

Standard: skulerin

Detekční činidlo: Dragendorffovo činidlo podle Muniera

4.2.3 Stanovení inhibiční aktivity houbových extraktů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

Pro stanovení inhibiční aktivity (IC_{50}) byla použita Ellmanova kolorimetrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) modifikovaná podle Bajgara. Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH-skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB. Výsledný produkt je žlutě zbarvený a stanovuje se spektrofotometricky při vlnové délce 436 nm. Sleduje se nárůst absorbence za jednu minutu. Výhodou této metody je specifita reakce, jednoduchost provedení a vysoká citlivost, která dovoluje zaznamenat i minimální změny aktivity. Metoda je použitelná jak pro malé množství vzorku tkáně, tak pro nízké koncentrace enzymu (Bajgar, 1972; Ellman et al., 1961).

4.2.3.1 Materiál

Jako zdroj acetylcholinesterázy byla použita pouzdra lidských erytrocytů. Zdrojem butyrylcholinesterázy byla lidská plazma.

4.2.3.2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

Spektrofotometr Shimatzu UV-1611 (Shimatzu, Columbia, Maryland, USA)

4.2.3.3 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při laboratorní teplotě
- v prostředí fosfátového pufru (pH 7,4)
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v jednorázových polystyrénových kyvetách (optická délka 10 mm)

4.2.3.4 Příprava erythrocytárních pouzder

Erythrocytární pouzdra byla připravena z čerstvě odebrané krve, ke které byl přidán 1 ml citrátu sodného na 10 ml krve podle upravené metody Stecka a Kanta (Steck, Kant, 1974). Plazma (HuBuChE) byla odstraněna z plné krve centrifugací při rychlosti 4 000 ot./min za použití centrifugy Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611. Erythrocyty byly přemístěny do 50 ml zkumavek a třikrát promyté 5 mM fosfátovým pufrem (pH 7,4) obsahujícím 150 mM chloridu sodného (12 000 ot./min, Avanti J-301, rotor JA-30.50). Promyté erythrocyty byly míchány s 5 mM fosfátovým pufrem (pH7,4) po dobu 10 minut, čímž došlo k jejich lýze. Následně byly centrifugovány rychlostí 20 000 ot./min a vzniklá pouzdra (HuAChE) byla třikrát promyta fosfátovým pufrem.

4.2.3.5 Postup práce

Nejprve byl připraven slepý vzorek. Do kyvety bylo postupně přidáno 10-25 μ l erythrocytárních pouzder nebo plazmy, 200 μ l 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB), 25 μ l rozpouštědla (50% EtOH) a doplněno na objem 900 μ l pufrem (0,1 M fosfátový pufr pH 7,4). Následně bylo přidáno 100 μ l substrátu (acetylthiocholin jodid nebo butyrylthiocholin jodid). Nárůst absorbance byl měřen při vlnové délce 436 nm po dobu jedné minuty. Měření bylo prováděno ve třech opakováních. Pro výpočet poklesu nárůstu absorbance byla použita průměrná hodnota.

Poté byl připraven testovaný vzorek. Do kyvety bylo postupně přidáno 10-25 μ l erythrocytárních pouzder nebo plazmy, 200 μ l 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB), 25 μ l testovaného vzorku v různých koncentracích a doplněno na objem 900 μ l pufrem (0,1 M fosfátový pufr pH 7,4). Následně bylo přidáno 100 μ l substrátu (acetylthiocholin jodid nebo butyrylthiocholin jodid). Nárůst absorbance byl měřen

při vlnové délce 436 nm po dobu jedné minuty. Měření bylo prováděno ve třech opakováních.

Pokles ΔA (nárůstu absorbance) byl vypočten podle vzorce

$$\% \text{ pokles } \Delta A = 100 - (\Delta A_{SA} / \Delta A_{BL} * 100)$$

ΔA_{SA} – nárůst absorbance za 1 minutu u měřeného vzorku

ΔA_{BL} – nárůst absorbance za 1 minutu u slepého vzorku

Z vypočtených hodnot byla pomocí statistického programu GraphPad sestrojena křivka, ze které byla odečtena hodnota IC_{50} . Výsledky byly porovnány s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteráz: galantaminem (IC_{50} HuAChE = $2,59 \pm 0,15$ $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE = $58,02 \pm 2,34$ $\mu\text{g/ml}$), huperzinem A (IC_{50} HuAChE = $0,061 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE >500 $\mu\text{g/ml}$).

4.2.4 Stanovení antioxidační aktivity ABTS^{•+} testem s využitím SIA

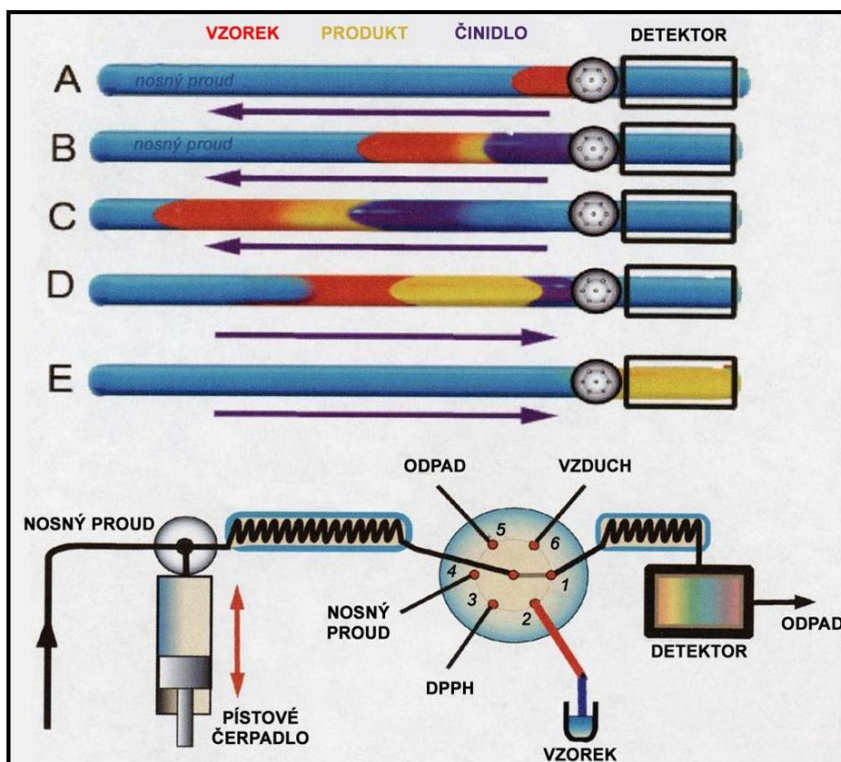
Metoda stanovení antioxidační aktivity je založena na odbarvení vzorku působením antioxidantu. Radikál ABTS^{•+} vzniká oxidací ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) persulfátem draselným a je redukován za přítomnosti vodičů dodávajících antioxidantů. Tvorba ABTS^{•+} vytváří základ jedné ze spektrofotometrických metod, které byly použity pro měření antioxidační aktivity roztoků čistých látek, vodných směsí. Tato technika tvorby ABTS^{•+} zahrnuje produkci zelenomodrého ABTS^{•+} chromoforu během reakce ABTS a persulfátu draselného. Přidáním antioxidantu ke vzorku dojde k redukci ABTS^{•+} na ABTS, rozsah záleží na antioxidační aktivitě, na koncentraci antioxidantu a délce reakce. Redukce ABTS^{•+} je doprovázena poklesem absorbance při charakteristické vlnové délce. Absorpční maximum pro ABTS^{•+} je při 734 nm. Metoda je použitelná jak pro antioxidanty rozpustné ve vodě, tak antioxidanty rozpustné v tucích, čisté látky i extrakty (Re et al., 1999).

Tato metoda byla modifikována pro použití sekvenční injekční analýzy (SIA). SIA patří do skupiny průtokových technik, které umožňují racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami.

Analyt, který je obsažený v roztoku, je nutno převést na detekovatelný produkt reakcí s činidlem a změřit vhodnou analytickou vlastnost tohoto produktu. Pro SIA jsou charakteristické oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně aspirovány do jednonálového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru. Tím je jeden cyklus ukončen. Analytický signál je registrován ve formě píku. Jde o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem.

Systém je tvořen jednonálovým dvousměrným pístovým čerpadlem, vícecestným selekčním ventilem, vhodným detektorem, mísící cívkou a spojovacím materiálem (obvykle plastické hadičky). SIA systém pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. Přesná synchronizace a opakovatelnost těchto kroků je nutnou podmínkou k dosažení reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému a tím i k získání reprodukovatelného koncentračního gradientu reakčního produktu, resp. odpovědi detektoru. Nezbytnou součástí SIA systému musí být i vhodný mikroprocesor (nejlépe PC) s příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data.

V praxi se SIA uplatňuje při stanovení některých anorganických iontů ve vodě různého původu za účelem kontrol její kvality, stanovení obsahu herbicidů, které ovlivňují životní prostředí. Rovněž se využívá při určování stopových množství některých těžkých kovů, monitorování hladin léčiv nebo jejich metabolitů v tělních tkáních, sledování odpovědi buněk, membrán či orgánů na různé vnější podněty. Potenciál SIA je značný a nadále se bude rozšiřovat (Paseková et al., 1999).



Obrázek 16: Princip SIA (Manuál k přístroji FIALab 3000 analyser)

4.2.4.1 Přístroj použitý pro stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS⁺⁺

Počítačově řízený (pomocí programu FIALab for Windows 5.0) FIALab 3000 analyzátor (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA) opatřený pístovým čerpadlem o objemu 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, USB2000-UV/VIS spektrofotometrem s halogenovou lampou LS-1 (Ocean Optics, USA) a průtokovou detekční celou SMA-Z s optickou délkou 1 cm; objem mísící cívky je 0,6 ml a spojovací teflonové hadičky (PTFE; Watrex, Prague, Czech Rep.) mají průměr 0,72 mm.

4.2.4.2 Program

Pokus 60s 70 micro.fia

4.2.4.3 Podmínky měření

Experiment byl prováděný za těchto podmínek:

- při laboratorní teplotě
- při vlnové délce spektrofotometru 734 nm

4.2.4.4 Postup práce

Byl připraven roztok ABTS⁺ radikálu. Roztok byl získán přidáním 2.4 mM roztoku persulfátu draselného (K₂S₂O₈) k 7 mM roztoku ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny). Přes noc, kdy byla směs ponechána při pokojové teplotě, došlo k vytvoření ABTS⁺ radikálu. Bylo odpipetováno 500 µl do mikroskopické kádinky a uloženo v mrazničce.

Jako rozpouštědlo pro přípravu vzorků, jako slepý vzorek a jako nosný proud v systému byl použit 50% EtOH (tato metoda byla v naší laboratoři optimalizována pro výše uvedené rozpouštědlo).

Před samotným měřením byl nejprve změřen slepý vzorek (hodnota poklesu absorbance by měla být cca 0,7 ± 0,02). Následně byl změřen standard – trolox – postupně v koncentracích od c = 0,01 až c = 0,07 mM. Z hodnot závislosti procentuálního poklesu absorbance na koncentraci troloxu byla sestrojena přímka lineární regrese o určitém sklonu pomocí programu GraphPad Prism 5.02 ($R^2 > R^2 > R^2 > 0,98$). Jako poslední byly měřeny vzorky houbových extraktů, aby jejich aktivita byla cca 20-80%. Vzorky byly odvzdušněny v ultrazvukové lázni. Poté byly sestrojeny přímky závislosti aktivity vzorků na koncentraci jednotlivých vzorků (opět pomocí programu GraphPad Prism 5.02, $R^2 > 0,98$). Všechna měření byla prováděna ve třech opakováních a absorbance byla měřena při vlnové délce 734 nm.

Antioxidační aktivita byla vyjádřena pomocí vzorce:

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

Pro srovnání byla změřena antioxidační aktivita kyseliny askorbové.

4.2.5 Stanovení celkového množství fenolických látek

Ke stanovení celkového množství fenolických látek v houbových extraktech se používá Folin-Ciocalteu metoda. Ke vzorku je přidáno žlutě zbarvené F-C činidlo a uhličitan sodný. Výsledný produkt je zbarvený modře a pomocí spektrofotometru je změřena jeho absorbance při charakteristické vlnové délce 765 nm. Snížení absorbance produktu souvisí s koncentrací fenolických látek v testovaném vzorku. Množství fenolických látek se porovnává se standardem, v tomto případě kyselinou gallovou (Singleton, Rossi, 1965).

4.2.5.1 Příklad použitého pro stanovení celkového množství fenolických látek

Spektrofotometr Shimadzu UV-1611 (Shimadzu, Columbia, Maryland, USA)

4.2.5.2 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při laboratorní teplotě
- při vlnové délce spektrofotometru 765 nm
- v jednorázových polystyrénových kyvetách (optická délka 10 mm)

4.2.5.3 Postup práce

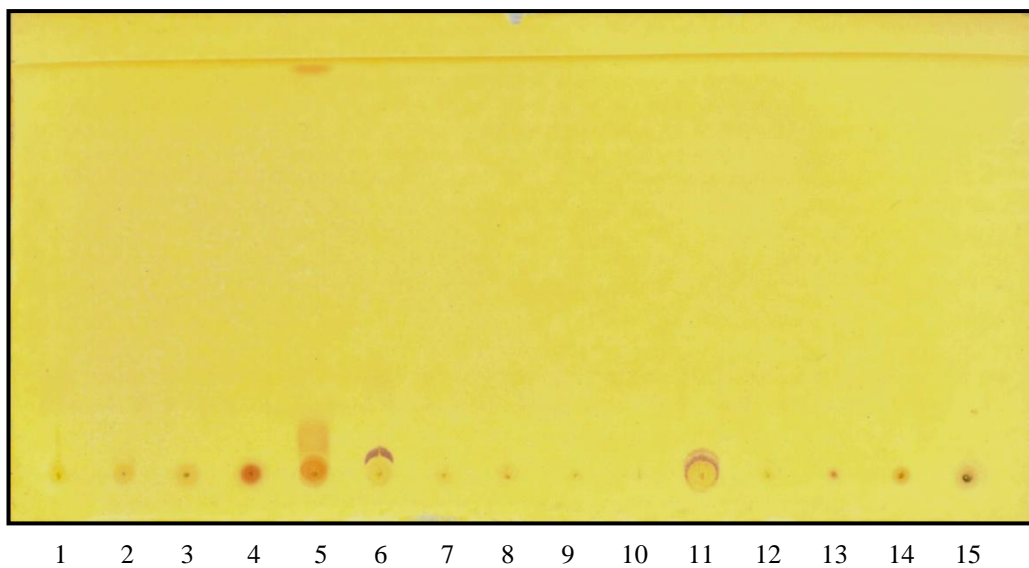
Nejprve byla naměřena kalibrační křivka. Na její přípravu bylo smícháno 125 μ l ethanolického roztoku kyseliny gallové o koncentracích 0,025 – 0,25 mg/ml s 625 μ l FC činidla (Folin-Ciocalteu) a 500 μ l 7,5% uhličitanu sodného. Směs byla ponechána 30 minut při pokojové teplotě a poté byla odečtena absorbance při vlnové délce 765 nm.

Dále byly měřeny vzorky houbových extraktů. 125 μ l ethanolického extraktu (1 mg/ml) bylo smícháno s 625 μ l FC činidla (Folin-Ciocalteu) a 500 μ l 7,5% uhličitanu sodného a po 30 minutách, kdy byly vzorky ponechány při pokojové teplotě, byla měřena absorbance při 765 nm. Všechna měření byla prováděna ve třech opakováních.

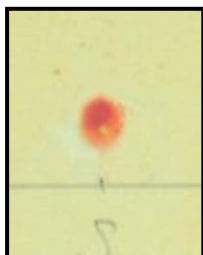
Celkový obsah fenolických látek byl odečten z kalibrační křivky pomocí programu UV Probe a vyjádřen jako ekvivalentní množství kyseliny gallové na mg extraktu (GAE/mg).

5. VÝSLEDKY

5.1 VYHODNOCENÍ REAKCÍ PRO DETEKCI NA ALKALOIDY



Obrázek 17: Detekce na alkaloidy



Obrázek 18: Barevná reakce standardu skulerinu

Vysvětlivky k tabulce 2

ST + pozitivní reakce na detekci na startu

ST 0 pozitivní reakce na startu nebyla po detekci pozorována

X+ počet pozitivních reakcí na detekci na dráze (X=1,2,3...)

0 žádná pozitivní reakce na detekci na dráze

Tabulka 2: Pozitivní reakce na detekci u sledovaných taxonů

Číslo vzorku	Taxon	Detekce na alkaloidy
1	<i>Cortinarius alboviolaceus</i>	ST 0, 0
2	<i>Cortinarius anomalus</i>	ST 0, 0
3	<i>Cortinarius armillatus</i>	ST 0, 0
4	<i>Cortinarius bolaris</i>	ST 0, 0
5	<i>Cortinarius infractus</i>	ST 0, 1+
6	<i>Cortinarius malachius</i>	ST 0, 0
7	<i>Cortinarius mucosus</i>	ST 0, 0
8	<i>Cortinarius multiformis</i>	ST 0, 0
9	<i>Cortinarius pholideus</i>	ST 0, 0
10	<i>Cortinarius traganus</i>	ST 0, 0
11	<i>Cortinarius triumphans</i>	ST 0, 0
12	<i>Cortinarius trivialis</i>	ST 0, 0
13	<i>Cortinarius varius</i>	ST 0, 0
14	<i>Cortinarius venetus</i>	ST 0, 0
15	<i>Cortinarius violaceus</i>	ST 0, 0

5.2 VÝSLEDKY STANOVENÍ INHIBIČNÍ AKTIVITY HOUBOVÝCH EXTRAKTŮ VŮČI ERYTROCYTÁRNÍ AChE A SÉROVÉ BuChE

Tabulka 3: Výsledky cholinesterázové inhibiční aktivity

Taxon	AChE		BuChE	
	% pokles ΔA $c = 0,5 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} \text{ } \mu\text{g/ml}$	% pokles ΔA $c = 0,5 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} \text{ } \mu\text{g/ml}$
<i>C. alboviolaceus</i>	0	> 500	0	> 500
<i>C. anomalus</i>	0	> 500	$7,25 \pm 0,34$	> 500
<i>C. armillatus</i>	$9,29 \pm 0,39$	> 500	$6,08 \pm 2,03$	> 500
<i>C. bolaris</i>	$60,35 \pm 1,47$	308,1	$28,48 \pm 1,63$	> 500
<i>C. infractus</i>	$91,96 \pm 0,06$	7,9	$50,98 \pm 0,89$	482,6
<i>C. malachius</i>	0	> 500	0	> 500
<i>C. mucosus</i>	$15,86 \pm 1,14$	> 500	$24,75 \pm 0,63$	> 500
<i>C. multiformis</i>	$9,14 \pm 0,96$	> 500	$11,44 \pm 1,39$	> 500
<i>C. pholideus</i>	$9,91 \pm 0,32$	> 500	$6,42 \pm 0,46$	> 500
<i>C. traganus</i>	$6,93 \pm 0,36$	> 500	$12,08 \pm 0,63$	> 500
<i>C. triumphans</i>	0	> 500	$9,50 \pm 0,07$	> 500
<i>C. trivialis</i>	0	> 500	$10,59 \pm 1,21$	> 500
<i>C. varius</i>	$22,86 \pm 0,29$	> 500	$26,75 \pm 1,04$	> 500
<i>C. venetus</i>	$25,86 \pm 1,43$	> 500	$10,90 \pm 0,69$	> 500
<i>C. violaceus</i>	$9,50 \pm 0,93$	> 500	$20,97 \pm 1,55$	> 500

Tabulka 4: Hodnoty cholinesterázové inhibiční aktivity standardů

Standard	HuAChE	HuBuChE
	$IC_{50} \text{ } \mu\text{g/ml}$	$IC_{50} \text{ } \mu\text{g/ml}$
galantamin	$2,59 \pm 0,15$	$58,02 \pm 2,34$
huperzin A	$0,061 \pm 0,01$	>500

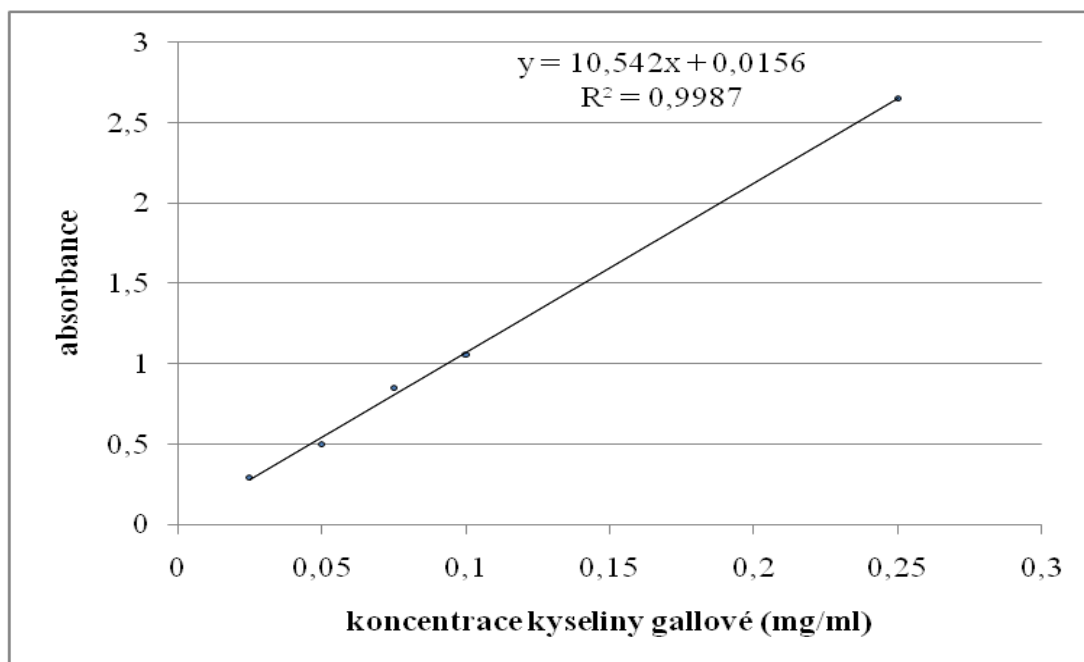
5.3 VYHODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY HOUBOVÝCH EXTRAKTŮ

Tabulka 5: Hodnoty antioxidačních aktivit u sledovaných taxonů

Taxon	ABTS ⁺⁺
	TE mM
<i>C. alboviolaceus</i>	0,017
<i>C. anomalus</i>	0,052
<i>C. armillatus</i>	0,060
<i>C. bolaris</i>	0,219
<i>C. infractus</i>	0,106
<i>C. malachius</i>	0,022
<i>C. mucosus</i>	0,015
<i>C. multiformis</i>	0,050
<i>C. pholideus</i>	0,033
<i>C. traganus</i>	0,036
<i>C. triumphans</i>	0,050
<i>C. trivialis</i>	0,028
<i>C. varius</i>	0,015
<i>C. venetus</i>	0,029
<i>C. violaceus</i>	0,066
kyselina askorbová	5,987
trolox	1,000

5.4 VÝSLEDKY STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ FENOLICKÝCH LÁTEK

Graf 1: Kalibrační křivka pro měření celkového množství fenolických látek



Tabulka 6: Celkové množství fenolických látek

Taxon	celkové množství fenolických látek
	průměr $\mu\text{gGA}/\text{mg} \pm \text{SD}$
<i>C. alboviolaceus</i>	5,00 \pm 0,00
<i>C. anomalus</i>	17,67 \pm 0,47
<i>C. armillatus</i>	14,33 \pm 0,47
<i>C. bolaris</i>	38,33 \pm 2,36
<i>C. infractus</i>	20,67 \pm 1,25
<i>C. malachius</i>	4,67 \pm 0,47
<i>C. mucosus</i>	9,00 \pm 2,16
<i>C. multiformis</i>	10,00 \pm 0,82
<i>C. pholideus</i>	7,00 \pm 0,00
<i>C. traganus</i>	8,67 \pm 0,47
<i>C. triumphans</i>	12,33 \pm 0,47
<i>C. trivialis</i>	4,67 \pm 0,47
<i>C. varius</i>	8,33 \pm 1,25
<i>C. venetus</i>	16,00 \pm 0,00
<i>C. violaceus</i>	26,00 \pm 0,00

6. DISKUZE

Tato rigorózní práce byla vytvořena s cílem zjistit taxony hub, které vykazují signifikantní hodnoty antioxidační aktivity. Zjistit možný vztah mezi obsahem fenolických látek a antioxidační aktivitou. V neposlední řadě také zjistit taxony s potenciální inhibiční aktivitou vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE. Práce je součástí fytochemického výzkumu vyšších hub probíhajícího na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie.

Látky, které působí proti oxidačnímu stresu, se nazývají antioxidanty. Při oxidačním stresu dochází k nerovnováze mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a dusíku a antioxidačními obrannými mechanismy organismu. Tato nerovnováha a negativní vliv reaktivních forem kyslíku a dusíku se podílí na vzniku a rozvoji mnoha chorob jako je diabetes mellitus, peptický vřed, Crohnova nemoc, nefrotický syndrom, urémie, ateroskleróza, ischemicko-reperfúzní poškození, skleróza multiplex, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc a další. Antioxidanty se uplatňují v terapii těchto chorob, spíše však jako léčba doplňková (Kameníková, 2000/2001; Maldeker, 2009; Zima et al., 1996).

Alzheimerova nemoc je progresivní neurologické onemocnění, které se projevuje poruchami paměti, chování a postižením běžných životních činností. Při Alzheimerově nemoci dochází ke ztrátě cholinergních neuronů a snížení hladiny acetylcholinu. Při léčbě Alzheimerovi nemoci se využívají inhibitory cholinesteráz a inhibitory NMDA receptorů. Doplnkově se používají antipsychotika a antidepresiva. Použití nootropik, extraktů z *Ginkgo biloba*, látek zvyšujících tvorbu nervových růstových faktorů a antioxidantů se využívá v daleko menší míře. Antioxidanty jsou obsaženy jak v každodenní stravě, tak v celé řadě potravních doplňků a některých druhů hub (Bednařík et al., 2010; Jedlička et al., 2005; Jiráček, 2009; Kameníková, 2000/2001).

Houby našly své uplatnění v medicíně. Látky v nich obsažené mají antibiotické, antivirové, antiparazitické, cytotoxické a antioxidační účinky. Plodnice jedlých druhů makromycetů jsou součástí lidské výživy s vysokým obsahem bílkovin, minerálních látek a vitamínů. Díky aromatickým látkám podporují vyměšování trávicích šťáv. Vláknina příznivě působí na střevní peristaltiku. Negativní vlastností některých druhů hub je jejich napadání živých organismů. Určité druhy hub obsahují toxické

látky, které způsobují otravy. Mezi tyto houby se řadí i některé pavučince, jejichž hlavními toxiny jsou orelaniny (Keizer, 1998; Klán, 1989; Mikulcová, 2006).

V této práci byly použity již připravené extrakty získané z plodnic hub postupem uvedeným v kapitole 4.2.1. Příprava extraktů. Tyto extrakty byly připraveny v rámci předešlých diplomových prací vypracovaných na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie.

Ethanolické extrakty hub byly podrobeny tenkovrstvé chromatografii (TLC). Bylo nutné zvolit vhodnou vyvíjecí soustavu. Soustava ve složení toluen + CHCl_3 + EtOH + Et_2NH_4 (70:20:10:4) nevyhovovala. Použití soustavy obsahující samotný chloroform nevedlo k dostatečnému rozdělení extraktů. Soustava ve složení CHCl_3 + EtOH (50:50) již umožnila vyhovující dělení extraktů.

Na základě provedené tenkovrstvé chromatografie je možné vyvodit následující závěr:

Pozitivní reakci na dráze na detekci alkaloidy (s využitím Dragendorffova činidla podle Muniera, obrázek 17) vykazoval pouze *C. infractus*. Z tohoto druhu byly již dříve izolovány alkaloidy (Geissler et al., 2010), jak již bylo zmíněno v tabulce 1.

Při screeningu antioxidační aktivity byla použita metoda, při níž se využívá znalosti barevné reakce mezi $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radikálem a antioxidantem (dochází k odbarvení roztoku radikálu v důsledku interakce s analytem).

Metoda použitá při tomto stanovení byla modifikována pro použití se SIA za použití přístroje FIALab 3000 analyzátor (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA). Tato metoda je vhodná pro testování velkého množství lyofilizovaných houbových extraktů díky své rychlosti a možnosti použití pouze malého množství vzorku.

Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval extrakt z *C. bolaris*, druhý nejúčinnější byl extrakt z *C. infractus* a třetí nejúčinnější byl extrakt z *C. violaceus* (tabulka 5).

Při porovnání se standardním antioxidantem, kyselinou askorbovou (tabulka 5), jsou naměřené hodnoty antioxidační aktivity natolik nízké, že tyto extrakty není možné považovat za vhodný zdroj antioxidačně působících látek.

Je možné pozorovat určitou souvislost mezi antioxidační aktivitou a obsahem fenolických látek. Extrakt s nejvyšším obsahem fenolických látek byl extrakt z *C. bolaris*, druhý byl extrakt z *C. violaceus* a třetí byl extrakt z *C. infractus*

(tabulka 6), což naznačuje, že fenolické látky obsažené v extraktech mohou být zodpovědné za jejich antioxidační aktivitu.

Pro stanovení inhibiční aktivity (IC_{50}) vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) modifikovaná podle Bajgara. Při stanovení se využívá barevné reakce mezi SH- skupinou thiocholinu a DTNB (vzniká žlutě zbarvený produkt). Tato metoda je velice citlivá a jednoduchá na provedení. Nejvyšší koncentrace použitá při tomto měření byla 0,5 mg/ml.

Nejvyšší inhibiční aktivitu vůči erythrocytární AChE vykazoval extrakt z *C. infractus*, druhý byl extrakt z *C. bolaris* (tabulka 3). Nejvyšší inhibiční aktivitu vůči sérové BuChE vykazoval extrakt z *C. infractus* (tabulka 3). Z druhu *C. infractus* byly již v minulosti izolovány dvě účinné látky s cholinesterázovou inhibiční aktivitou (Geissler et al., 2010). Ve srovnání s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů cholinesteráz (galantaminem (IC_{50} HuAChE = $2,59 \pm 0,15$ $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE = $58,02 \pm 2,34$ $\mu\text{g/ml}$), huperzinem A (IC_{50} HuAChE = $0,061 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE >500 $\mu\text{g/ml}$)) je inhibiční aktivita extraktu z *C. infractus*, která je řádově srovnatelná s inhibiční aktivitou galantaminu, významná. Inhibiční aktivita extraktu z *C. bolaris* je sice nižší, ale není zanedbatelná.

7. ZÁVĚR

Předložená práce byla zaměřena na kvantifikaci antioxidační aktivity, kvantifikaci cholinesterázové inhibiční aktivity, kvantifikaci celkového množství fenolických látek a zjištění přítomnosti alkaloidů v extraktech hub rodu *Cortinarius*.

Rod *Cortinarius* byl pro tuto práci vybrán proto, že z druhu *C. infractus* byly již dříve izolovány dvě účinné látky s cholinesterázovou inhibiční aktivitou. Cílem tedy bylo prověřit, zda se podobné účinné látky vyskytují i v jiných druzích rodu *Cortinarius*. Bohužel bylo zjištěno, že přítomnost těchto látek je pravděpodobně specifická pouze pro jeden nebo maximálně dva z testovaných druhů (*C. infractus* a *C. bolaris*).

Extrakt z *C. infractus* má poměrně vysokou cholinesterázovou inhibiční aktivitu. Uvážíme-li, že jde o sumární extrakt, lze předpokládat, že čistá účinná látka izolovaná z tohoto druhu bude mít ještě vyšší anticholinesterázovou aktivitu. Proto se tento druh jeví vhodný pro další testování a zkoumání s možností využití získaných poznatků v budoucnu například při léčbě Alzheimerovy nemoci.

Jak bylo v práci zjištěno, obsah fenolických látek vyskytujících se v houbových extraktech by mohl mít souvislost s antioxidační aktivitou těchto extraktů. Nejvyšší obsah fenolických látek byl prokázán u druhu *C. bolaris*, *C. violaceus* a *C. infractus*. A právě tyto extrakty byly také antioxidačně nejvíce aktivní.

Bohužel zjištěné hodnoty antioxidační aktivity testovaných druhů hub rodu *Cortinarius* nebyly nijak významné. Proto se tyto houby a extrakty z nich nejeví jako možný zdroj antioxidačně aktivních látek a jejich využití jako antioxidantů do budoucna není příliš perspektivní.

Obsah alkaloidů byl detekován pouze u druhu *C. infractus*. U ostatních testovaných druhů nebyla přítomnost alkaloidů prokázána.

8. LITERATURA

ANTONÍN, V. *Encyklopedie hub a lišejníků*. 1. vyd. Praha: Libri: Academia, 2006. 472 s. ISBN 80-7277-164-7 (Libri), ISBN 80-200-1476-4 (Academia). s. 243, 246, 255.

ANTONÍN, V., KOTLABA, F. *Houby: česká encyklopedie: neobvyklá kniha o světě hub u nás i v cizině, praktická příručka houbaře pro určování, sběr, ochranu, pěstování a zpracování hub*. 1 vyd. Praha: Reader's Digest Výběr, 2003. 448 s. ISBN 80-86196-71-2. s. 253, 256-257.

ARCHARD, M.A., GILL, M., STRAUCH, R.J., 1985. Anthraquinones from the genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*. 24 (11), 2755-2058.

BADALYAN, S.M., RAPIOR, S., DOKO, L., LE QUANG, J., JACOB, M., SERRANO, J.J., ANDARY, C., 1994. Investigation of primary and secondary metabolites in a chemical study of *Cortinarius armillatus* (*Cortinariaceae*, *Telamonia*). *Cryptogamie Mycologie*. 15 (4), 223-228.

BAJGAR, J., 1972. Stanovení activity cholinesteráz v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské zdravotnické listy*. 41 (2), 78-80.

BEATTIE, K.D., ROUF, R., GANDER, L., MAY, T.W., RATKOWSKY, D., DONNER, CH.D., GILL, M., GRICE, I.D., TIRALONGO, E., 2010. Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*. 71, 948-955.

BEDNAŘÍK, J., AMBLER, Z., RŮŽIČKA, E., BAUER, J., CERMAN, J., ČESÁK, T., EHLER, E., ELIÁŠ, P., HAVRDOVÁ, E., HERMAN, E., HOBZA, V., HOVORKA, J., KADAŇKA, Z., KOMÁREK, V., KUBA, R., LÁTR, I., MAREŠ, J., MARKOVÁ, J., MARUSIČ, P., MECHL, M., NÁHLOVSKÝ, J., NĚMEČEK, S., NĚMEČKOVÁ, J., NEVŠÍMALOVÁ, S., PÍCHA, D., SMRČKA, M., ŠTOURAC,

P., URBAN, P., VOHÁŇKA, S., VYMAZAL, J. *Klinická neurologie, část speciální I*. 1. vyd. Praha: Triton, 2010. 707 s. ISBN 978-80-7387-389-9. s. 556-557.

BESL, H., HALBAUER, R., STEGLICH, W., 1978. Reports on fungal pigments. 34. New anthraquinone pigments from *Cortinarius armillatus* and *C. miniatopus* (Agaricales). *Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences*. 33c (3-4), 294-295.

BIELLI, E. *Houby: obsáhlý rádce pro určování a sběr hub*. 1. vyd. Praha: Ikar: Knižní klub, 2001. 224 s. ISBN 80-242-0548-3. s. 13, 14, 29.

BREHERET, S., TALOU, T., RAPIOR, S., BESSIERE, J.-M., 1999. Geosmin, a sesquiterpenoid compound responsible for the musty-earthly odor of *Cortinarius herculeus*, *Cystoderma amianthinum*, and *C. carcharias*. *Mycologia*. 91 (1), 117-120.

BRONDZ, I., EKEBERG, D., HØILAAND, K., BELL, D.S., ANNINO, A.R., 2007. The real nature of the indole alkaloids in *Cortinarius infractus*: Evaluation of artifact formation through solvent extraction method development. *Journal of chromatography A*. 1148 (1), 1-7.

CADDY, B., 1984. Recent investigation of fungal toxins. *Analytical Proceedings*. 21 (10), 380-382.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88-95.

ELSWORTH, C., GILL, M., GIMÉNEZ, A., MILANOVIC, N.M., RAUDLES, E., 1999. Pigments of fungi. Part 50.¹ Structure, biosynthesis and stereochemistry of new dimeric dihydroanthracenones of the phlegmacin type from *Cortinarius sinapicolor* Cleland. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I*. 1999, 119-125.

ELSWORTH, C., GILL, M., SAUBERN, S., 2000. Biosynthesis of tetrahydroanthraquinones in fungi. *Phytochemistry*. 55 (1), 23-27.

ERHARTOVI, J. a M. *Houbařský atlas: 400 druhů jedlých a jedovatých hub*. 1. vyd. Vimperk: Tina, 1995. ISBN 80-85618-31-1. č. 156.

EVANS, S., KIBBY, G. *Houby*. Praha: Slovart, 2007. 296 s. ISBN 978-80-7209-910-8. s. 64, 91.

FOŘT, P. *Sport a výživa*. 1. vyd. Praha: Ikar, 2002. ISBN 80-249-0124-2. s. 232.

FRANCOIS, G., STEENACKERS, T., ASSI, L.A., STEGLICH, W., LAMOTTKE, K., HOLENZ, J., BRINGMANN, G., 1999. Vismione H and structurally related anthranoid compounds of natural and synthetic origin as promising drugs against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* : structure-activity relationships. *Parasitology Research*. 85 (7), 582-588.

GAO, J.-M., QIN, J.-CH., PESCIPELLI, G., DI PIETRO, S., MA, Y.-T., ZHANG, A.-L., 2010. Structure and absolute configuration of toxic polyketide pigments from the fruiting bodies of the fungus *Cortinarius rufo-olivaceus*. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 8 (15), 3543-3551.

GEISLER, T., BRANDT, W., PORZEL, A., SCHLENZIG, D., KEHLER, A., WESSJOHANN, L., ARNOLD, N., 2010. Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18 (6), 2173-2177.

GILL, M., 2003. Pigments of fungi (Macromycetes). *Natural Products Report*. 20 (6), 615-639.

GILL, M., GIMÉNEZ, A., JHINGRAN, A.G., MILANOVIC N.M., PALFREYMAN, A.R., 1998. Pigments of fungi. Part 49.¹ Structure and biosynthesis of dermocanarin 4, a naphthoquinone-dihydroanthracenone dimer from the fungus *Cortinarius sinapicolor* Cleland. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*. 1998, 3431-3436.

GILL, M., GIMÉNEZ, A., STRAUCH, R.J., 1987. 6-Nitro-*iso*-vanillic acid, an unusual chromogen from the genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*. 26 (10), 2815-2817.

GILL, M., MILANOVIC, N.M., 1999. Pigments of fungi. LVIII Sinapiquinone and sinapicolone, red pigments from the toadstool *Cortinarius sinapicolor*. *Australian Journal of Chemistry*. 52 (11), 1035-1039.

GILL, M., SMRDEL, A.F., 1987. Deoxyaustrocortilutein and deoxyaustrocortirubin, tetrahydroanthraquinones from the Genus *Cortinarius*. *Phytochemistry*. 26 (11), 2999-3001.

GMINDER, A., BÖHNING, T. *Nový průvodce přírodou: houby*. 1 vyd. Praha: Euromedia Group, 2009. 320 s. ISBN 978-80-242-2330-8. s. 197, 199, 200, 201.

HAGARA, L. *Atlas hub*. 2. vyd. Martin: Neografia, 1995. 461 s. ISBN 80-85186-84-5. s. 30-31.

HARTL, J., DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., OPLETALOVÁ, V., ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chemie IV*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. 166 s. ISBN 80-246-1169-4. s. 82.

HRDINA, V. , HRDINA, R. , JAHODÁŘ, L. , MARTINEC, Z. , MĚRKA, V. *Přírodní toxiny a jedy*. Praha: Galén : Karolinum, 2004. 302 s. ISBN 80-7262-256-0 (Galén), ISBN 80-246-0823-5 (Karolinum), s. 124, 130.

HU, L., TAN, J.-W., LIU, J.-K., 2003. Chemical constituents of the Basidiomycete *Cortinarius umidicola*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 58c (9-10), 659-662.

ISENSEE, K., PETROIANU, G., STARK, H., 2007. Pharmaceutical aspects of cognitive impairment: past, present and future of drugs in dementia. *Journal of Applied Biomedicine*. 5, 57-70.

JANITOR, A., KABÁT, V., MAGÁL, J., ŠKUBLA, P. *Příručka houbaře*. 1. vyd. Bratislava: Příroda, 2006. 134 s. ISBN 80-07-01438-1. s. 11.

JEDLIČKA, P., KELLER, O., AMBLER, Z., BAUER, J., BEDNAŘÍK, J., BENEŠ, V., BOČAN, P., BOJAR, M., DOUTNÍK, S., DRÁBEK, P., HAVRDOVÁ, E., KADAŇKA, Z., KALINA, M., KALVACH, P., KOMÁREK, V., KOZLER, P., KREJČOVÁ, H., LUKÁŠ, E., NEBUDOVÁ, J., NEVŠÍMALOVÁ, S., REKTOR, I., ROTH, J., RŮŽIČKA, E., URBAN, P., URBÁNEK, K., VONDROVÁ, H., WABERŽINEK, G. *Speciální neurologie*. 1. vyd. Praha: Galén: Karolinum, 2005. 424 s. ISBN 80-7262-312-5 (Galén), ISBN 80-246-1076-5 (Karolinum). s. 219-224.

JIRÁK, R., 2009. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*. 5(4), 176-178.

JIRÁSEK, S. Biolib – Biological Library, 2000 (<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id77479/?taxonid=60679>), čerpáno dne 27.7.2011

JIRÁSEK, S. Biolib – Biological Library, 2007 (<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id37066/?taxonid=413627>), čerpáno dne 27.7.2011

JUNEK, M. Biolib – Biological Library, 2005a (<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id8258/?taxonid=60660>), čerpáno dne 27.7.2011

JUNEK, M. Biolib – Biological Library, 2005b (<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id8273/?taxonid=125741>), čerpáno dne 27.7.2011

KAMENÍKOVÁ, L. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. *Solutio*, 2000/2001, 31 – 49.

KEIZER, G. J. *Encyklopedie hub*. Praha: Rebo Productions, 1998. 288 s. ISBN 80-85815-95-8. s. 11, 18, 26, 27.

KEIZER, G. J. *Houby*. 2. vyd. Čestlice: Rebo Production, 2005. 288 s. ISBN 80-7234-479-X. s. 222, 223.

KIBBY, G. Rogers Plants Ltd., 2008 (<http://www.rogersmushrooms.com/gallery/DisplayBlock~bid~5413~gid~~source~gallerydefault.asp>), čerpáno dne 28.6.2011

KLÁN, J. *Co víme o houbách*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. 312 s. ISBN 80-04-21143-7. s. 107-115, 119, 120, 144-145, 152-153, 167, 170, 204, 206, 208, 213-214, 219-220, 227.

KLÁN, J. *Houby*. 1. české vyd. Praha: Aventinum, 1999. 223 s. ISBN 80-7151-068-8. s. 12.

KOHE, H. W. *Atlas hub: 150 druhů jedlých i nejedlých hub*. 1. vyd. Praha: Ikar, 2000. 192 s. ISBN 80-7202-624-0. s. 6, 7, 11, 15, 17-18.

KOPANSKI, L., KLAAR, M., STEGLICH, W., 1982. Pilzpigmente, 40. Leprocybin, der Fluoreszenzstoff von *Cortinarius cotoneus* und verwandten Leprocyben (Agaricales). *Liebigs Annalen der Chemie*. 1982 (7), 1280-1296.

KOVÁŘ, L. *Breviř o houbách*. 1. vyd. Praha: Olympia, 1999. 160 s. ISBN 80-7033-593-9. s. 20, 29, 31, 80-84, 109, 111.

KUBÁT, K., KALINA, T., KOVÁČ, J., KUBÁTOVÁ, D., PRACH, K., URBAN, Z. *Botanika*. 1. vyd. Praha: Scientia, 1998. 231 s. ISBN 80-7183-053-4. s. 23.

LÆSSØE, T., DEL CONTE, A. *Houby*. 2. vyd. Praha: Fortuna Print, 2004. 256 s. ISBN 80-7321-114-9. s. 6, 7, 8, 9, 26, 43, 163, 166-168, 170, 171.

LAUX, H. E. *Jedlé houby a jejich jedovatí dvojníci: jak je správně rozeznat a sbírat*. *Libeznice: Víkend*, 2006. 190 s. ISBN 80-86891-38-0. s. 41, 45.

MANDELKER, L. *Oxidační stres: role mitochondrií, volných radikálů a antioxidantů. Praxe malých zvířat*. Praha: Pierot, 2009, roč. 2, č. 1. 220 s. ISBN 978-80-7353-135-5. s. 1, 4, 5, 22-24, 126, 129.

Manuál k přístroji FIALab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), přeloženo z anglického jazyka.

MIKULCOVÁ, M. *Výchova houbařů v Čechách, aneb, Co v atlasech nenajdete*. 1. vyd. Praha: Olympia, 2006. 208 s. ISBN 80-7033-960-8. s. 118.

MÜLLER, M., LAMOTTKE, K., STEGLICH, W., BUSEMANN, S., REICHERT, M., BRINGMANN, G., SPITELLER, P., 2004. Biosynthesis and stereochemistry of phlegmacin-type fungal pigments. *European Journal of Organic Chemistry*. 69 (14), 4850-4855.

NICHOLAS, G.M., BLUNT, J.W., MUNRO, M.H.G., 2001. Cortamidine oxide, a novel disulfide metabolite from the New Zealand Basidiomycete (Mushroom) *Cortinarius* Species. *Journal of Natural Products*. 64 (3), 341-344.

OPLETAL, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005a (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10320>), čerpáno dne 28.6.2011

OPLETAL, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005b (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10321>), čerpáno dne 28.6.2011

OPLETAL, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005c (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10323>), čerpáno dne 28.6.2011

OPLETAL, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005d (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10325>), čerpáno dne 28.6.2011

OPLETAL, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005e (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10332>), čerpáno dne 28.6.2011

OPLETAL, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005f (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10335>), čerpáno dne 28.6.2011

OPLETAL, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005g (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10341>), čerpáno dne 15.6.2011

OPLETAL, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005h (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10342>), čerpáno dne 28.6.2011

OPLETAL, L., KOULA, V. Daidalea Verze 1.0 – internetová databáze, 2005ch (<http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/MycoSpecies.asp?id=10343>), čerpáno dne 28.6.2011

PASEKOVÁ, H., POLÁŠEK, M., SOLICH, P., 1999. Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy*. 93, 354-359.

PERSECA, T., GHIORCEA, I., DEAK, A., 1985. Free amino acid levels in some macromycete species. *Contributii Botanice*. 1985, 197-200.

PŘÍHODA, A., URBAN, L., URBAN, L. ml. *Kapesní atlas hub, 1. díl*. 2. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1988. 255 s. s. 36, 37.

RACEK, J. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vyd. Praha: Galén, 2003. 90 s. ISBN 80-7262-231-5. s. 12, 31-33, 49, 57, 70-71, 74.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C., 1999. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.

REININGER, W., STEGLICH, W., MOSER, M., 1972. Pigments of fungi. XI. Velum pigments of some *Cortinarius* species, subgenus *Telamonia* (Agaricales). *Zeitschrift fuer Naturforschung, Teil B: Anorganische Chemie, Organische Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie*. 27 (8), 1009.

SEMERDŽIEVA, M., VESELSKÝ, J. *Léčivé hoby dříve a nyní*, 1. vyd. Praha: Academia, 1986. 180 s. s. 34-35.

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.

SMOTLACHA, M. *Smotlachův atlas hub: oficiální příručka pro určování jedlých a jedovatých hub*. 4. vyd. Praha: Ottovo nakladatelství, 1999. 271 s. ISBN 80-7181-311-7. s. 31, 32.

SONTAG, B., FRÖDE, R., BROSS, M., STEGLICH, W., 1999. Chromogenic triterpenoids from *Cortinarius fulvoincarnatus*, *C. sodagnitus* and related toadstools (Agaricales). *European Journal of Organic Chemistry*. 1999 (1), 255-260.

STAHL, E. *Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook*. Springer Berlin, Berlin-Heidelberg-New York 1969. s. 1042.

STECK, T.L., KANT, J.A., 1974. Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 31 (Pt A), 172-180.

STEGLICH, W., KOPANSKI, L., WOLF, M., MOSER, M., TEGTMEYER, G., 1984. Indolalkaloide aus dem blätterpilz *Cortinarius infractus* (agaricales). *Tetrahedron Letters*. 25 (22), 2341-2344.

STRAUSS, E. Myco-vaud.ch, 2008

(<http://www.myco-vaud.ch/gallery/smv->

[2008/Cortinarius venetus var montana ardeve DSCN9131 WEB](#)), čerpáno dne 5.10.2011

SVRČEK, M. *Houby*. 4. české vyd. Praha: Aventinum nakladatelství, 2002. 279 s. ISBN 80-7151-202-8. s. 13-14, 16, 18, 25, 37, 39, 188, 186, 190, 192.

ŠTÍPEK, S. BOROEVANSKÝ, J., ČEJKOVÁ, J. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4. s. 276.

TAN, J.-W., DONG, Z.-J., LIU, J.-K., 2003. New cerebrosides from the Basidiomycete *Cortinarius tenuipes*. *Lipids*. 38 (1), 81-84.

TEICHERT, A., SCHMIDT, J., PORZEL, A., ARNOLD, N., WESSJOHANN, L., 2007. Brunneins A–C, β -carboline alkaloids from *Cortinarius brunneus*. *Journal of Natural Products*. 70 (9), 1529-1531.

TEICHERT, A., SCHMIDT, J., PORZEL, A., ARNOLD, N., WESSJOHANN, L., 2008a. *N*-Glucosyl-1*H*-indole derivatives from *Cortinarius brunneus* (Basidiomycetes). *Chemistry & Biodiversity*. 5 (4), 664-669.

TEICHERT, A., SCHMIDT, J., PORZEL, A., ARNOLD, N., WESSJOHANN, L., 2008b. (Iso)-quinoline alkaloids from fungal fruiting bodies of *Cortinarius subtortus*. *Journal of Natural Products*. 71 (6), 1092-1094.

VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 304 s. ISBN 80-962391-4-5. s. 45, 239.

VOLF, F., ŠEBÁNEK, J., PROCHÁZKA, S., SLADKÝ, Z., KUBJATKO, F., KROPÁČ, Z. *Zemědělská botanika*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988. 384s. s. 180, 192.

WANG, F., TAN, J.-W., LIU, J.-K., 2004. Vibratilicin: a novel compound from the Basidiomycete *Cortinarius vibratilis*. *Helvetica Chimica Acta*. 87 (7), 1912-1915.

WATLING, R., GILL, M., GIMÉNEZ, A., MAY, T.W., 1992. A new styrylpyrone-containing *Cortinarius* from Australia . *Mycological Research*. 96 (9), 743-748.

ZHANG, A.-L., QIN, J.CH., BAI, M.-S., GAO, J.M., ZHANG, Y.M., YANG, S.X., LAATSCH, H., 2009. Rufoolivacin B, a novel polyketide pigment from the fruiting bodies of the fungus *Cortinarius rufo-olivaceus* (basidiomycetes). *Chinese Chemical Letters*. 20 (11), 1324-1326.

ZHONG, J.-J., XIAO, J.-H., 2009. Secondary metabolites from higher fungi: Discovery, bioactivity, and bioproduction. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 113, 79-150.

ZIMA, T., ŠTÍPEK, S., TESAŘ, V., PLÁTENÍK, J., CRKOVSKÁ, J., 1996. Volné radikály – reaktivní formy kyslíku, antioxidační látky a antioxidační terapie. *Remedia*. 6, 35-58.

9. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát Mgr. Jana Baroňová

Konzultant Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Název rigorózní práce Biologická aktivita makromycet – C

Klíčová slova: houby, *Cortinariaceae*, cholinesterázová inhibiční aktivita, antioxidační aktivita, ABTS^{•+}, fenolické látky, alkaloidy

V rámci této rigorózní práce bylo testováno 15 taxonů hub z čeledi *Cortinariaceae*. Extrakty jednotlivých druhů hub byly hodnoceny na obsah alkaloidů za použití tenkovrstvé chromatografie (TLC), která byla realizována vzestupným způsobem v chromatografické komoře. Obsah alkaloidů byl detekován u druhu *Cortinarius infractus*, což bylo v souladu s dříve publikovaným výsledkem.

U všech testovaných druhů byl proveden screening antioxidační aktivity pomocí ABTS^{•+} testu s využitím sekvenční injekční analýzy (SIA), která umožňuje monitorování a vyhodnocování antioxidační aktivity ve velkém počtu vzorků. Nejvyšší antioxidační aktivitu z testovaných vzorků vykazoval taxon *Cortinarius bolaris* (0,219 TE mM).

Dále bylo stanovováno celkové množství fenolických látek v jednotlivých houbových extraktech za použití Folin-Ciocalteu metody. Množství fenolických látek bylo porovnáváno se standardem - kyselinou gallovou - a vyjádřeno jako ekvivalentní množství kyseliny gallové na mg extraktu (GAE/mg). Nejvyšší množství fenolických látek bylo obsaženo v taxonu *Cortinarius bolaris* ($38,33 \pm 2,36 \mu\text{gGA/mg} \pm \text{SD}$). To naznačuje souvislost mezi obsahem fenolických látek a antioxidační aktivitou u tohoto druhu.

Všechny testované druhy hub byly podrobeny stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity za využití Ellmanovy spektrofotometrické metody s použitím kyseliny 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové modifikované podle Bajgara. Tato metoda je vysoce specifická, citlivá a jednoduchá na provedení. Nejvyšší cholinesterázovou inhibiční aktivitu z testovaných vzorků vykazoval taxon *Cortinarius infractus* ($\text{IC}_{50} \text{AChE} = 7,9 \mu\text{g/ml}$, $\text{IC}_{50} \text{BuChE} = 482,6 \mu\text{g/ml}$). Aktivita extraktů byla porovnána se

standardními inhibitory galantaminem (IC_{50} HuAChE = $2,59 \pm 0,15$ $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE = $58,02 \pm 2,34$ $\mu\text{g/ml}$), a huperzinem A (IC_{50} HuAChE = $0,061 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE >500 $\mu\text{g/ml}$). Druh *C. infractus* lze považovat za vhodný zdroj inhibitorů cholinesteráz.

10. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate Mgr. Jana Baroňová

Consultant Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Title of Thesis Biological Activity of Macromycetes – C

Keywords: fungi, *Cortinariaceae*, cholinesterase inhibition activity, antioxidant activity, ABTS^{•+}, phenolic compounds, alkaloids

15 species of mushrooms from the family *Cortinariaceae* were tested for their biological activity. The extracts of the individual mushroom species were tested for the alkaloid content by a thin-layer chromatography (TLC) method, which was carried out in an ascending mode in the chromatographic chamber. The alkaloids were detected only in the case of *Cortinarius infractus*, which has already been presented in the literature.

A screening of the antioxidant activity was performed for all of the tested species by the ABTS^{•+} test with sequential injection analysis (SIA), which enabled monitoring and evaluation of the antioxidant activity simultaneously for many samples. The highest antioxidant activity was observed in the case of *Cortinarius bolaris* (0.219 TE mM).

To compare the antioxidant activity of the studied species with their total amount of the phenolic compound, each mushroom extract was tested by the Folin-Ciocalteu method. This amount of the phenolic compound was compared to the standard gallic acid, and then presented as an equivalent amount of the gallic acid per 1 mg of the extract (GAE/mg). *Cortinarius bolaris* contained also the highest amount of phenolic compounds ($38.33 \pm 2.36 \mu\text{gGA}/\text{mg} \pm \text{SD}$). This could be a proof of the relation of the antioxidant activity and content of phenolic compounds.

Besides that, all of the studied species were tested for the cholinesterase inhibition activity by the Ellman's spectrophotometric method using the 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid modified by Bajgar. This approach is very specific, sensitive and simple to use. The highest cholinesterase inhibition activity was observed in the case of *Cortinarius infractus* ($\text{IC}_{50} \text{ AChE} = 7.9 \mu\text{g}/\text{ml}$, $\text{IC}_{50} \text{ BuChE} =$

482.6 $\mu\text{g/ml}$). The activity of extracts was compared with standard inhibitors galanthamine (IC_{50} HuAChE = 2.59 ± 0.15 $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE = 58.02 ± 2.34 $\mu\text{g/ml}$), and huperzine A (IC_{50} HuAChE = 0.061 ± 0.01 $\mu\text{g/ml}$, HuBuChE >500 $\mu\text{g/ml}$). The species *C. infractus* can be considered as suitable source of the cholinesterase inhibitors.