

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



***In vitro* antioxidační a protizánětlivé účinky jedlých  
hub**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Ondřej Veselý**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "*In vitro* antioxidační a protizánětlivé účinky jedlých hub" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi Ph.D. a Ing. Ivo Doskočilovi, (Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů), za jejich cenné rady a odborné vedení experimentální práce, a dále kolektivu pracovníků FAPPZ. Zvláštní poděkování bych chtěl věnovat Nikol Modráčkové za inspiraci.

## Souhrn

Houby jsou běžně konzumovanou potravinou ve Střední a Východní Evropě a některých oblastech Asie. Houby by neměly být považovány pouze za jednoduchou potravinu, neboť u některých z nich bylo prokázáno, že jsou bohatým zdrojem bioaktivních sloučenin, jako jsou rostlinné fenolové sloučeniny a zejména polysacharidy s potencionálním farmaceutickým účinkem. Nejcennější z těchto polysacharidů jsou  $\beta$ -glukany hrající roli v imunitním systému. Příklad účinku hub může být v ovlivnění imunitní regulace, v protinádorovém působení, snižování oxidačního stresu a další. Tyto účinky jsou popsány zejména na dřevokazných houbách jako je *Ganoderma lucidum* a *Lentinula edodes* pocházející z Asie.

Cílem práce bylo zjistit antioxidační a protizánětlivé účinky hub volně rostoucích ve Střední Evropě. Bylo připraveno 9 metanolových a vodných extraktů, které byly v rámci provedených *in vitro* testů postupně testovány na obsah  $\beta$ -glukanů v sušině. Dále byl stanoven obsah fenolových sloučenin (TPC - Total phenolic content) a antioxidační aktivita pomocí metody DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Nakonec bylo stanovena produkce oxidu dusnatého (NO) na buněčné linii RAW264.7 stimulované pomocí lipopolysacharidu s ověřením cytotoxicity testovaných extraktů.

V rámci testu TPC byl u metanolových i vodných extraktů zjištěn nejvyšší obsah fenolických sloučenin u *Calocybe cambosa*, a to 68  $\mu\text{g/ml}$  resp. 40  $\mu\text{g/ml}$ . Ostatní vzorky se pohybovaly v rozsahu 36–41  $\mu\text{g/ml}$ , jak u metanolových, tak vodných extraktů. Metodou DPPH byly naměřeny nejvyšší hodnoty u metanolových vzorků *Boletus luridiformis* a *Boletus luridus* 31,22 a 24,56  $\mu\text{g/ml}$ , u vodných roztoků *Cantharellus cibarius* a *Leccinum carpini* 4,88 a 4,02  $\mu\text{g/ml}$ . Nejvyšší obsah  $\beta$ -glukanů byl stanoven u *Cantharellus cibarius* 429,7 mg/g sušiny. V rámci metody stanovení inhibice NO byl pouze u vodného extraktu *Boletus badius* zjištěn pokles o 36 % při koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  oproti kontrole LPS, naproti tomu oba extrakty z *Calocybe cambosa* stimulovaly při stejné koncentraci buněčnou linii RAW264.7 ke zvýšení produkce NO. Ani jedna zkoumaná houba při koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  neprokázala cytotoxické účinky na buněčnou linii RAW264.7

**Klíčová slova:** houby,  $\beta$ -glukany, makrofágy, RAW264.7, oxid dusnatý, antioxidační aktivita

## Summary

Mushrooms are commonly consumed in Central and Eastern Europe and also in some parts of Asia. Some species are a part of traditional medicine – especially in China. Those mushrooms could be used in a treatment of many diseases because of their specific composition. Mushrooms should not be considered only as a simple food. Some of them have been shown to be a rich source of bioactive compounds such as plant phenolic compounds and polysaccharides with possible use in pharmacy. The most valuable components of these polysaccharides are  $\beta$ -glucans which play a role in the immune system.

The aim of the thesis is to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effects of mushrooms growing wild in Central Europe. Within the thesis the *in vitro* assays were performed. It included nine kinds of mushrooms in the form of the methanol and water extracts. Mushrooms were sequentially tested for  $\beta$ -glucan content in the dry matter. Methanol and water extracts were tested using the methods TPC (Total Phenolic Content) and the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). It was also determined that the percentage of inhibition of nitric oxide (NO) on murine macrophages stimulated RAW264.7 cell line using lipopolysaccharide verification cytotoxicity of the extracts tested.

Within the TPC test was in the case of methanol and water extracts revealed the highest content of phenolic compounds in *Calocybe gambosa* - 68  $\mu\text{g/ml}$  respectively. 40  $\mu\text{g/ml}$ . Other samples were in the range 36-41  $\mu\text{g/ml}$ , both the methanol and water extracts. With DPPH method were measured all samples. The highest values from the methanol samples were at *Boletus luridiformis* (31.22  $\mu\text{g/ml}$ ) and *Boletus luridus* (24.56  $\mu\text{g/ml}$ ). Values from the water solutions were highest at the *Cantharellus cibarius* (4.88  $\mu\text{g/ml}$ ) and *Leccinum carpini* (4.02  $\mu\text{g/ml}$ ).

The highest content of  $\beta$ -glucan was determined in *Cantharellus cibarius* - 429.7 mg/g dry weight. Within the methods for determining of inhibition of NO had only water extract of the *Boletus badius* observed to decrease by 36 % with the concentration of 500  $\mu\text{g/ml}$  versus the control sample LPS, whereas both extracts *Calocybe gambosa* at the same concentration stimulated cell line RAW264.7 to increase NO production. Examined mushrooms at a concentration of 500  $\mu\text{g/ml}$  did not demonstrate cytotoxicity to RAW264.7 cell line.

**Keywords:** mushrooms,  $\beta$ -glucans, macrophages, RAW264.7, nitric oxide, antioxidant activity

## Obsah

Seznam zkratk	2
1. Úvod	4
2. Cíl práce a hypotéza	5
2.1 Cíl práce	5
2.2 Hypotéza	5
3. Literární přehled	6
3.1 Volně rostoucí jedlé houby	6
3.2 Volné radikály	7
3.2.1 Negativní účinek volných radikálů	10
3.3 Antioxidanty	13
3.4 Antioxidanty přítomné v houbách	15
3.4.1 Vitamíny v houbách	15
3.4.2 Minerály v houbách	17
3.4.3 Rostlinné fenolové sloučeniny	18
3.5 Protizánětlivá aktivita jedlých hub	20
3.5.1 $\beta$ -glukany	21
3.5.2 Oxid dusnatý – marker buněčného zánětu	23
3.6 Metody stanovení antioxidační a protizánětlivé aktivity	23
3.7 Metody stanovení antioxidační aktivity <i>in vitro</i>	24
3.7.1 Metoda ABTS/TEAC	24
3.7.2 Metoda DPPH	25
3.7.3 Kyslíková radikální absorpční kapacita (ORAC)	25
3.7.4 Metody založené na vychytávání superoxidového radikálu	26
3.7.5 Metoda založená na vychytávání radikálu oxidu dusnatého	26
3.7.6 Metoda FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	26
3.7.7 Metoda měření inhibice xanthinoxidázy (XO)	27
3.7.8 Měření produkce oxidu dusnatého v buněčných liniích	27
4. Materiál a metody	27
4.1 Materiál	27
4.1.1 Rostlinný materiál	27
4.1.2 Ostatní materiál	28
4.2 Metody	28
4.2.1 Příprava vzorku hub	28
4.2.2 <i>In vitro</i> antioxidační testy	29

4.2.3	Stanovení obsahu $\beta$ -glukanů v jedlých houbách .....	30
4.2.4	<i>In vitro</i> stanovení protizánětlivé aktivity .....	31
4.3	Statistické vyhodnocení .....	32
5.	Výsledky .....	33
5.1	Výsledky stanovení metodou TPC .....	33
5.2	Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH .....	34
5.3	Výsledky stanovení obsahu $\beta$ -glukanů .....	35
5.4	Výsledky stanovení produkce NO a cytotoxicity (MTT) .....	36
6.	Diskuze .....	37
7.	Závěr .....	42
8.	Použitá literatura .....	43

## Seznam zkratek

**ABTS:** (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonová kyselina)

**ANOVA:** analysis of variance, analýza rozptylu

**AO:** antioxidant

**BHA:** butylhydroxyanisol

**CO<sub>2</sub>:** oxid uhličitý

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DMSO:** dimethylsulfoxid

**DNA:** deoxyribonukleová kyselina

**DPPH:** difenylpikrylhydrazyl

**eNOS:** endoteliální syntáza oxidu dusnatého

**ESR:** elektronová spinová rezonance

**FAD:** flavinadenindinukleotid

**FBS:** fetální bovinní sérum

**FMN:** flavinmononukleotid

**FRAP:** Fluorescence Recovery After Photobleaching/ Ferric reducing antioxidant power

**GAE:** kyselina gallová

**GMP:** guanosinmonofosfát

**GOPOD:** glukózooxidáza, peroxidáza, 4-aminoantipyrin

**H<sub>2</sub>O:** voda

**HPLC:** vysokoúčinná kapalinová chromatografie

**INF- $\gamma$ :** interferon gama

**iNOS:** indukovaná syntáza oxidu dusnatého

**LDL:** low density lipoproteine

**LPS:** lipopolysacharid

**MeOH:** metanol



**MTT:** kolorimetrická metoda využívající mitochondriální rozklad 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid na formazan

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** uhličitan vápenatý

**NADPH:** hydrogennikotinamidadeninukleotidfosfát

**NK:** Nature killers

**NO:** oxid dusnatý

**ORAC:** Oxygen Radical Absorbance Capacity, Kyslíková radikální absorpční kapacita

**RAW264,7:** buněčné makrofágy

**RNS:** reactive nitrogen species, volné dusíkaté radikály

**ROS:** reactive oxygen species, volné kyslíkové radikály

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium

**SD:** směrodatná odchylka

**TAA:** total antioxidant activity, celková antioxidační aktivita

**TE:** Trolox

**TEAC:** Trolox Equivalent Absorbance Capacity

**TNF- $\alpha$ :** tumor necrosis factor alfa

**TPC:** total phenolic content, celková antioxidační kapacita

**TRAP:** Total radical trapping antioxidant parameter

**UVA:** dlouhovlnné ultrafialové záření

**UVB:** středněvlnné ultrafialové záření

**VR:** volný radikál

**XO:** xantin oxidáza

## 1. Úvod

Houby (*Fungi*) představují skupinu živých organismů, které se dříve přiřazovaly k rostlinám, ale nyní mají vlastní taxonomický řád (Bovi et al., 2013). Na světě existují tisíce druhů hub, ale jen 25 se široce akceptuje jako jedlé a jsou zároveň komerčně pěstované (Valverde et al., 2015). Houby v Evropě, a to zejména ve východní části, patří k tradičním složkám stravy. V České Republice houbaří více než 70 % populace, kdy na domácnost připadá v průměru přes 8kg nasbíraných hub ročně. Pro porovnání s Polskem (1–1,5 kg/rok), Německem (3 kg/rok) nebo Holandskem (2,5 kg/rok) se řadíme mezi největší sběrače a konzumenty hub (Bernaš et al., 2006). Mimo Evropu je sběr hub nejvíce rozšířen v Číně a jihovýchodní Číně.

V Číně jsou houby spojovány zejména s tradiční Čínskou medicínou (Smith et al., 2002), kde jsou využívány po celá staletí k léčení pestré řady onemocnění (Fu et al., 2002, Barros et al., 2007a, Elmastas et al., 2007). Mezi nejznámější takové houby patří Shiitake (*Lentinus edodes*), Reishi (*Ganoderma lucidum*), Maitake (*Grifola frondosa*) a Chaga (*Inonotus obliquus*) (Wasser, 2002). Tyto houby jsou využívány pro snížení účinků stresu a pro zlepšení tělesných funkcí. V laboratorních podmínkách byl pozorován efekt ovlivňující vznik rakoviny a růst zhoubných nádorů (Balch and Balch, 1997). Konzumace hub je doporučena při onemocnění typu cukrovka, chronický únavový syndrom, chronický zánět jater, obezita, vysoký krevní tlak a dalších. Jejich konzumace je spojena s regulací hladiny cholesterolu, která jinak vede k výskytu srdečního onemocnění (Wasser, 2002, Borchers et al., 2004, Bernaš et al., 2006, Puttaraju et al., 2006, Palacios et al., 2011).

Houby jsou nutričně zajímavou pochutinou z důvodu nízkého množství energie a tuků (Barros et al., 2008a, Guillamón et al., 2010), ale poměrně vysokého množství proteinů, sacharidů (chitin, glykogen, trehalosa, mannitol) a vlákniny (Makropoulou et al., 2012). Jsou ceněné pro obsah rostlinných fenolových látek s antioxidačním účinkem (Kim et al., 2008). Obsahují přírodní polysacharidy  $\beta$ -glukany (Carbonero et al., 2006), které jsou schopné podpořit imunitní systém organismu (Hobbs, 2003) a snižovat účinky zánětlivých odpovědí (Borchers et al., 2004). Reprezentují nevyčerpatelný zdroj polysacharidů ovlivňující nádorové onemocnění a imunitní reakce (Wasser, 2002).

## **2. Cíl práce a hypotéza**

### 2.1 Cíl práce

Cílem práce je stanovení antioxidačních a protizánětlivých účinků *in vitro* u jedlých hub běžně konzumovaných ve středoevropské stravě získaných metanolovou a vodnou extrakcí ( $\beta$ -glukanová frakce) jedlých hub.

### 2.2 Hypotéza

Hypotézou je, že řada jedlých hub může mít antioxidační případně protizánětlivé účinky srovnatelné s houbami využívanými v tradiční Čínské medicíně.

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Volně rostoucí jedlé houby

Houby byly konzumovány lidmi od nepaměti. Již 455 let před naším letopočtem Hippokrates využíval houby k léčbě sérií zánětlivých onemocnění ledvin (Hobbs, 2003). Ve starém Řecku se věřilo, že houby poskytují bojovníkům sílu, Římané je chápaly jako „Jídlo bohů“, v starověkém Egyptě byly „darem od boha Osirise“ a v Číně se po staletí využívaly ke zlepšení zdraví (Smith et al., 2002) a jako součást tradiční orientální medicíny používané k léčbě celé řady onemocnění (Guillamón et al., 2010).

V současnosti jsou houby ceněny nejen pro jejich sensorické vlastnosti, ale i pro nízký obsah kalorií, cukrů, tuků a soli. Naopak jsou bohaté na vitamíny skupiny B (Bernaš et al., 2006), minerální látky (vápník, draslík, hořčík, selen, sodík, fosfor, měď, zinek železo a mangan), proteiny a vlákninu (Manzi and Pizzoferrato, 2000, Agrahar-Murugkar and Subbulakshmi, 2005, Bernaš et al., 2006, Kim et al., 2008, Guillamón et al., 2010, Valverde et al., 2015).

Houby by neměly být považovány pouze za jednoduchou potravinu, neboť u některých z nich bylo prokázáno, že jsou bohatým zdrojem bioaktivních sloučenin (Barros et al., 2008b). Mezi tyto biologicky aktivní látky patří rostlinné fenolové sloučeniny a přítomné polysacharidy, které mají potenciální uplatnění ve farmacii. Příklad účinku hub může být imunitní regulace, protinádorová (Yang and Du, 2003), antibakteriální (Barros et al., 2007b), protizánětlivá (Padilha et al., 2009) a anti-koagulační aktivita (Yoon et al., 2003). Některé polysacharidy z hub (příkladem lentinan, schizophyllan a krestin) jsou využívány jako imunofarmaceutika v Číně, Japonsku a Koreji (Zheng et al., 2005). Vlastní aktivita polysacharidů je dána jejich složením a velikostí (Bohn and BeMiller, 1995). Nejčastější bioaktivní polysacharidy z hub jsou  $\beta$ -(1→3) a  $\beta$ -(1→6) glukany (Wasser, 2002).

Komerční zájem o houby se zvýšil v 70. letech 20. století v důsledku maloobchodní a restaurační poptávky (Filip, 1998). Riziko spojené s častou konzumací hrozí v důsledku možné hyperakumulace rizikových prvků typu Cd, Pb, Hg, Ag, As a radionuklidů (Falandysz and Borovička, 2013). Množství rizikových prvků, zejména těžkých kovů přítomných v houbách je závislé na místě výskytu. Mezi taková riziková místa patří plochy sousedící s blízkou pozemní komunikací (Kalač and Svoboda, 2000), průmyslových a sopečných oblastí (Severoglu et al., 2013). Houby z těchto rizikových míst obsahují další látky s karcinogenními

účinky, způsobující dýchací a srdeční potíže a poškozujícími ledviny (Lima et al., 2012). Další riziko je spjaté s druhem houby z důvodu rozdílné schopnosti akumulace škodlivin (Kalač, 2010) a způsobu jejího pěstování v případě komerčně pěstovaných druhů (Stihi et al., 2011). Během let ale nebyl nalezen významný rozdíl v obsahu prvků nalezených u volně rostoucích hub na stejném místě (Svoboda et al., 2000). Přibližně třetina jedlých hub má naopak terapeutické využití (Lima et al., 2012), jež lze uplatnit pro léčbu podvýživy (Sachan et al., 2013), pro modulaci nadváhy (Feeney et al., 2014), léčbě chronických onemocnění a předcházení oxidačního stresu (Leal et al., 2013).

### 3.2 Volné radikály

Kyslíková toxicita byla poprvé popsána v roce 1878 prostřednictvím pokusů provedených na laboratorních zvířatech. První pokusy s volnými radikály (VR) započaly roku 1894, ale až mezi čtyřicátými a padesátými lety 19. století byly poprvé označeny jako příčina některých nemocí. Přesto vše jim nebyl věnován větší zájem, do doby objevu enzymu superoxiddismutasy (SOD) v roce 1969 (Beckman and Ames, 1998, Knight, 1998). Nyní je volným radikálům přikládán velký zájem, nejen kvůli procesu stárnutí (obr. 1), ale i kvůli vlivu na více než 100 nemocí (Knight, 1998).

Z chemického pohledu se za VR považuje jakákoliv vysoce reaktivní molekula, atom či iont s jedním nebo více nepárovými elektrony ve valenčním obalu, který je schopen samostatné existence a dovede vytvářet řetězové reakce (Heunks and Dekhuijzen, 2000, Kasper and Burghardt, 2015). Vysoká reaktivita VR je dána jako důsledek snahy o dosažení neutrálního náboje (Pláteník, 2009). Vysoká reaktivita některých VR je kompenzovaná jejich krátkou životností (třeba  $10^{-6}$  sekund) v živých organismech (Young and Woodside, 2001). Základní formy volných radikálů (tab. 1) jsou volné kyslíkové radikály (Reactive oxygen species; ROS) a volné dusíkové radikály (Reactive nitrogen species; RNS). Mezi VR patří hydroxylový radikál, oxid dusnatý (NO) (Fang et al., 2002) a superoxid, který je jeden z nejvýznamnějších ROS, jehož největším producentem v živé buňce je dýchací řetězce v mitochondrii (Pláteník, 2009).

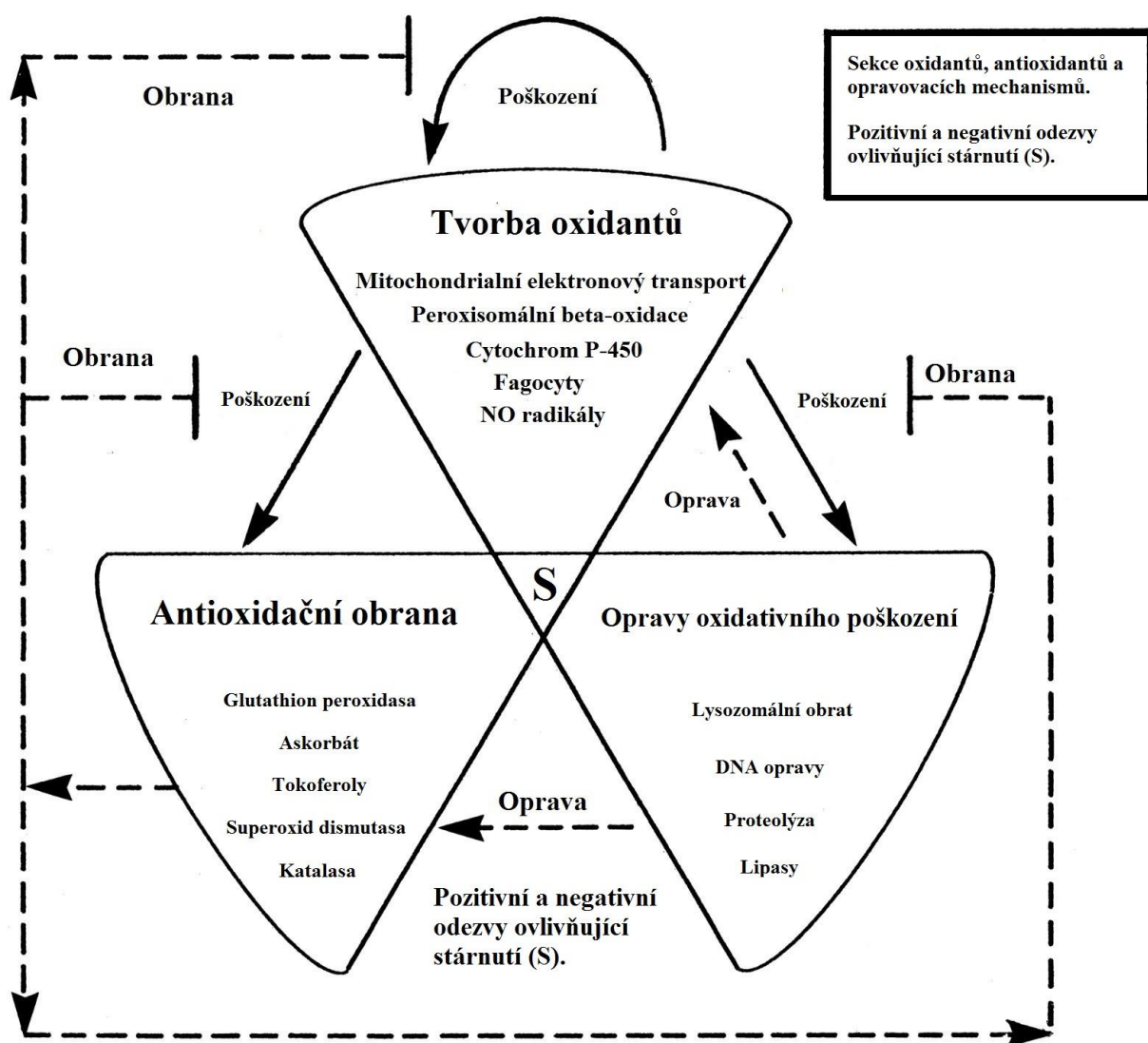
**Tab. 1:** Příklady volných radikálů v průběhu oxidačního stresu (Sies, 1985, Slater, 1988, Gülçin, 2012, Beckwith and Ingold, 2013)

Zkratka	Sloučenina	Poznámka
$O_2^{\bullet-}$	superoxidový anion	Redukovaný stav elektronu, vytvářen mnoha autooxidačními procesy (př.: flavoproteiny)
$^3O_2$	dioxidanediyl	-
$^1O_2$	singletový kyslík	Vzniká z $O_2$ absorpcí energie, která ho povýší do excitovaného stavu
$HO_2^{\bullet}$	perhydroxylový radikál	$O_2^{\bullet-}$ prošlý protonací, lépe v tuku rozpustný
$HO^{\bullet}$	hydroxylový radikál	Vzniklý buď Fentonovou reakcí nebo Haber-Weisovou reakcí, vysoce reaktivní
$RO^{\bullet}$	alkoxylový radikál	Organický (př.: tuky) radikál
$ROO^{\bullet}$	peroxylový radikál	Oficiálně vytvořen z organických (př.: tuky) peroxidů, ROOH
ROOH	-	Organický hydroperoxid (př.: tuky, thymin-OOH)
$^1\Delta_gO_2$ (také $O_2^*$ )	-	Samotný molekulární kyslík, první excitovaný status, je diamagnetický, nepřirodní
$^3RO$ (také $RO^*$ )	-	Rozrušený karbonyl (př.: vytvořen přes dioxethan jako přechod)
$RS^{\bullet}$	thiyl	-
$RNO^{\bullet}$	Nitroxyl	-
$NO^{\bullet}$	-	-
$NO_2^{\bullet}$	-	-
$L^{\bullet}$	Lipidový radikál	-
$P^{\bullet}$	Proteinový radikál	-

Volné radikály vznikají různou cestou prostřednictvím jak zdravých, tak patologických buněk podílejících se na metabolismu (Elmastas et al., 2007). Mezi časté exogenní příčiny můžeme vyjmenovat vystavení kůže ultrafialovému záření za vzniku lipofuscinů, tzv. stařeckých skvrn (Pacifici and Davies, 1991) a inhalaci cigaretového kouře (Leonard et al., 1995). Dalším zdrojem je ozón, jež je silným oxidantem narušující správné fungování plic v důsledku čehož dochází k zánětlivým reakcím (Romieu et al., 2004). Významně se na tvorbě VR podílí i ionizující záření (Slater, 1988, Fang et al., 2002), průmyslové polutanty, xenobiotika (Young and Woodside, 2001). Vystavení stresovým situacím, probíhající infekce a jídlo jsou dalšími zdroji VR (Elmastas et al., 2007). Mezi endogenní zdroje patří působení enzymů, jako je hydrogen nikotinamid adenin nukleotid fosfát (NADPH) oxidáza, xantinoxidáza, endoteliální syntéza NO (Li et al., 2014), dále mitochondriální elektronový transport a autooxidační reakce (Young and Woodside, 2001). Mezi zdroje ROS a RNS patří i tělesný pohyb (Neubauer et al., 2010). Skeletální svaly produkují VR při odpočinku. Při narůstající fyzické zátěži se přímo úměrně zvyšuje produkce VR vedoucí ke vzniku oxidačního stresu a směřující k svalové únavě (Heunks and Dekhuijzen, 2000, Ramel et al., 2004).

Neutralizace VR může být obtížná. Z tohoto důvodu je vhodná náležitá anti-radikálová (antioxidační) ochrana, která je komplexní a zahrnuje enzymové antioxidyanty, jak lipofilní, tak hydrofilní povahy (Holeček, 2006). Odstranění ROS a RNS probíhá několika způsoby a to působením antioxidyantů, kde mezi nejvýznamnější patří rostlinné fenolové sloučeniny, vitamín C, vitamín E, glutation, kyselina močová, selen, zinek, glutation (Elmastas et al., 2007). Dále prostřednictvím potlačení (tzv. quenching), kdy se volné radikály pevně zachytí jinými molekulami a tím dojde k jejich zneškodnění. Případně reakce dvou volných radikálů vzájemně, kdy dojde ke sdílení elektronů a volné radikály zaniknou, např.  $\text{NO}\cdot + \text{OH}\cdot = \text{ONOO}^-$ , nebo vyloučením z těla běžnou cestou: skrze moč, stolicí a hnis.

**Obr. 1:** Mechanismus ovlivňující stárnutí (Beckman and Ames, 1998)



### 3.2.1 Negativní účinek volných radikálů

Negativní působení volných radikálů označujeme pod pojmem oxidační stres (Valko et al., 2006). Oxidační stres je způsobován primárně nerovnováhou mezi endogenními pro-oxidačními enzymy, jakou je xantin oxidáza a NADPH oxidáza. Dále enzymy s antioxidačními vlastnostmi: superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza, heme oxygenáza, thioredoxin peroxidáza/peroxiredoxina, kataláza a paraoxonáza (Förstermann, 2010).

Účinky oxidačního stresu jsou náhodné povahy a dominantní účinek je nasměrován na takovou buněčnou membránu s lipidy, která má zastoupení většího množství proteinů (MacLean et al., 1992). VR jsou zodpovědné za vznik více než 100 druhů nemocí, převážně se



jedná o různá nádorová onemocnění (mozku, žaludku, trávicího traktu, prsu, děložního hrdla, plic, prostaty, kožních nádorů a dalších) (Sun, 1990, FU et al., 2002, Cheung et al., 2003, Liu et al., 2004, Holeček, 2010, Vaz et al., 2011).

Dále VR negativně ovlivňují imunitu a růst (Catoni et al., 2008), prokazatelný je jejich častý výskyt u autoimunitních onemocnění typu systémový lupus erythematoses, Crohnova choroba (Svačina et al., 2010) a diabetu (Kim et al., 2008, Magenta et al., 2014). Mohou zapříčinit osteoporózu (Yalin et al., 2005), šedý zákal a srdeční nedostatečnost (Kaur and Kapoor, 2001, Barros et al., 2007a), prokazatelný je i negativní působení na aterosklerózu (Halliwell and Gutteridge, 1984, Violi et al., 2004, Li et al., 2014, Kasper and Burghardt, 2015).

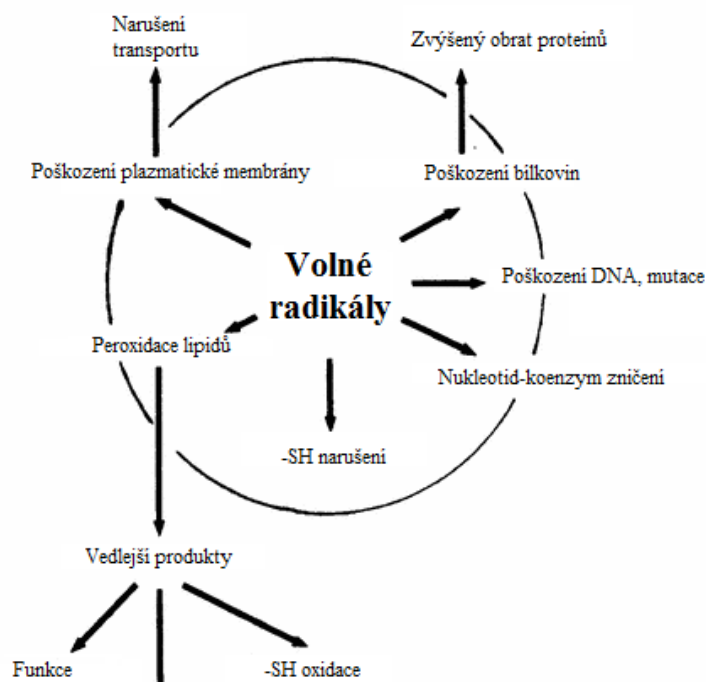
Při poničení buněčných membrán tvořených lipidy může dojít k arytmii v důsledku působení VR (Davies et al., 1990). V kombinaci těžce pracujícího svalu, který se zahřívá až na teplotu 45 °C za snížení hodnoty pH, expanze leukocytů a tvorby VR může docházet u svalových vláken k těžkému poškození. Obzvláště bílá vlákna jsou na stres citlivá (Svačina et al., 2010). Dále může docházet k poškození mozku prostřednictvím lipoperoxidací mastných kyselin s větším počtem dvojných vazeb (Siesjö et al., 1988), což dokazuje i větší výskyt volných radikálů nacházející se v pacientech po mozkové mrtvici (Maeno et al., 2009). Poškozují DNA (Fu et al., 2002) a oxidují proteiny (Cheung et al., 2003).

Oxidační stres a snížené produkce NO jsou pravděpodobné faktory spjaté se syndromem inzulínové rezistence. Oxid dusnatý je přímo spotřebováván produkty pokročilé lipoxidace, které navíc mají schopnost oxidovat a glykosylovat LDL částice (low density lipoproteine), což zvyšuje schopnost poškozovat funkci iNOS. Dále při probíhajícím oxidačním stresu a náležitém vyčerpání antioxidantů dojde k reakci superoxidového radikálu s NO za vzniku ONOO<sup>-</sup> (Svačina and Owen, 2003) s vlastnostmi toxické látky (Domenico, 2004). V průběhu triatlonu bylo zjištěno, že podání antioxidantů má pozitivní ochranný vliv při delším svalovém výkonu na oxidační stres (Neubauer et al., 2010). Nedostatek antioxidantů (obr. 2) tedy vede ke snížení výkonnosti, což není podceňováno ve sportovní sféře, ale je opomíjeno v té těžce pracovní (Svačina et al., 2010).

Významný vliv VR je přikládán v procesu stárnutí. Přestože existuje více než 300 teorií o stárnutí, s tou dnes nejvíce uznávanou přišel roku 1956 Denham Harman se zjištěním, že volné radikály jsou produkovány aerobním cyklem s kumulujícím se poškozením tkání oxidací, které jsou zodpovědné za stárnutí a smrt (Harman, 1992, Beckman and Ames, 1998, Harman, 2006).

V průběhu stárnutí klesá antioxidační ochrana těla (třeba snížením tvorby koenzymu Q-10), zvyšuje se poškození stavebních složek těla (lipidů, proteinů, DNA) přičemž se snižuje tělesná schopnost regenerace biomolekul a zrychluje se zkracování telomerů, jež jsou pro život limitující. Uvnitř buněk stoupá koncentrace vápníku, LDL, produktů lipoperoxidace, aldehydy, homocystein, ferritin aj. Klesá endoteliální produkce NO. Velká škála negativních změn se manifestuje ve stáří v podobě širokého spektra onemocnění (Holeček, 2006). Přiměřeným příjmem antioxidantů a snížením kalorické hodnoty jídla se dá prodloužit průměrný věk o 5 let a více (Harman, 1992). Novější práce poukazují ovšem na jinou příčinu a oddělují se od tradiční teorie navržené Harmanem (Viňa et al., 2013, Gladyshev, 2014). Negativní účinek ROS má být spíše spjat se sníženou signalizací než s poškozením citlivých cílů (Liochev, 2013).

**Obr. 2:** Negativní působení volných radikálů (Slater, 1988)



### 3.3 Antioxidanty

Termín antioxidant byl definován již v 40. letech 19. století poměrně úzce, jako látka schopná zastavit řetězové radikálové reakce typu peroxidace lipidů (Barros et al., 2007a, Pláteník, 2009). Rostlinné antioxidanty jsou sekundární metabolity syntetizované rostlinou k vlastní ochraně před oxidačním stresem (Catoni et al., 2008). Antioxidanty chrání rostlinné i živočišné tkáně před poškozením (Sun, 1990), které vzniká v důsledku účinku VR. Jejich účinek je zejména ve schopnosti zabránit formování VR (Barros et al., 2008a, Niki, 2014) a v odstranění s iniciací jejich rozkladu (Young and Woodside, 2001). Antioxidanty mohou sloužit jako prevence nebo ochrana před chronickými záněty, obezitou, rakovinou a dalšími chorobami (Steinmetz and Potter, 1996, Fang et al., 2002).

Za nejdůležitější fytochemické sloučeniny považujeme rostlinné fenolové sloučeniny, jež vykazují fyziologické působení. Jedná se o účinky protialergenní, antimikrobiální, antioxidační, protizánětlivé, vazodilatační a další jim podobné (Puupponen-Pimiä et al., 2001, Manach et al., 2005). Tyto látky s antioxidačními účinky se nacházejí téměř ve všech potravinách rostlinného původu. Zejména v ovoci, zelenině (Hertog et al., 1993, Kaur and Kapoor, 2001), lze je nalézt v houbách (Kim et al., 2008, Han et al., 2011, Palacios et al., 2011, Vaz et al., 2011, Chowdhury et al., 2015, Tel et al., 2015), čokoládě, víně, pivě, kávě, čaji a mnoha bylinách (Henríquez-Sánchez et al., 2015). Množství antioxidantů obsažených v potravinách vyrobených z rostlin bohatých na rostlinné fenolové sloučeniny přímo koreluje se stářím těchto potravin (Serafini et al., 2002).

Konzumace potravin bohatých na antioxidanty pozitivně ovlivňuje množství antioxidantů přítomných v lidské plazmě (Stanner et al., 2004, Elmastas et al., 2007), prostřednictvím čehož může docházet k omezení výskytu různých nádorových onemocnění (Steinmetz and Potter, 1996, Fang et al., 2002). Přestože v posledních letech trh zaplavil obchod s umělými antioxidanty, pomalu se od nich odpouští z důvodu toxicity a ohrožení zdraví (Liu et al., 2004, Bjelakovic et al., 2014).

Buňky mají pestrou škálu antioxidačních mechanismů chránící a opravující buňky (Koracevic et al., 2001). Obecně antioxidační ochranu ovlivňují zejména koncentrace antioxidantů, oxidovaný substrát, přítomnost dalších antioxidantů (v důsledku synergického či antagonistického působení), použité rozpouštědlo (v testech *in vitro*), pH, homogenita či více fázovost sledovaného systému, přítomnost dalších látek (obzvláště bílkovin), oxidační činidlo, fyzikální faktor (světlo) iniciující oxidaci, teplota, parciální tlak kyslíku, resp. obecně přístup ke

kyslíku a přítomnost iontů kovů s proměnlivou valencí (Réblová, 2012). Koncentrace *in vitro* jsou častěji i řádově vyšší než reálné koncentrace antioxidantů *in vivo*. Významný vliv na antioxidační aktivitu může mít i způsob sledování oxidace nebo způsob kvantifikace oxidačního účinku (Pinchuk et al., 2012). Mezi další důležitý faktor, který ovlivňuje účinek antioxidantů mezi *in vitro* a účinkem *in vivo*, je jejich biologická dostupnost tvořena třemi kroky: uvolnění příslušných látek z potravinové matrice, jejich vstřebávání v trávicím traktu a samotný přestup do buněk (Réblová, 2011).

Rozdělení antioxidantů dle Kochhar and Rossell (1990):

- 1) rostlinné fenolové sloučeniny
- 2) sloučeniny, které reagují s kyslíkem přímo (vitamin C)
- 3) sekundárních antioxidantů - rozkládají hydroperoxydy na stabilnější sloučeniny
- 4) enzymatická antioxidanty
- 5) chelataující a maskující činidla - kyselina citrónová, aminokyseliny

Jeden z dalších úhlu pohledů na rozdělení antioxidantů je v důsledku vysvětlení pojmu antioxidační ochrana těla, které zahrnuje prvně anatomické uspořádání regulující hladinu kyslíku v těle. Lidské tělo využívá obdobnou primitivní strategii jako nižší vývojový druh jednobuněčných organismů, které se před toxickou koncentrací kyslíku chrání shlukováním. Lidský povrch těla je chráněn vrstvou mrtvých buněk, které říkáme kůže, a epitel dýchacích a trávicích cest je pokryt hlenem. Konečný spotřebitel kyslíku (mitochondrie) díky těmto praktikám pracuje s 300× menší koncentrací kyslíku, než je ve vzduchu (Pláteník, 2009). Za druhé tělo využívá antioxidační enzymy v čele s superoxidodismutázou produkující peroxid vodíku, na jehož redukci je v těle již mechanismu více (Réblová, 2011). Za třetí můžeme uvést sekvestraci redoxně aktivních přechodných kovů Fe a Cu, které jsou nezbytné pro život. Další skupinou jsou antioxidační substráty, nebo taky nízkomolekulární antioxidanty, do kterých zařazujeme buněčné thioly, bilirubin, kyselina močovou, vitamin C a jim podobné. Za 5. jde o stresovou reakci organismu na oxidační stres, kde dávka, jež organismus/buňku nezabije, jí posílí a konečně do antioxidační ochrany *sensu lato* zařazujeme i systémy opravující oxidační poškození DNA, proteinů a lipidů (Pláteník, 2009).

## 3.4 Antioxidanty přítomné v houbách

### 3.4.1 Vitamíny v houbách

#### 3.4.1.1. Vitamin B2

Vitamin B2 (Riboflavin) byl poprvé izolován v nečisté formě z bovinního mléka roku 1879 (Ross, 2014). Riboflavin je ve vodě rozpustný vitamín (Petteys and Frank, 2011) nacházející se v určitém množství i v houbách (Bernaš et al., 2006). Je součástí koenzymů hrající důležitou roli v oxidačním metabolismu (Sugiyama, 1992). Riboflavin je často odmítán do zařazení antioxidantů. Sám o sobě nemá nikterak významné antioxidační schopnosti, ale má silné antioxidační působení *in vivo* jako prekurzor FMN a FAD. Hlavní protektivní role před nechtěnou lipoperoxidací je jeho účast v glutationovém redox cyklu (Rivlin and Pinto, 2001).

#### 3.4.1.2. Vitamin C

Vitamin C byl identifikován v 30. letech 19. století Albertem Szent-Gyorgyi (Svirbely and Szent-Györgyi, 1933). Chemicky se jedná o ve vodě rozpustný ketolaceton s dvěma ionizujícími hydroxylovými skupinami poskytující antioxidační vlastnosti (Fang et al., 2002, Padayatty et al., 2003). Reakci s volným radikálem provází vznik dehydroaskorbové kyseliny a askorbového radikálu, který je poměrně nereaktivní v důsledku rezonance dvou volných elektronů (Du et al., 2012). V těle tvoří 9 % antioxidační kapacity člověka (Holeček, 2006). Jeho prostřednictvím jsou chráněny další antioxidanty, třeba vitamin E (Bendich et al., 1986). Jako antioxidant reaguje rychle s volnými radikály (Packer et al., 1979) a kombinací s bioflavonoidy účinněji blokuje volné radikály (Balch and Balch, 1997), tudíž chrání před oxidačním stresem.

Určitá koncentrace vitamínu C je nezbytná pro celou škálu metabolických dějů, např. pro syntézu kolagenu v pojivové tkáni, pro syntézu hormonů kůry a dřeně nadledvin, pro resorpci nehemového železa, pro hojení ran, optimální funkci imunitního systému (Kasper and Burghardt, 2015). Dále chrání mukózní tkáň a brání tvorbě nitrosaminů v žaludku (Duell et al., 2013), zabraňuje rozvoji rakoviny příjmem velkých dávek intravenózně (Mikirova et al., 2012), ale jeho perorální příjem nemá vliv na výskyt rakoviny prsu (Hutchinson et al., 2012), prostaty a dalších druhů rakoviny (Wang et al., 2014). Vyšší příjem vitamínu C ovlivňuje délku

běžné chřipky (Hemilä, 1994, Van Straten and Josling, 2002, Douglas and Hemilä, 2005), ale zároveň může dojít k evokaci gastrointestinálních potíží, především osmotického průjmu (Kasper and Burghardt, 2015). Riziko spjaté s tvorbou ledvinových kamenů je posuzováno různě, pro bezpečnost se přiklání Curhan et al. (1996, 1999), a Traxer et al. (2003), proti tomu oponuje Baxmann et al. (2003), a Thomas et al. (2013). Protože je otázka ohledně tvorby ledvinových kamenů stále otevřená, aby se zabránilo nežádoucím účinkům, byla navržena hodnota LOAEL v Německu (Lowest Observed Adverse Effect Level), 3g/den, a UL (Tolerable Upper Intake Level), 2g/den (Kasper and Burghardt, 2015).

#### 3.4.1.3. Vitamin D

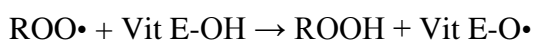
Přestože byl tento vitamín jinak nazývaný kalciferol objeven přibližně před 100 lety, jeho nedostatek byl popsán daleko předtím. Již v roce 1645 D. Whistlerem v Nizozemí a roce 1650 F. Glissonem v Anglii popsali příznaky nedostatku tohoto vitamínu (Ross, 2014). V současnosti rozlišujeme mezi ergokalciferolem ( $D_2$ ), vyskytujícím se v rostlinách, a cholekalciferolem ( $D_3$ ) získávaný prostřednictvím potravin živočišného původu. Lidský organismus si vytváří určité množství vitamínu  $D_3$  z dehydrocholesterolu působením ultrafialového záření B (UVB) obsaženého ve světle (Lehmann and Meurer, 2010). Z  $D_2$  nebo  $D_3$  se v játrech syntetizuje 25-hydroxykalciferol (kalcidiol). Ten je posléze v ledvinách hydroxylován na 1,25-dihydroxycholekalciferol (kalcitriol), podílející se na mnoha významných tělesných funkcích (Christakos et al., 2012). Cirkulace metabolitu tohoto vitamínu ovlivňuje homeostázi vápníku a fosforu, růst a regulace, imunitní reakce, kardiovaskulární záležitosti a neuro-svalové efekty (Ross, 2014). Vitamin D má i antioxidační vlastnosti, kdy jako membránový antioxidant inhibuje na železu závislé lipozomální peroxidace lipidů (Wiseman, 1993).

Houby jsou jediným neživočišným zdrojem vitamínu D (Han et al., 2011) a volně rostoucí houby jsou jeho dobrým zdrojem, ovšem k jeho produkci je zapotřebí dostatek přirozeného světla (přesněji UVB), čímž předčí houby běžně pěstované ve tmě (Guillamón et al., 2010, Valverde et al., 2015). Populace v České Republice trpí celoročně nedostatečným příjmem vitamínu D (Tláskal, 2013). Proto je hodnotným doplňkem tohoto vitamínu právě konzumace hub, obzvláště v zimních měsících, kdy je slunečního záření méně.

#### 3.4.1.4. Vitamin E

Objevitelem Vitaminu E byl H. E. Mattill, když se postupně zajímal od roku 1920 o složení kravského mléka, které sám označil za „perfektní jídlo“ (Wolf, 2005). Vitamin E je obecný termín pro všechny tokoferoly a tokotrienoly (Valk and Hornstra, 2000). Jako účinný antioxidant (Fang et al., 2002) působí preventivně proti oxidaci lipidů buněčných membrán tím, že likviduje vzniklé peroxylové radikály. Peroxylové radikály upřednostňují 1000× vitamin E před PUFA za vzniku tokoperoxylového radikálu (Vit E-O•) (Ross, 2014).

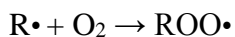
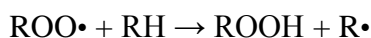
##### **Reakce v přítomnosti vitamínu E:**



(Tokoperoxylový radikál následně reaguje s vitaminem C a obnoví se tak Vitamin E)

(Packer et al., 1979)

##### **Reakce bez přítomnosti vitamínu E:**



(Ross, 2014)

Má zastoupení v prevenci šedého očního zákalu způsobeným radikálovým poškozením oční čočky (Balch and Balch, 1997). Tvoří přibližně 3 % antioxidační schopnosti člověka (Holeček, 2006) a působí společně se selenem (Balch and Balch, 1997).

#### 3.4.2 Minerály v houbách

Houby jsou bohaté na stopové prvky (Bernaš et al., 2006), dále je rozepsán selen pro jeho relativní vzácnost v středoevropské stravě a pro jeho biologické působení.

#### 3.4.2.1. Selen

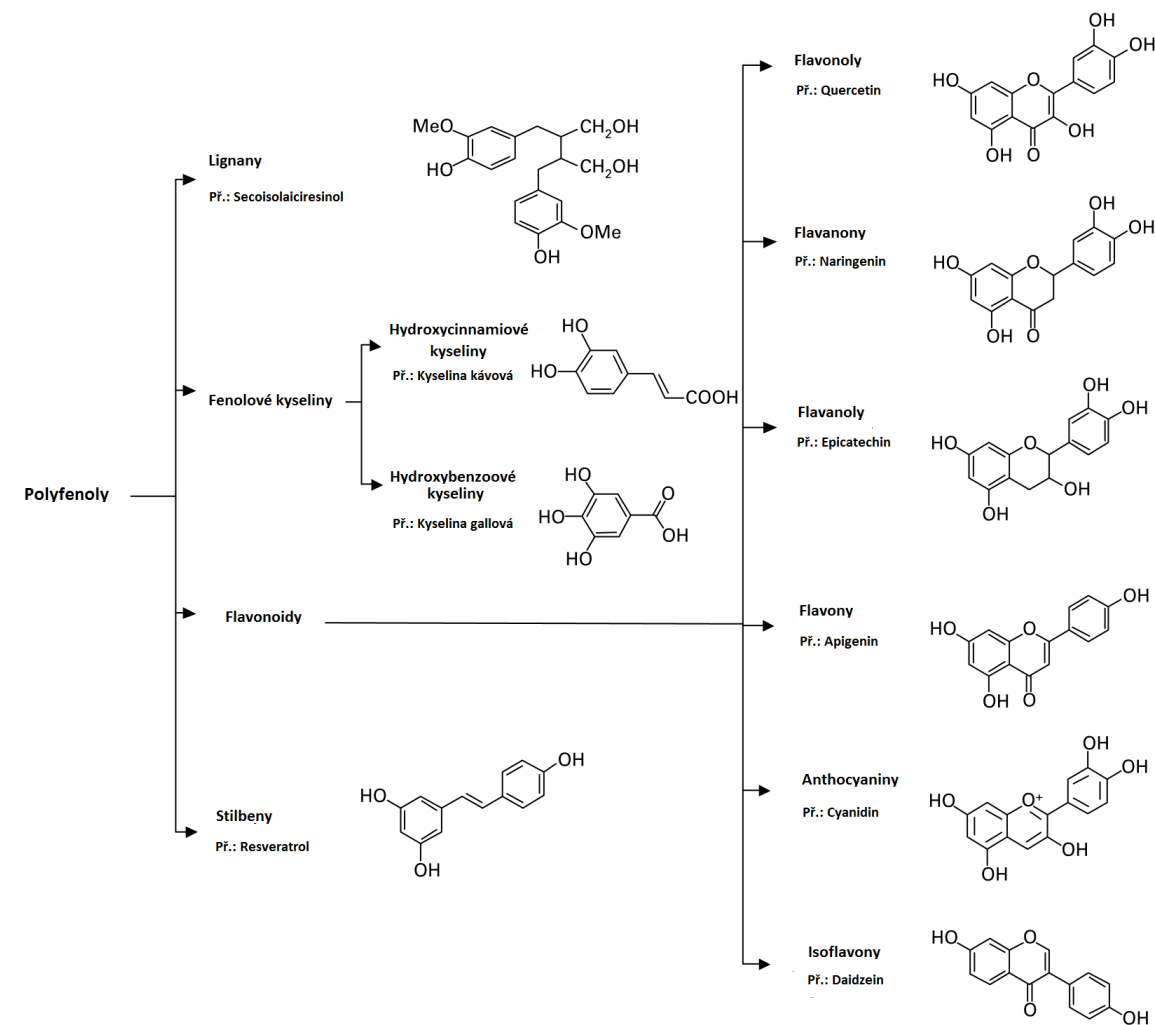
Stopový prvek selen byl objeven v roce 1817 Berzeliem (Hatfield et al., 2011). O selen se poprvé začali biologové zajímat v 30. letech minulého století, kdy došlo k otravám dobytka při spásání trávy rostoucí na půdě bohaté na selen (Ross, 2014). O více jak 20 let později Schwarz and Foltz (Schwarz and Foltz, 1957) zjistili na vitamín E deficitních krysách, že příjem selenu předchází výskyt jaterní nekróze a začalo se na tento prvek nahlížet jinak, než jen jako ryze toxickou záležitost (Schwarz and Foltz, 1957). Selen působí společně s vitamínem E. Je součástí enzymu glutathion peroxidázy, který konvertuje škodlivý peroxid vodíku na vodu za současné oxidace glutathionu (Balch and Balch, 1997, Kasper and Burghardt, 2015). Biologická dostupnost z hub pro člověka je neznámá, ale výsledky na krysách hovoří o 5 % (Ross, 2014). Nedostatek selenu vyvolává těžké poškození jater, srdečního svalu, pohlavních žláz aj. Ve vyšších koncentracích působí selen teratogenně, mutagenně a karcinogenně (Kasper and Burghardt, 2015).

#### 3.4.3 Rostlinné fenolové sloučeniny

Fenolové sloučeniny jsou aromatické složky hub složené z jednoho či více aromatických kruhů, s jednou nebo více hydroxylovou skupinou. Zahrnují velký počet podtříd (obr. 3), příkladem flavonoidy, fenolové kyseliny, stillbeny, lignany, tanniny a oxidované fenoly (Palacios et al., 2011). Mnohé *in vivo* a *in vitro* studie prokázaly podpůrné biologické vlastnosti s pozitivním vlivem na lidské zdraví (Wasser and Weis, 1999, Barros et al., 2007c). Rostlinné fenolové sloučeniny mají řadu účinků zahrnující antioxidační, protizánětlivé, antialergické, protinádorové, proti-artritické a antimikrobiální působení (Vaquero et al., 2007, Palacios et al., 2011). Dále jsou spojovány se zpomalením progresu nádorových onemocnění a aterosklerózy (Cheung et al., 2003, Puttaraju et al., 2006). Bioaktivita může být provázaná se schopností chelatace kovů, inhibicí lipooxygenasy nebo zhašením VR (Decker, 1997, Puttaraju et al., 2006).



**Obr. 3:** Rozdělení fenolických látek na skupiny a podskupiny (Spencer et al., 2008)



Flavonoidy jsou podskupinou rostlinných fenolových látek, které čítají nad 8000 sloučenin (Pietta, 2000). Nacházejí se v rostlinné stravě (Liu et al., 2004, Spencer et al., 2008) a v nápojích z nich připravených (př.: červené víno nebo čaj) (Ishige et al., 2001). Jedna z prvotních funkcí diskutovanou kolem flavonoidů byla jejich antioxidační ochrana v potravinách zahrnující stabilizaci potravin proti hnití, žluknutí a prodloužení trvanlivosti. V posledních 20 letech proběhlo mnoho studií na téma flavonoidů prokazující pozitivní účinky na zdraví organismu.

Příjem flavonoidů může přímo korelovat s výskytem kardiovaskulárních a nádorových onemocnění a dalších chronických onemocnění (Ross, 2014). Zájem obzvláště prohloubil roku 1992 doktor Renaud na základě epidemiologických dat, které souvisely s příjmem vína

a množstvím saturevaných tuků, dnes známý pod pojmem „Francouzský paradox“ (Catalgol et al., 2012). Další studie zabývající se působením flavonoidů nasměřoval k prevenci rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění. Účinek byl připisován resveratrolu (Criqui and Ringel, 1994, Kopp, 1998). Při bližším přezkoumání se tento účinek resveratrolu v takové míře, který je obsažen ve víně, neprokázal. Zdravotní účinek je nyní připisován spíše ke konzumaci většího množství zeleniny (Ferrières, 2004) případně menším a častějším porcím (Rozin et al., 2003). Je těžké ustanovit náležité benefity flavonoidů na zdraví z několika důvodů: Existuje příliš velká rozmanitost mezi flavonoidy v rostlinné stravě, obzvláště v závislosti na jejich množství. Navíc nejsou známy přesné metabolické cesty (Spencer et al., 2008).

Flavonoidy se někdy označují za vitamín P, ale nejsou vitamínem v pravém slova smyslu (Balch and Balch, 1997). Flavonoidy jsou skupinou fenolových sloučenin se zdraví prospěšnými účinky, mezi něž můžeme zařadit protizánětlivé působení, zhášení VR, inhibice hydrolytických a oxidativních enzymů (Kim et al., 2008). Jeden z důležitých funkčních faktorů u flavonoidů je jejich protizánětlivé působení skrze efekt na redox transkripující nukleární faktor kappaB (Epstein et al., 1997), navozující (indukující) syntézu oxidu dusnatého (Anson et al., 2010). Protizánětlivý efekt flavonoidů spočívá v inhibici syntézy a aktivity prozánětlivých mediátorů eikosanoidů, cytokinů, adhezujících molekul a C-reaktivního proteinu (Serafini et al., 2010). Ve střevech flavonoidy vykazují nejen důležitou protizánětlivou aktivitu asociující s inhibicí makrofágů, ale fungují i antioxidačně. Některé flavonoidy také snižují TNF0 (tumor necrosis faktor) a navozují syntézu NO (Sánchez de Medina and Zarzuelo, 2008).

### 3.5 Protizánětlivá aktivita jedlých hub

Historické záznamy o zánětu lze najít prakticky v každé knize spjaté s poraněním v písemnostech ze staré Mezopotámie, starého Egypta, Řecka a dalších. Zánětem se rozumí odpověď živé tkáně na lokální poškození, vedoucí k akumulaci krevních buněk a tekutiny pro navýšení ochrany před napadením cizím organismem (Ryan and Majno, 1977). Akutní zánět je tedy nejrychlejší odezva imunitního systému na poškození buněčných tkání. Krátce trvající odezva imunitního systému ve formě zánětu je normální s řadou přínosů, naopak dlouze trvající zánět je škodlivý a bolestivý proces (Romieu et al., 2004). Zánětlivé mediátory zahrnují metabolity kyseliny arachidonové, cytokiny, chemokiny a volné radikály. Chronické vystavení těmto mediátorům vede k zvýšení buněčné proliferace, mutagenezi, onkogenní aktivaci a angiogenezi (Shacter and Weitzman, 2002).

Strava ovlivňuje zánětlivé odpovědi organismu. Špatná nevyvážená strava a obezita je zodpovědná za dlouhodobý oxidační a zánětlivý stres vedoucí k mnoha onemocněním (Joseph et al., 2015) typu astma, revmatická artritida, idiopatické střevní záněty, lupénka, ateroskleróza a další (Epstein et al., 1997, Epstein and Ross, 1999, Svačina et al., 2010).

Houby vykazují protizánětlivé účinky, jak ukazují studie Borchers et al. (2004), Han et al. (2011), Du et al. (2015), Ruthes et al. (2015), Valverde et al. (2015). Nejdůležitějšími protizánětlivými látkami v houbách jsou polysacharidy (Wasser, 2002). Protizánětlivé účinky hub jsou dány regulací prozánětlivých cytokinů: NO, interleukiny, TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor), INF- $\gamma$  (interferon), prostaglandiny E<sub>2</sub> aj. (Du et al., 2015). Systémový zánět, resp. zánět po jídle, se u obézních lidí nedaří ovlivnit žádnými jídelními úpravami včetně antioxidantů (Svačina, 2014, pers. comm.).

### 3.5.1 $\beta$ -glukany

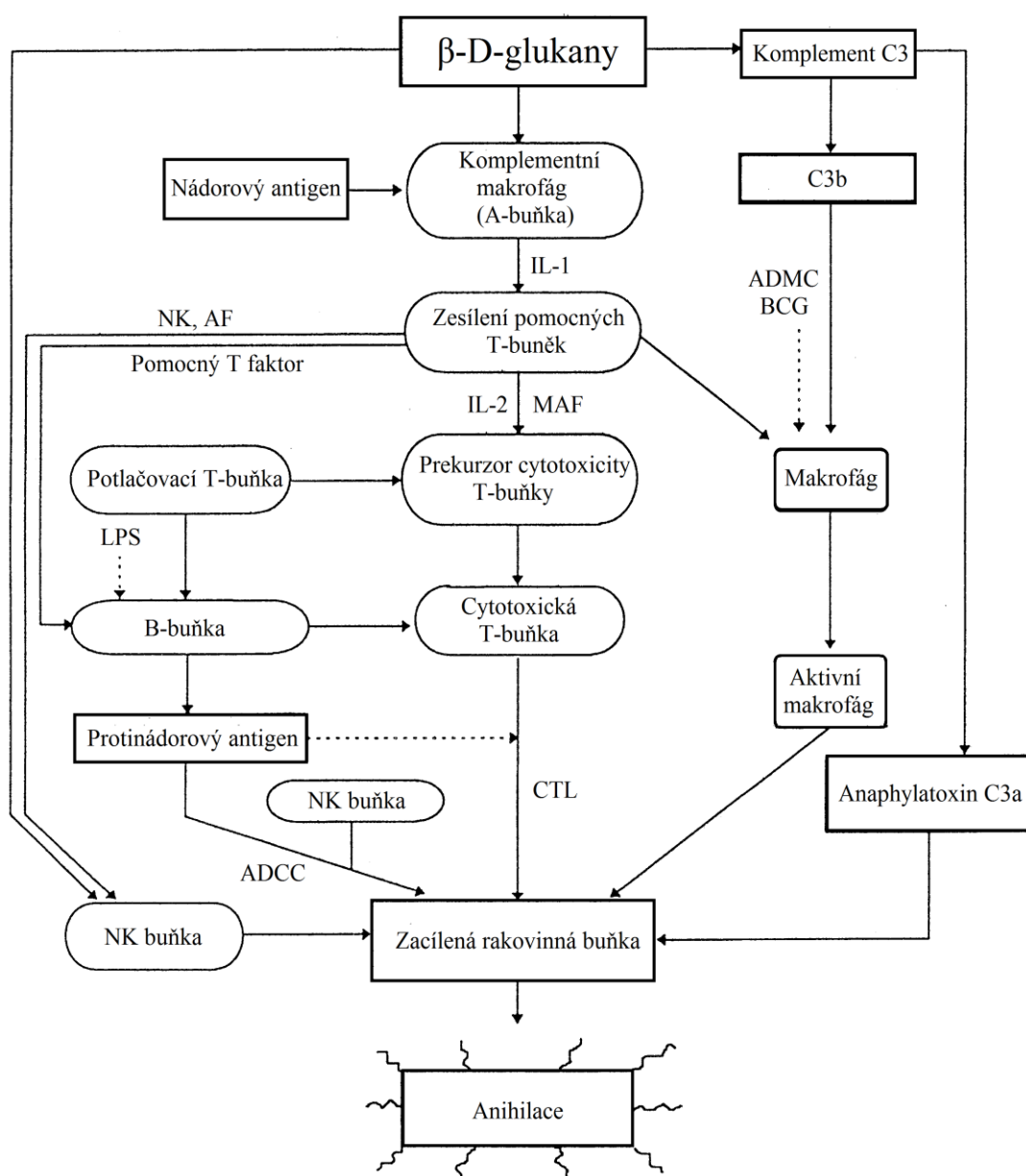
$\beta$ -glukany patří do heterogenní skupiny glukozových polymerů. Jsou součástí buněčných stěn rostlin, některých bakterií, volně rostoucích hub a řas se schopností ovlivnit imunitní systém (Akramiene et al., 2006, Sweeney et al., 2012).  $\beta$ -glukany jsou ve vodě rozpustné, fermentovatelné vlákniny, které se za působení střevní mikrobioty rozkládají za vzniku kyseliny chlorovodíkové, propionové, máselné, valerové a heptonové (Immerstrand et al., 2010). Speciální formy  $\beta$ -glukanů: homo- a heteroglukany s glykosidickými můstky ( $\beta$  (1- $\rightarrow$ 3),  $\beta$  (1- $\rightarrow$ 4) a  $\beta$  (1- $\rightarrow$ 6)) jsou zodpovědné za některé zdravotní přínosy hub. Jedná se o zlepšení funkce makrofágů, zvýšení odolnosti proti virovému, bakteriálnímu, houbovému nebo parazitickému napadení (Manzi and Pizzoferrato, 2000, Bernas et al., 2006) či alespoň vykazují protinádorovou aktivitu (obr. 4) (Brown and Gordon, 2001, Borchers et al., 2004).

Rozpustnost a viskozita s molekulární váhou jsou hlavní fyziologicko-chemické parametry určující účinnost  $\beta$ -glukanů a ovlivňující glukozovou odpověď s působením střevních hormonů (Carbonero et al., 2006). U těžkých molekul byl zjištěn rozpad na větší množství menších monomerů. Rozpustnost ve vodě je nepřímo úměrná velikosti a váze  $\beta$ -glukanů, kde těžší a více molekulární  $\beta$ -glukany jsou efektivnější než lehčí (Wasser, 2002). Viskozita příliš neovlivňuje absorpci  $\beta$ -glukanů (Immerstrand et al., 2010).

Dále mají schopnost snižovat hladinu cholesterolu (Lavi et al., 2006). Vykazují protinádorové působení (Nitschke et al., 2011), mají anti-mutagenní a anti-cytotoxické účinky

(Guillamón et al., 2010). Svoji strukturou aktivují makrofágy a NK (nature killers) buňky (Akramiene et al., 2006) mající významnou roli v imunitním systému. Při dlouhodobějším podávání  $\beta$ -glukanů dochází k lepší odolnosti respiračního systému proti infekcím v důsledku vyšší tělesné zátěže (Carpenter et al., 2013). Existuje předpoklad, že obdobně jako vláknina pozitivně ovlivňuje postprandialní glykémii a stav krevních tuků, tak by větší příjem  $\beta$ -glukanů měl ovlivnit postprandialní glykémii a s tím spjatou insulinovou rezistenci. Při zvětšeném příjmu ovšem nebyly zaznamenány změny (Cugnet-Anceau et al., 2010).

**Obr. 4:** Možné ovlivnění imunitního systému v přítomnosti  $\beta$ -glukanů (Wasser, 2002)



### 3.5.2 Oxid dusnatý – marker buněčného zánětu

NO je plyn, který v roli signální molekuly ovlivňuje mnoho fyziologických procesů (Kröncke et al., 1997, Domenico, 2004). V 80. letech minulého století byl objeven NO jako tzv. endothelium-derived relaxing faktor (EDRF) v buněčném endotelu (Palmer et al., 1987). NO vzniká přeměnou z L-argininu (Nathan and Xie, 1994, Napoli and Ignarro, 2001) a citrulinu, který je prekursorem nové syntézy argininu, čímž se i citrulin stává významným prekurzorem vzniku NO. Arginin si dokáže ale tělo vyrobit *de novo* zároveň z jiných aminokyselin a nemusí být nutně přijímán potravou (Ross, 2014). NO se syntetizuje z argininu třemi různými formami syntetázy oxidu dusnatého (NOS) v důsledku působení 3 různých genů (neuronová NOS jako NOS 1, inducible NOS jako NOS 2 a endoteliální NOS jako NOS 3) (Weitzberg and Lundberg, 1998, Pergola et al., 2006a, Förstermann and Sessa, 2012).

Oxid dusnatý je nepřetržitě produkován NOS 1 a NOS 3, které jsou aktivovány kalcium/kalmodulin komplexem. NOS 2 je nezávislý na vápníku a jeho množství stoupá při zánětlivých reakcích a s tím roste i produkce NO (Peponis et al., 2002). NO vyprodukovaný NOS 1 a 3 funguje jako neurotransmiter, k tomu ovlivňuje tonus stěn cév (Förstermann, 2010). NO syntetizované NOS 2 ovlivňuje významné imunologické funkce, mezi které patří zabíjení cizích patogenů, produkce cytokinů a produkce T-pomocných buněk. Navíc tento NO vyprodukovaný NOS 2 má cytoprotektivní účinky, když zvyšuje cirkulaci cytokinů, jako TNF- $\alpha$  a interleukiny 6 a 8 (Ross, 2014). NO splňuje mnoho biologických funkcí: nitrobuněčně aktivuje receptory plasmatické membrány a extracelulárně slouží jako parakrinní faktor přenášející informace mezi buňkami (Peponis et al., 2002), pozitivně ovlivňuje orexigenní osu (Papežová, 2010), podporuje mitochondriální biogenezi (Valerio and Nisoli, 2015). NO je důležitý pro plynulý proud krve (Vallance et al., 1989), který klesá při ateroskleróze (Nyberg et al., 2012).

### 3.6 Metody stanovení antioxidační a protizánětlivé aktivity

Měření reaktivity jednotlivých izolovaných látek vůči volným radikálům je jeden z přístupů ve výzkumu antioxidačních a protizánětlivých sloučenin. Hlavní zjištění pak vyplývá z odvození vztahu mezi strukturou a reaktivitou individuálních látek. Prakticky většinu přírodních antioxidantů přijímáme z potravy jako součást složitých směsí, jež mohou mezi sebou různými způsoby reagovat, působit synergicky nebo inhibičně. Z tohoto důvodu se měření antioxidační

kapacity provádí na celých vzorcích mnohem častěji, než na jednotlivých sloučeninách (Paulová and Bochořáková, 2004). Pro porovnání veškeré antioxidační schopnosti různých směsí se používá TAA (Total Antioxidant Activity), která kvantifikuje schopnost vzorku potírat VR (Fidler and Kolářová, 2009). Za nejčastější metody používané k zhodnocení TAA patří metody ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TEAC (Trolox Equivalent Absorbance Capacity), FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) a TPC (Total Phenolic Content), metod existuje ovšem mnohem více. Metody jsou kategorizovány do dvou skupin, a to na metody posuzující redoxní vlastnosti a na metody hodnotící schopnost eliminovat volné radikály. Metody posuzující redoxní vlastnosti látek využívá metody chemické (FRAP), elektrochemické (cyklická voltametrie, HPLC). Metody založené na eliminaci volných radikálů dělíme na metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů (TEAC, DPPH, používající galvinoxyl), metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů (ORAC) a na metody hodnotící lipidové peroxidace (He et al., 2012)

### 3.7 Metody stanovení antioxidační aktivity *in vitro*

#### 3.7.1 Metoda ABTS/TEAC

Často používanou metodou pro stanovení celkové antioxidační aktivity je elektron-transférová metoda TEAC. Principem této metody je testování schopnosti látek eliminovat radikálový kationt  $ABTS^{\bullet+}$  (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-ihydrobenzenothiazol-6-sulfonát)) (Güçlü et al., 2006). Antioxidační kapacita vzorku je srovnána s aktivitou syntetického troloxu v metodě TEAC. Generace radikálů  $ABTS^{\bullet+}$  je nejčastěji iniciována peroxidem vodíku, nebo jeho směsí s methmyoglobinem či peroxidasou (Opitz et al., 2014). Rozdíly mezi měřením jsou způsobeny tím, zda radikály  $ABTS^{\bullet+}$  jsou v reakční směsi generovány před přidáním AO nebo vznikají současně s jeho přidáním. Změny, ke kterým dochází v průběhu pokusu, jsou měřeny spektrofotometricky při 734 nm. Metoda, při které je stanovena TAA pomocí ABTS, má široké uplatnění. Její pomocí jsou měřeny jednoduše a rychle směsné vzorky a látky různého původu (He et al., 2012).

### 3.7.2 Metoda DPPH

Jako první metodu DPPH popsal (Brand-Williams et al., 1995). Dnes patří mezi základní metody pro stanovení antioxidační kapacity látek (Alam et al., 2013). Testovaný vzorek reaguje s radikály difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl), který je redukován za vzniku difenylpikrylhydrazylu a změny z tmavě fialové barvy na barvu žlutou (Chen et al., 2013). Pokles absorbance se měří spektrofotometricky při 517 nm. Výhodou této analýzy je rychlost, proveditelnost a cena, ke které je potřeba pouze UV-VIS spektrofotometr, díky čemuž je metoda velmi oblíbená a využívána v mnoha laboratořích. Nedostatkem této metody může být nesprávná interpretace výsledků, kdy výsledky mohou být ovlivněny různými sloučeninami, které se ve výsledku mohou spektrofotometricky překrývat s produkty DPPH. Podstatnější nevýhodou patří mizivá podobnost mezi DPPH radikály a peroxylovými radikály, jež se podílejí na peroxidaci membrán (Deng et al., 2011). Důsledkem toho je, že antioxidanty, které jinak velmi rychle reagují s peroxylovými radikály, mohou s DPPH reagovat pomaleji (Prior et al., 2005).

### 3.7.3 Kyslíková radikální absorbční kapacita (ORAC)

Tato metoda je využívána při měření antioxidačních vlastností potravin a chemických látek. K této metodě se využívá jako cílová molekula  $\beta$ - $\beta$ -fykoerythrin (PE) nebo fluorescein (FE). Nejčastěji se využívá fluorescein jako cílová molekula při ORAC testech. Další standart pro ORAC testy může být trolox, kdy výsledná hodnota ORAC se následně vypočítá jako ekvivalent troloxu a vyjádří se jako ORAC jednotky. Čím vyšší je hodnota ORAC tím větší je antioxidační schopnost testované látky nebo potraviny (Alam et al., 2013).

Test je založen na generaci volných radikálů využitím AAPH (2,2-azobis 2-amidopropan dihydrochlorid) a měří se pokles fluorescence v přítomnosti volných radikálů. Prior et al., (2003) představily automatizovaný test, ve kterém je využíván  $\beta$ -PE, který byl využit jako cíl pro poškozené volné radikály, AAPH jako peroxy radikály a trolox jako standard. Při přidání AAPH do zkušebního roztoku byla zaznamenána fluorescence a antioxidační aktivita jako ekvivalent troloxu (Cao et al., 1993).

### 3.7.4 Metody založené na vycytávání superoxidového radikálu

Superoxidové radikály jsou nejčastěji generovány při reakci 5-methylfenazinium-ethylsulfátu s NADH nebo systémem xanthin/xanthinoxidáza a ihned redukují nitrotetroliovou modř (Paulovê and Bochořêkovê, 2004). Barva je měřena pomocí spektrofotometru v rozmezí 550-560 nm. Je možné použít další varianty detekce, mezi které patří ESR, HPLC a chemiluminiscence (Paulová and Bochořáková, 2004).

### 3.7.5 Metoda založená na vycytávání radikálu oxidu dusnatého

NO• se v živých tkáních vytváří NOS katalýzou argininu na citrulin (Hevel and Marletta, 1994). Pro *in vitro* testování se používá nitroprusid sodný, který se při 7,2 pH rozkládá a dá vzniknout NO• (Maccoci et al., 1994). Aerobně vytvořené VR reagují s kyslíkem za vzniku nitrátů a nitritů, které můžeme následně kvantifikovat pomocí Griessova činidla na spektrofotometru při 540 nm (Alam et al., 2013).

### 3.7.6 Metoda FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Metoda je založena na redukci komplexu Fe<sup>3+</sup>-2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazinu) (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) přítomným antioxidantem, projevující se barevnou změnou. Absorbance se měří při 593 nm. Nevýhodou této metody je, že měření probíhá za velmi nízkého pH a není schopna dobře zachytit fenolické látky s thiohy (Prior et al., 2005). V důsledku toho metoda FRAP informuje pouze o schopnosti látek redukovat iont Fe<sup>3+</sup> a pravděpodobně nehodnotí celkovou antioxidační schopnost potravin (Ou et al., 2002).

#### 3.7.1.2. Metoda TRAP (Total radical trapping antioxidant parameter)

Zabránění rozkladu R-fykoerithrinu (R-PE) během peroxidační reakce pomocí přítomných antioxidantů je princip metody TRAP. K indikaci se využívá luminiscenční spektrometr a výsledné hodnoty se vyjadřují pomocí reakční doby vzorku porovnané s reakční dobou standardu (Prior et al., 2005). Metoda TRAP měří neenzymatické antioxidanty (glutathion, kyselina askorbovou, α-tokoferol a β-karoten), proto se často využívá v *in vivo* testech na stanovení celkové antioxidační kapacity krevní plazmy nebo séra (Prior and Cao, 1999). Nevýhodou metody TRAP je časová náročnost a vyšší obtížnost vyžadující zkušenosti.



### 3.7.7 Metoda měření inhibice xanthinoxidázy (XO)

Xanthinoxidázová aktivita s xanthinovým substrátem se měří spektrofotometricky, podle (Noro et al., 1983), smísením extraktu zkoumaného vzorku s allopurinolem ve fosfátovém pufru a roztokem xanthinoxidázy. Následná inkubace při pokojové teplotě 10 minut je zakončena přidáním roztoku xantinu a po dalších 30 minutách inkubace o pokojové teplotě se měří při absorbanci 293 nm (Havlik et al., 2010).

### 3.7.8 Měření produkce oxidu dusnatého v buněčných liniích

Metoda je založena na zjišťování koncentrace radikálů NO• u buněk, které byly stimulovány pomocí lipopolysacharidu (LPS). NO se v organismu běžně vyskytuje a je zodpovědným faktorem hrající roli při vazodilataci cév ve fyziologické a patologické angiogenezi (Ziche and Morbidelli, 2000). Zvýšená produkce NO je běžná při různých patofyziologických procesech (např. karcinogeneze) a zejména při zánětech. Ke stimulaci produkce může dojít i úmyslně, pomocí působení LPS tvořeného zevní části buněčných stěn G- bakterií (Pergola et al., 2006b). Během nádorových onemocnění jsou schopny všechny buňky produkovat NO, který ovlivňuje nádorové, stromální, zánětlivé a endotelové buňky (Ziche and Morbidelli, 2000). NO exogenního původu stimuluje průtok krve nádorem, což v konečném důsledku vede k růstu nádorů prostřednictvím zajištěním dostatečného množství živin dodávaného cévami (Akaike et al., 1996). Zkoumané vzorky mohou díky přítomným antioxidačním látkám NO• radikály zachytávat a snižovat tak jejich celkovou produkci. K vlastnímu měření je využíváno Griessovy metody, která je založena na spektrofotometrickém stanovení dusitanů po diazotaci sulfanilamidu a přidání N-(1-naftyl)-etylendiaminem. Finální produkt se měří při 540 nm (Pergola et al., 2006b).

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

Jedná se o 9 vzorků volně rostoucích hub sesbíraných v českých lesích. Bedla vysoká (*Macrolepiota procera*), čirůvka májovka (*Calocybe gambosa*), hřib hnědý (*Boletus badius*),

hřib koloděj (*Boletus luridus*), hřib kovář (*Boletus luridiformis*), hřib peprný (*Chalciporus piperatus*), kotrč kadeřavý (*Sparassis crispa*), kozák habrový (*Leccinum carpini*), liška obecná (*Cantharellus cibarius*).

#### 4.1.2 Ostatní materiál

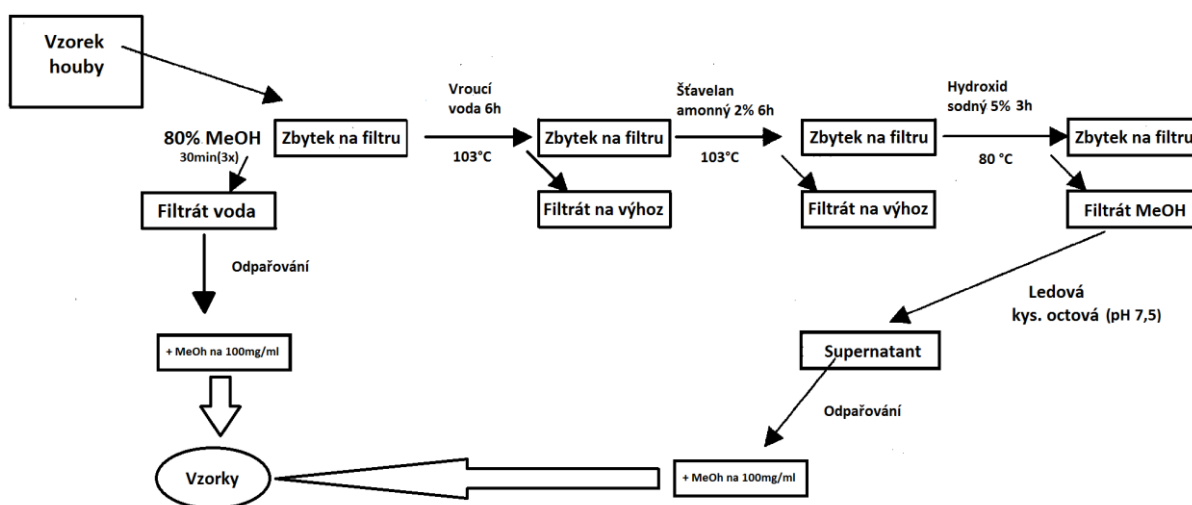
DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Folin-Ciocalteu činidlo, kyselina gallová, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Buněčná linie myších makrofágů RAW 264.7, RPMI 1640 medium, glukosa, fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, penicilín, streptomycin, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid), lipopolisacharid (LPS) *Escherichia coli* 0111:B4 vše zakoupené od Sigma-Aldrich (CZ), hydroxid sodný, šřavelan sodný, kyselina octová, metanol a dimethyl sulfoxid od Lach-Ner (CZ). Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan Assay kit K-YBGL (Megazyme, IE). 96-jamkové mikrotitrační destičky, kultivační láhve od Thermo-Scientific (UK)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Příprava vzorku hub

Metanolové a vodné extrakty ze směsi jedlých hub byly připraveny dle Wasser (2002). Čerstvé vzorky byly zamrazeny a následně lyofilizovány. Vzorky po lyofilizaci byly rozemlety pomocí laboratorního mlýnku na jemný prášek. Nejprve byl připraven metanolový vzorek, a to prostřednictvím extrakce 80% MeOH po dobu 30 minut. Extrakt byl odpařen na vakuové odparce Laborata 4000-efficient (Heidolph) a naředěn 80% MeOH na koncentraci 100 mg/ml. Filtrát, který vznikl během extrakce, byl vysušen a následně vařen při 103 °C společně s vodou po dobu 6 hodin. Dále byl vzorek přefiltrován a suchý filtrát byl vařen společně se šřavelanem sodným po dobu 6 hodin. Posléze byl vzorek filtrován a suchý filtrát byl vařen při 80 °C s hydroxidem sodným po dobu 3 hodin. Nakonec byly vzorky přefiltrovány. U vzniklého extraktu bylo pH srovnáno na 7.5 pomocí ledové kyseliny octové. Extrakt byl odpařen na vakuové odparce Laborata 4000-efficient (Heidolph) a naředěn 80% MeOH na koncentraci 100 mg/ml. Postup zachycuje Obr. 5.

**Obr. 5:** Postup přípravy vodných a metanolových vzorků (Wasser, 2002)



#### 4.2.2 *In vitro* antioxidační testy

##### 4.2.2.1. TPC

TPC byla měřena za použití modifikované metody, kterou dříve popsal (Sharma and Bhat, 2009). Byla použita 96-ti jamková destička, kde se odpipetovaných 100  $\mu$ l vzorku smísilo s 100  $\mu$ l redestilované  $H_2O$ . Po následném přidání 25  $\mu$ l čistého Folin-Ciocalteu činidla se barva změnila. Po promíslení destičky na orbitální třepačce při 40 otáčkách za minutu po dobu 10 minut se reakce zahájila přidáním 75  $\mu$ l 20%  $Na_2CO_3$ . Z důvodu fotosenzitivity se směs udržovala v temnu při teplotě 37  $^{\circ}C$  po dobu 1 hodiny. Absorbance byla měřena při 760 nm za použití TECAN M200 Infinite reader (Tecan, CH). Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE mg/g extraktu).

##### 4.2.2.2. DPPH

Test byl proveden dle (Sharma and Bhat, 2009). Vzorky hub se musely nejprve naředit na požadovanou koncentraci smísením vzorku s 80% metanolem v poměru 1:1 na koncentraci 50 mg/ml a následném druhém ředění 20  $\mu$ l vzorku a 980  $\mu$ l 80% metanolu. Vedle toho se připravil zásobní roztok troloxu v koncentraci 1 mg/ml 80% metanolu. Výchozí koncentrace troloxu pro testy byla poloviční, tj. 0,5 mg/ml. V 96-jamkové destičce se do všech řad vyjma první přidalo 100  $\mu$ l metanolu, do první se odpipetovalo 200  $\mu$ l vzorku houby. Z 1. řady se

odebralo 100  $\mu$ l a vložilo do řady druhé s postupným promícháním. Tak se pokračovalo až do předposlední 7. řady, z které se 100  $\mu$ l vylilo, a tak poslední 8. řada zůstala jako kontrola. Do všech jamek se doplnilo 75  $\mu$ l metanolu a 25  $\mu$ l čerstvě připraveného DPPH (4 mg DPPH/10 ml MeOH) na konečný objem 200  $\mu$ l. Směs byla udržována v temnu při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Absorbance byla měřena při 520 nm za použití TECAN M200 Infinite reader (Tecan, CH). Výsledky byly vyjádřeny jako Trolox ekvivalent ( $\mu$ g TE /mg extraktu).

#### 4.2.3 Stanovení obsahu $\beta$ -glukanů v jedlých houbách

Obsah celkových glukanů a  $\alpha$ -glukanů byl stanoven v extraktech hub pomocí Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan Assay kit K-YBGL (Megazyme). Enzymová sada obsahuje exo-1,3- $\beta$ -glukanázu,  $\beta$ -glukosidázu, amyloglukosidázu, invertasu, činidlo určující glukózu (GOPOD-glukózooxidáza, peroxidáza, 4-aminoantipyrin) a standardní roztok glukózy. Pro stanovení celkových glukanů se vzorek připravil tak, že se k 100 mg rozemletého vzorku houby přidalo 1,5 ml koncentrované HCL s následujícím promísením na vortexu. Dále se vzorky vložily do vodní lázně o teplotě 30°C na dobu 45 minut, přičemž se každých 15 minut vzorky promíchaly na vortexu. Po uplynutí doby se přidalo 10 ml destilované vody a znovu promíchalo na vortexu. S uvolněným víčkem se na 5 minut vzorky vložily do vroucí vodní lázně o teplotě 100 °C na 5 minut. Po uplynutí této doby se víčko utáhlo a nechalo inkubovat další 2 hodiny. Dále se zkumavka ochladila na pokojovou teplotu a přidalo se 10 ml 2M KOH. Obsah zkumavky se převedl do 100ml odměrné baňky a doplnil 200 mM pufrům octanu sodného s následnou vortexací. Vzorky se nakonec centrifugovaly při nejvyšších otáčkách po dobu 10 minut. Měření vzorků pro celkové glukany proběhlo tak, že z připraveného vzorku pro celkové glukany se odpipetovalo 0,1ml do zkumavky, dále se přidala směs exo-1,3- $\beta$ -glukanasy (20U/ml) a  $\beta$ -glukosidasy (4 U/ml) ve 200 mM pufru octanu sodného. Následovala inkubace trvající 60 minut při 40 °C. Po uplynutí této doby se přidaly 3 ml roztoku GOPOD a naposledy se za inkubovalo na dobu 20 minut a 40 °C. Absorbance se měřila při 510 nm oproti slepému vzorku glukosy za použití TECAN M200 Infinite reader.

Obsah  $\alpha$ -glukanů byl stanoven enzymatickou hydrolýzou amyloglukosidázy a invertázy. Pro měření  $\alpha$ -glukanů se navážilo po 100 mg, přidalo se 2 ml 2M KOH a směsi se nechali stát 20 minut v ledové vodní lázni. Následovalo přidání 8 ml 1,2 M pufru octanu sodného (pH 3,8) a 0,2 ml směsi amyloglukosidázy (1630 U/ml) s invertasou (500

U/ml). Po promíslení na vortexu se roztok vložil do teplé vodní lázně 40 °C na dobu 30 minut s občasným promícháním. Obsah se kvantitativně převedl do 100ml odměrné baňky a doplnil vodou. Následovala centrifugace při 1500g po dobu 10 minut. Obsah supernatantu se přenesl v množství 0,1 ml do 15 ml zkumavky za přidání 0,1 ml octanového pufru (200mM) a 3 ml roztoku GOPOD. Zkumavka byla inkubována při teplotě 40 °C 20 minut. Následně byl obsah napipetován v obsahu 200 µl do 96-jamkové destičky a měřena společně se slepým vzorkem při absorbanci 510 nM za použití TECAN M200 Infinite reader.

Obsah β-glukanů se vypočetl odečtením α-glukanů z celkového obsahu glukanů. Všechny složky glukanů byly vyjádřeny jako mg glukózy na 100 mg sušiny. Následně byly výsledky přepočteny na mg β-glukanů/g sušiny.

#### 4.2.4 *In vitro* stanovení protizánětlivé aktivity

##### 4.2.2.3. Kultivace makrofágů buněčné linie RAW 264.7

RAW264.7 byly pěstovány v RPMI 1640 mediu s 10% FBS, 1% roztoku penicilínu a streptomycinu, 1% neesenciálních aminokyselin, 2mmol glutaminu, 2% glukózy. Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm<sup>2</sup>) s 15 ml DMEM media, které byly vloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C, sklizeň buněk se prováděla každé dva dny bez využití tripsinu. Buňky byly uvolněny pomocí serologické stěrky a centrifugovány 10 minut při 700 × g. Staré medium bylo odstraněno a nahrazeno 5 ml nového media. A 1 ml této směsi byl přenesen k 9 ml nového media v kultivační nádobě pro další kultivaci.

##### 4.2.2.4. Inhibice Oxidu dusnatého

Buňky naředěné na koncentraci 1×10<sup>5</sup> byly napipetovány do 96-jamkové destičky v množství 100 µl. Destička byla vložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 2 hodiny. Po dvou hodinách byly přidány testované vzorky společně s LPS v celkovém obsahu 100 µl. Extrakty byly pipetovány v koncentracích 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µl/ml společně s 1 µg/ml LPS. Takto připravená mikrotitrační destička byla vložena do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 24 hodiny. Po 24 h došlo k odebrání 50 µl supernatantu, který byl v nové 96-jamkové destičce smíchán s 50 µl Griessova činidla.

Absorbance byla měřena při 540 nm. Obsah NO byl změřen pomocí kalibrační křivky dusitanu sodného.

#### 4.2.2.5. Test cytotoxicity (MTT)

Test toxicity probíhal po testu na inhibici NO. Z 96-jamkové destičky bylo odstraněno medium a přidáno nové medium s MTT (1 µg/ml) a vloženo do CO<sub>2</sub> inkubátoru na 2 hodiny. Následně bylo MTT odstraněno a nahrazeno 100 µl DMSO. Absorbance byla měřena při 550 nm a referenční hodně 720 nm. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno v porovnání s kontrolou bez testovaných látek.

### 4.3 Statistické vyhodnocení

Získané výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka, dále byly zjištěné hodnoty testovány metodou ANOVA s následujícím Bonferroniho testem na hladině významnosti  $p < 0,5$ . Statistické vyhodnocování bylo provedeno v Excelu a IBM SPSS.

## 5. Výsledky

### 5.1 Výsledky stanovení metodou TPC

Všechny měřené extrakty obsahovaly fenolové látky (tab. 2). Nejvíce fenolových sloučenin obsahoval metanolový vzorek *Calocybe cambosa* –  $11,63 \pm 0,33$  mg GAE/g extraktu, dále pak vzorek *Sparassis crispa*. U vodných roztoků byla nejvyšší hodnota naměřena u *Calocybe cambosa*  $6,94 \pm 0,69$  mg GAE/g extraktu, dále pak u *Sparassis crispa* a *Boletus luridus*.

**Tab. 2:** Antioxidační aktivita měřená metodou TPC vyjádřená v  $\mu\text{mol GAE/g}$  extraktu

Vzorek	TPC ( $\mu\text{mol GAE/g}$ extraktu)		TPC (mg GAE/g extraktu)	
	MeOH	H <sub>2</sub> O	MeOH	H <sub>2</sub> O
	průměr $\pm$	průměr $\pm$ SD	průměr $\pm$ SD	průměr $\pm$ SD
<i>Calocybe cambosa</i>	68,37 $\pm$	40,81 $\pm$ 4,07	11,63 $\pm$ 0,33	6,94 $\pm$ 0,69
<i>Sparassis crispa</i>	41,06 $\pm$	40,67 $\pm$ 3,53	6,96 $\pm$ 1,05	6,92 $\pm$ 0,60
<i>Boletus luridus</i>	39,21 $\pm$	40,51 $\pm$ 3,57	6,67 $\pm$ 0,68	6,89 $\pm$ 0,60
<i>Chalciporus p.</i>	38,66 $\pm$	36,44 $\pm$ 1,92	6,57 $\pm$ 0,36	6,19 $\pm$ 0,33
<i>Boletus luridiformis</i>	38,56 $\pm$	36,40 $\pm$ 1,07	6,56 $\pm$ 0,44	6,19 $\pm$ 0,18
<i>Boletus badius</i>	37,78 $\pm$	38,85 $\pm$ 2,59	6,43 $\pm$ 0,46	6,61 $\pm$ 0,44
<i>Cantharellus c.</i>	37,64 $\pm$	37,23 $\pm$ 4,29	6,40 $\pm$ 0,63	6,33 $\pm$ 0,73
<i>Lepiota procera</i>	37,48 $\pm$	38,68 $\pm$ 4,58	6,38 $\pm$ 0,23	6,58 $\pm$ 0,78
<i>Leccinum carpini</i>	36,64 $\pm$	37,85 $\pm$ 3,37	6,23 $\pm$ 0,28	6,44 $\pm$ 0,57

## 5.2 Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

U všech testovaných vzorků byla zjištěna minimální antioxidační aktivita. Z těchto vzorků byla antioxidační aktivita změřena pomocí metody DPPH, jež dosahovala nejvyšší hodnoty u metanolových vzorků. Mezi tyto vzorky patřil *Boletus luridiformis* a *Boletus luridus*  $31,22 \pm 0,05$  a  $24,56 \pm 2,31$   $\mu\text{g/ml}$  extraktu. U vodných roztoků u *Cantharellus cibarius* a *Leccinum carpini*  $4,88 \pm 0,27$  a  $4,02 \pm 0,01$   $\mu\text{g/ml}$  extraktu.

**Tab. 3:** Antioxidační aktivita měřená metodou DPPH vyjádřená v  $\mu\text{g/ml}$

Vzorek	DPPH (IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ))	
	MeOH	H <sub>2</sub> O
	Průměr $\pm$ SD	Průměr $\pm$ SD
<i>Boletus luridiformis</i>	$31,22 \pm 0,05$	$1,49 \pm 0,00$
<i>Boletus luridus</i>	$24,56 \pm 2,31$	$2,54 \pm 0,03$
<i>Lepiota procera</i>	$3,63 \pm 0,03$	$2,35 \pm 0,01$
<i>Boletus badius</i>	$3,47 \pm 0,89$	$1,61 \pm 0,00$
<i>Calocybe cambosa</i>	$3,36 \pm 0,47$	$1,73 \pm 0,01$
<i>Chalciporus piperatus</i>	$2,51 \pm 0,19$	$3,62 \pm 0,01$
<i>Cantharellus cibarius</i>	$2,22 \pm 0,13$	$4,88 \pm 0,27$
<i>Sparassis crispa</i>	$1,97 \pm 0,07$	$1,42 \pm 0,03$
<i>Leccinum carpini</i>	$1,48 \pm 0,02$	$4,02 \pm 0,01$



### 5.3 Výsledky stanovení obsahu $\beta$ -glukanů

V rámci testu byl stanoven jak celkový obsah glukanů v sušině testovaných hub, tak obsažené množství  $\alpha$ -glukanů a  $\beta$ -glukanů. Nejvyšší obsah glukanů byl zjištěn v sušině *Cantharellus cibarius* a bedly vysoké 439,4 a 404,7 mg/g sušiny. Frakce  $\alpha$ -glukanů byla nejvyšší u vzorků *Boletus luridus* a *Lepiota procera* 119,1 a 102,2 mg/g sušiny. Nejvíce  $\beta$ -glukanů bylo naměřeno u *Cantharellus cibarius* 429,7 mg/g sušiny, *Leccinum carpini* 369,7 mg/g sušiny, *Lepiota procera* 302,5 mg/g sušiny a *Sparassis crispa* 300,7 mg/g sušiny. U ostatních testovaných hub byl obsah  $\beta$ -glukanů menší než 300 mg/g sušiny.

**Tab. 4:** Obsah glukanů naměřený v jedlých houbách pomocí kitu

Vzorek	Obsah glukanů v jedlých houbách		
	Celkové glukany mg/g sušiny	$\alpha$ -glukany mg/g sušiny	$\beta$ -glukany mg/g sušiny
<i>Cantharellus cibarius</i>	439,4	9,7	429,7
<i>Leccinum carpini</i>	379,3	9,6	369,7
<i>Sparassis crispa</i>	344,3	13,6	330,7
<i>Lepiota procera</i>	404,7	102,2	302,5
<i>Boletus badius</i>	295,2	78,4	216,8
<i>Boletus luridus</i>	314,3	119,1	195,2
<i>Calocybe cambosa</i>	179,4	7,7	171,7
<i>Chalciporus piperatus</i>	245,2	100,4	144,7
<i>Boletus luridiformis</i>	223,4	100,1	123,3

#### 5.4 Výsledky stanovení produkce NO a cytotoxicity (MTT)

Ani u jednoho vzorku nebyla zjištěna cytotoxicita na buněčné linii myších makrofágu RAW 264.7. Všechny vzorky měly životaschopnost vyšší než 90 % oproti kontrole (tab. 5). Výsledky jsou vyjádřeny jak T – cytotoxické a životaschopnost < 90 %, a jako N – necytotoxické s životaschopností > 90 %.

Inhibice produkce NO byla statisticky potvrzena pouze v případě vodného extraktu hříbu hnědého a to o 36 %. Naopak některé vzorky prokázaly indukci produkce NO, kdy *Calocybe gambosa* zvyšovala produkci NO o 50 % u metanolových extraktu respektive o 94 % u vodných extraktu. A také *Sparassis crispa*, která zvýšila produkci NO o 20 %. Ostatní vzorky neprokázaly schopnost inhibovat produkci NO

**Tab. 5:** Protizánětlivá aktivita vyjádřená v % pomocí metody MTT

Vzorek	% produkce NO MTT		% produkce NO MTT	
	MeOH 500 µg/ml		H <sub>2</sub> O 500 µg/ml	
<i>Lepiota procera</i>	105	N	105	N
<i>Calocybe gambosa</i>	149*	N	194*	N
<i>Boletus badius</i>	98	N	64*	N
<i>Boletus lundiformis</i>	115	N	114	N
<i>Chalciporus piperatus</i>	100	N	95	N
<i>Sparassis crispa</i>	120*	N	99	N
<i>Leccinum carpini</i>	80	N	122	N
<i>Cantharellus cibarius</i>	96	N	82	N
<i>Lepiota procera</i>	105	N	105	N
LPS	100	N	100	N

T- toxické; N-netoxické; \* statistická významnost  $p < 0,5$ , oproti ošetřené kontrole LPS.

## 6. Diskuze

V moderní společnosti se podílí znečištěné životní prostředí a špatná životospráva na celé řadě chronických onemocnění, mezi které patří různá nádorová a autoimunitní onemocnění, osteoporóza, katarakt, ateroskleróza, poškození DNA, srdeční nedostatečnost a další, které se dávají do spojitosti s negativním účinkem VR, tzv. oxidačním stresem (Sies, 1985). Tyto vysoce reaktivní látky vznikající endogenně i exogenně, působí řetězové devastační reakce, jimž se tělo přirozeně brání nárazníkovým antioxidačním systémem (Niki, 2014). V důsledku zvýšenému působení exogenních vlivů vytvářející VR, mezi které řadíme pesticidy, sluneční záření a třeba chemické polutanty, jsou lidé vystavováni většímu oxidačnímu stresu, než bylo běžné v minulých stoletích a důsledkem toho se zvyšuje četnost onemocnění (Svačina et al., 2010, Kasper and Burghardt, 2015).

Současný výzkum je zaměřený na hledání řešení založeného na látkách přírodního původu, které by měly preventivní charakter, kdy by došlo k zabránění vzniku onemocnění. K tomuto účelu se výzkum zabývá antioxidanty, tj. látkami zabraňujícím řetězovým reakcím v důsledku působení VR. Mezi významné látky s antioxidačním působením patří kyselina askorbová, tokoferoly,  $\beta$ -karoteny, selen, flavonoidy a další (Ross, 2014). Hlavní zdroj antioxidantů v lidské potravě představuje především zelenina a ovoce dále, oříšky a houby (Kim et al., 2008, Han et al., 2011, Palacios et al., 2011, Vaz et al., 2011, Wan et al., 2014, Chowdhury et al., 2015, Henríquez-Sánchez et al., 2015, Tel et al., 2015). Minoritním zdrojem je maso, kde se vyskytují v množství 5–33× menším než ve výše zmíněných potravinách (Holeček, 2014, pers. comm.).

Epidemiologické studie zaměřené na konzumaci výše zmíněných potravin dokazují zastavující až reversibilní účinek na onemocnění spjaté s chronickým oxidačním stresem (Ferrari and Torres, 2003, Robertson, 2004). Antioxidanty jsou tedy žádaným tématem, které dokazují neustále narůstající vědecké práce na toto téma po celém světě i z důvodu toho, že se jedná o potraviny konzumované celodenně po celé planetě. Na základě mnoha výzkumů se vytváří a stále upřesňují výživová doporučení pro tyto látky (Tsao and Akhtar, 2005, Hermans et al., 2007). Zatímco vitamíny a stopové prvky jsou poměrně dobře prozkoumanou skupinou antioxidantů, stále panují nejasnosti kolem počtu rostlinných fenolových sloučenin, jejich metabolismu, působení, synergických a antagonistických vlastností (Sumbul et al., 2011).

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zjištění antioxidačních schopností 9 zástupců volně rostoucích jedlých hub v Českých lesích a z nich připravených vodných a metanolových extraktů. Problematikou obsahu hodnotných látek v houbách se v minulosti zabývalo velké množství prací po celém světě (Wasser and Weis, 1999, FU et al., 2002, Smith et al., 2002, Elmastas et al., 2007), neexistuje však dostatečné množství provedených studií na houbách volně rostoucích v lesích střední Evropy, jež jsou běžnou součástí našeho jídelníčku.

Výzkumem provedeným na výše zmíněných houbách se prokázala různě veliká antioxidační kapacita, kde obzvláště metanolové vzorky dosahovaly vyšší hodnoty antioxidační aktivity. Domníváme se, že to je pravděpodobně způsobeno větším množstvím vyextrahovaných látek s antioxidačním působením nepolárním rozpouštědlem, které umožňuje uvolnění lipofilních látek, jako jsou kupříkladu tokoferoly. Větší hodnoty byly naměřeny metodou TPC, a to u čirůvky májovky (*Calocybe gambosa*), kde dosahovala naměřené hodnoty  $11,63 \pm 0,33$  mg GAE/g extraktu. Hodnoty ostatních hub byly přibližně totožné a to i v porovnání s vodným extraktem. Kalogeropoulos et al. (2013) zkoumali obsah fenolových sloučenin několika volně rostoucích řeckých hub (*Lactarius deliciosus*, *Lactarius sanguifluus*, *Lactarius semisanguifluus*, *Russula delica* a *Suillus bellini*) metodou TPC, vyjádřenou jako mg GAE/ 100 g. Celkový obsah fenolových látek jimi prověřovaných hub se pohyboval v rozmezí od 6,0 do 20,8 mg GAE/100g (Kalogeropoulos et al., 2013). Naše vzorky hub vychází v rozmezí 6,23–11,63 mg GAE/g extraktu pro metanolové vzorky a 6,19–6,94 mg GAE/g extraktu pro vodné vzorky. Na základě porovnání obou výzkumů je tedy zřejmé, že vybrané divoce rostoucí houby ve střední Evropě mají větší obsah fenolových látek a s tím spjatý antioxidační potenciál než divoce rostoucí houby na řeckém ostrově Lesvos. Gan et al. (2013) při přípravě extraktů zvolili odlišný postup dle Yang et al., (2002). Jimi zkoumané vzorky rovněž dosahovaly větší aktivity použitím polárního rozpouštědla. Vzorky (*Agaricus bisporus* a *Agaricus brasiliensis*) nakoupili v čínském obchodě. Jimi naměřené hodnoty činily 1,75 a 5,36 mg GAE/g pro etanolové extrakty, 1,36 a 3,37 mg GAE/g pro vodné extrakty (Yang et al., 2002, Gan et al., 2013). V porovnání s výsledky od Kalogeropoulos et al., (2013) sice vykazují markantní rozdíl v obsahu fenolických sloučenin, ale naše údaje několikanásobně převyšují výsledky i těchto hub. Porovnání jsme provedli i s výsledky Rajasekaran and Kalaimagal (2011), zkoumající etanolový extrakt dřevokazné houby (*Ganoderma lucidum*). Tato houba obsahovala 42,41 mg GAE/g (Rajasekaran and Kalaimagal, 2011). Tato houba je konzumována obyvateli Asie spíše pro její medicínské, než nutriční hodnoty. Barros et al. (2007c) se zabývali obsahem celkových fenolických látek ve vzorcích portugalských hub (*Lactarius deliciosus*,

*Sarcodon imbricatus* a *Tricholoma portentosum*). Všechny vzorky obsahovaly fenoly, postupně bylo naměřeno 17,25 mg/g, 3,76 mg/g a 10,8 mg/g (Barros et al., 2007c). Vzorek houby *Lactarius deliciosus* (Ryzec pravý) vykazuje větší množství naměřených fenolových látek než náš vzorek Čirůvky májovky. Elmastas et al. (2007) zkoumali fenolové látky ve vzorcích 7 hub (*Russula delica* > *Boletus badius* > *Verpa conica* > *Polyporus squamosus* > *Agaricus bisporus* > *Pleurotus ostreatus* > *Lepista nuda*). Nejvyšší hodnotu naměřili u houby *Russula delica* 26 mg/g a nejmenší u *Lepista nuda* 7,7 mg/g (Elmastas et al., 2007). *Boletus badius* byla prověřována i námi a s výsledkem 6,42 mg/g sušiny nenacházíme konsenzus v množství TPC výzkumem provedeným Elmastas et al. (2007), jejichž hodnoty dosahovali 17,5 mg/g.

Studie Puttaraju et al. (2006) zkoumající obsah fenolových sloučenin u *Sparrasis crispa* a *Cantharellus cibarius* zjistila hodnoty 1,7 mg/g respektive 2,8 mg/g sušiny. V porovnání s našimi vzorky *Sparrasis crispa* 6,98 mg/g a *Cantharellus cibarius* 6,40 mg/g sušiny jsme došli k závěru, že rozdíl mohl ovlivnit způsob přípravy vzorku, analýza a místo výskytu. Obsah fenolových sloučenin je zřejmě závislý na druhu houby, místě výskytu, stáří a jejímu určení (medicína × konzum).

U metody DPPH byly nejvyšší hodnoty naměřené u metanolových extraktů *Boletus luridiformis* a *Boletus luridus*  $31,22 \pm 0,05$   $\mu\text{g/ml}$  a  $24,56 \pm 2,31$   $\mu\text{g/ml}$  extraktu. Ostatní hodnoty obou druhů extraktů byly markantně nižší. Ramesh and Pattar (2010) zkoumali metodou DPPH 6 metanolových vzorků hub (*Lycoperdon perlatum*, *Cantharellus cibarius*, *Clavaria vermiculris*, *Ramaria formosa*, *Marasmius oreades*, *Pleurotus pulmonarius*) na porovnání s butylhydroxyasinolem (BHA).  $\text{IC}_{50}$  se pohybovalo v rozmezí 0,94–7,57 mg/ml. Tento markantní rozdíl mezi naším a jejich výzkumem mohl vzniknout v důsledku použité odlišné extrakční metody provedené podle Barros et al. (2007c), která byla částečně modifikována. Jejich extrakty se nesetkaly s vyšší teplotou než 40 °C a nebyly skladovány déle než 1 týden (Barros et al., 2007c). Sadilova et al. (2007) a Patras et al. (2010) zjistili, že při tepelném zahřívání antokyanů ze skupiny flavonoidů se snižuje antioxidační kapacita. Naše vodné vzorky při přípravě supernatantu dosáhly několikrát hranice 100 °C po dobu několika hodin. Kujala et al. (2000) svým výzkumem zároveň potvrzují naši domněnku, že delším skladováním se snižuje antioxidační kapacita nejen numericky, ale dochází i ke změnám složení látek s antioxidačním působením (Kujala et al., 2000). Naše vzorky byly skladovány po dobu delší než 6 měsíců, tedy skladovací doba přesahuje délku výzkumu Kujali et al. (2000), která potvrdila vliv na množství antioxidantů. Minoritně se mohla na antioxidační kapacitě

podílet i výše pH. Friedman and Jürgens (2000) dokázali vliv hodnoty pH na antioxidační kapacitu. Porovnání proběhlo i s houbou *Ganoderma lucidum* zkoumané Rajasekaran and Kalaimagal (2011). Při použití etanolového roztoku bylo naměřeno  $IC_{50}$  172,52 g/ml. Hodnota ovšem nedává smysl a nejspíše došlo k tiskové chybě. Puttaraju et al. (2006) zkoumal  $IC_{50}$  na vzorcích 23 hub, s rozpětím 1,24–14,5 mg/ml metanolových extraktů (Puttaraju et al., 2006). Některé jimi prověřované houby byly i v našem výzkumu. Pro *Sparassis crispa* bylo námi naměřeno 1,97  $\mu$ g/ml extraktu a pro *Cantharellus cibarius* 2,22  $\mu$ g/ml extraktu. V porovnání se všemi výsledky se ty naše lišily o 2 řády, lze tedy prohlásit, že dlouhodobé skladování vzorků (ve tmě, v chladu) v řádech měsíců a v kombinaci různým druhem extrakce má negativní vliv na schopnosti zhašení volných radikálů.

Výzkum se zabýval i množstvím  $\beta$ -glukanů, na které prokazatelně byla nejbohatší liška obecná v množství 429,7 mg/g sušiny. Další významné množství nad 300 mg/g sušiny bylo naměřeno u vzorku kozáka habrového, kotrče kadeřavé a bedly vysoké. Manzi and Pizzoferrato (2000) ve své práci poukázali na velkou variabilitu jedlých hub v množství  $\beta$ -glukanů, pohybující se v koncentraci 210 až 530 mg/100 g sušiny. Manzi et al. (2001) zjistili, že skupina hub rodu *Boletus* obsahuje  $\beta$ -glukany v rozmezí 139–666 mg/100 g sušiny. Manzi and Pizzoferrato (2000) taky zkoumali celkové množství  $\beta$ -glukanů obsažené v houbách *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonarius* a *Lentinula edodes*. Nejvyšší hodnoty jimi naměřeny byly postupně 380, 380, 530 a 200 mg/100 g sušiny. Další výzkum byl proveden na vzorcích 6 hub (*Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes*, *Hypsizygus tessulatus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* a *Pleurotus eryngii*). Zjištěné hodnoty se pohybovali mezi 2,60–13,45 g  $\beta$ -glukanů/100 g sušiny (Nitschke et al., 2011). Klaus et al. (2013) zkoumali množství glukanů v dřevokazné houbě *Laetiporus sulphureus*, která nachází uplatnění v kuchyni. Naměřili u ní 17,3 g/100 g sušiny  $\alpha$ -glukanů a 66,8 g/100 g sušiny  $\beta$ -glukanů. V obou dvou zkoumaných prvcích tato houba převyšuje všechny námi prověřované. Jedná se o patogenní houbu rostoucí na kmenech živých listnatých stromů. Pouze mladé plodnice této houby jsou jedlé. Dle Lim et al. (2012) se ve vzorku z korejské oblasti nachází v houbě *Sparassis crispa* 240 mg  $\beta$ -glukanů v g sušiny. V porovnání s našim vzorkem jsme našli rozdíl 90 mg na gram sušiny ve prospěch našeho vzorku. Množství zjištěných  $\beta$ -glukanů může být ovlivněno několika způsoby. Extrakce  $\beta$ -glukanů je ovlivňována výší teploty, ale ne pH (Temelli, 1997), použitými enzymy k rozrušení buněčné membrány (Bamforth et al., 1979). Další podstatný vliv bude mít stáří houby a místo jejího výskytu, délka skladování při nízké teplotě by neměla jejich

množství ovlivňovat, ale už při pokojové teplotě se jejich obsah výrazně snižuje (Mizuno, 2000). České lesy se zdají být přejícím pro množství glukanů, obzvláště  $\beta$ -glukanů, a pro jejich příznivé účinky na náš imunitní systém lze jejich zahrnutí do jídelníčku doporučit.

Test toxicity byl u všech vzorků negativní. Tento výsledek byl předpokládaný, protože se jedná o jedlé houby, u nichž by byla cytotoxicita vlastností vysloveně nežádoucí. Tyto houby jsou široce považovány za zdraví nezávadné a jsou dlouhodobě konzumovány v celé střední Evropě. Navazující metoda byla zaměřena na anti-inflamatorní působení. Protizánětlivá aktivita vyjádřena v % byla zjištěna pouze u vodného extraktu hříbu hnědého a to o 36 %. Ostatní vzorky neprokázaly aktivitu, anebo naopak prokázaly indukční schopnost produkce NO v makrofázích. Bor et al. (2006) zkoumali produkci NO na buněčnou linii RAW 264.7 u vodních extraktů lilku vejcoplodého (*Solanum melongena*). Vzorek vykazoval vysokou inhibici nad 80 %. Wang and Mazza (2002) zkoumali účinnost samotných fenolových látek na produkci NO na makrofázích buněčné linii RAW 264.7. Dle jejich údajů, fenolové sloučeniny (quercetin, myricetin, daidzein, pelargonidin, cyanidin, delphinidin, peonidin, malvidin, 3-glukosid a malvidin 3,5-diglukosid) v rozmezí 16–500  $\mu$ M vykazují více jak 50% inhibici bez známek toxicity. Vysoké protizánětlivé působení v našem průzkumu by se dalo vysvětlit právě vyšším obsahem fenolových sloučenin ve vzorcích hub a velkým množstvím glukanů. Xu et al. (2012) už dříve zjistili ze vzorku houby *Lentinus edodes*, že  $\beta$ -glukany ovlivňují protizánětlivou aktivitu inhibicí NO. Park et al. (2005) prokázali na dřevokazné houbě *Inonotus obliquus* protizánětlivé působení na buněčnou linii RAW 264.7 *in vitro* a *in vivo*. Námi zkoumané houby lze tedy doporučit jako hodnotné a zdraví přínosné.

## 7. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsání a zhodnocení *in vitro* antioxidačního působení volně rostoucích jedlých hub lesů střední Evropy a zjištění množství glukanů v nich obsažených. Dále *in cellulo* protizánětlivé působení na buněčnou linii RAW264.7 myších makrofágů. Metody použité na zjištění antioxidační aktivity byly DPPH a TPC. Dále byl zjišťován obsah glukanů v sušině vzorků. Produkce NO a cytotoxicita testovaných vzorků byla měřena na buněčné linii RAW264.7.

Obsah fenolových sloučenin nad 10 mg GAE/g extraktu byla metodou TPC naměřena pouze u metanolového vzorku houby čirůvky májovky 11,63 mg GAE/g extraktu. Metodou DPPH vykazovaly antioxidační aktivitu nad 20  $\mu\text{g/ml}$  pouze metanolové vzorky hříbu kováře a hříbu koloděje. To lze připsat obsahu antioxidačním vlastnostem vitamínů, minerálů a flavonoidů. Je otázkou, proč metoda DPPH vykazovala o 2 řády menší množství  $\text{IC}_{50}$  aktivity, přestože celkové množství fenolických látek zůstává „stejně“ oproti jiným studiím. Je možné, že dlouhodobé skladování a další vlivy snížily antioxidační kapacitu a že za antioxidační kapacitu nejsou zodpovědné pouze fenolové látky.

Významné množství glukanů nad 400 mg/g sušiny byly naměřeny u lišky obecné a bedly vysoké, nad 300 mg/g sušiny se dostaly další 3 vzorky (kozák habrový, kotrč kadeřavá a hřib koloděj). Skladování v chladu neovlivňuje množství glukanů. Schopnost inhibovat produkci NO na makrofázích buněčné linie RAW 264.7 prokázal pouze vodný extrakt hříbu hnědého a to o 36 % naopak čirůvka májovka v obou extraktů zvyšovala produkci NO a to o více jak 50 %.

Výsledky výzkumu provedeném *in vitro* poukazují na zdravotní přínosy spjaté s případnou konzumací hub, a to jak pro snižování oxidačního stresu v důsledku zhašení volných radikálů fenolickými látkami s antioxidačním působením, tak pro stimulaci imunitního systému způsobené vyšším obsahem glukanů. Houby ovlivňují různým způsobem produkci NO, přičemž mechanismus působení je nad rámec této bakalářské práce. Pravděpodobně by tato vlastnost mohla být v budoucnosti využita ve farmaceutickém průmyslu pro výrobu léčiv. Tyto houby pro obsah živin a funkčních látek lze doporučit ke konzumaci.



## 8. Použitá literatúra

- Agrahar-Murugkar, D., Subbulakshmi, G. 2005. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*. 89(4). 599-603.
- Akaike, T., Horie, H., Noguchi, Y., Fujii, S., Beppu, T., Ogawa, M., Maeda, H. 1996. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. *Cancer*. 77(8). 1598-1604.
- Akramiene, D., Kondrotas, A., Didziapetriene, J., Kevelaitis, E. 2006. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. 43(8). 597-606.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, M. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21(2). 143-152.
- Anson, N. M., Selinheimo, E., Aura, A. M., Havenaar, R., Bast, A., Haenen, G. 2010. Anti-inflammatory effect of breads in relation to the bioavailability of phenolic compounds. *Proceedings of the Nutrition Society*. 69(OCE3). E231.
- Balch, J., Balch, P. 1997. Prescription for Nutritional Healing. A practical AZ reference to Drug Free Remedies using vitamins, minerals, herbs, and food supplements. In): Avery Publishing Group, Garden City Park, New York. 566 s. ISBN: 978-1583334003
- Bamforth, C. W., Martin, H. L., Wainwright, T. 1979. A role for carboxypeptidase in the solubilization of barley  $\beta$ -glucan. *Journal of the Institute of Brewing*. 85(6). 334-338.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Sá Morais, J., Ferreira, I. C. F. R. 2007. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(12). 4781-4788.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. F. R. 2007. Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55(21). 8766-8771.
- Barros, L., Calhella, R. C., Vaz, J. A., Ferreira, I. C., Baptista, P., Estevinho, L. M. 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology*. 225(2). 151-156.

- Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I. C. F. R. 2008a. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food chemistry*. 111(1). 61-66.
- Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I. C. F. R. 2008b. Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food chemistry*. 111(1). 61-66.
- Baxmann, A. C., Mendonça, C. D. O. G., & Heilberg, I. P. 2003. Effect of vitamin C supplements on urinary oxalate and pH in calcium stone-forming patients. *Kidney international*. 63(3). 1066-1071.
- Beckman, K. B., Ames, B. N. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*. 78(2). 547-581.
- Beckwith, A. L. J., Ingold, K. U. 2013. Free-radical rearrangements. *Rearrangements in ground and excited states*. 1. 161-310.
- Bendich, A., Machlin, L. J., Scandurra, O., Burton, G. W., Wayner, D. D. M. 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*. 2(2). 419-444.
- Bernaś, E., Jaworska, G., Lisiewska, Z. 2006. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 5(1). 5-20.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, C. 2014. Antioxidant supplements and mortality. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 17(1). 40-44.
- Bohn, J. A., BeMiller, J. N. 1995. (1→3)- $\beta$ -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate polymers*. 28(1). 3-14.
- Bor, J. Y., Chen, H. Y., Yen, G. C. 2006. Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54. 1680-1686
- Borchers, A. T., Keen, C. L., Gershwin, M. E. 2004. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Experimental Biology and Medicine*. 229(5). 393-406.
- Bovi, M., Cenci, L., Perduca, M., Capaldi, S., Carrizo, M. E., Civiero, L., Chiarelli, L. R., Galliano, M., Monaco, H. L. 2013. BEL  $\beta$ -trefoil: A novel lectin with antineoplastic properties in king bolete (*Boletus edulis*) mushrooms. *Glycobiology*. 23(5). 578-592.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 28(1). 25-30.
- Brown, G. D., Gordon, S. 2001. Immune recognition: a new receptor for  $\beta$ -glucans. *Nature*. 413(6851). 36-37.
- Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 14(3). 303-311.
- Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Smiderle, F. R., Rosado, F. R., Sasaki, G. L., Gorin, P. A., Iacomini, M. 2006. A  $\beta$ -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers*. 66(2). 252-257.
- Carpenter, K., Breslin, W., Davidson, T., Adams, A., McFarlin, B. 2013. Baker's yeast  $\beta$ -glucan supplementation increases monocytes and cytokines post-exercise: implications for infection risk? *British Journal of Nutrition*. 109(03). 478-486.
- Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., Ozer, N. K. 2012. Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in pharmacology*. 3.
- Catoni, C., Peters, A., Schaefer, H. M. 2008. Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Animal Behaviour*. 76(4). 1107-1119.
- Chen, Z., Bertin, R., Frolidi, G. 2013. EC 50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food chemistry*. 138(1). 414-420.
- Cheung, L., Cheung, P. C., Ooi, V. E. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*. 81(2). 249-255.
- Chowdhury, M. M., Kubra, K., Ahmed, S. R. 2015. Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*(1). 8.
- Christakos, S., Ajibade, D. V., Dhawan, P., Fechner, A. J., Mady, L. J. 2012. Vitamin D: metabolism. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 38(1). 1-11.
- Criqui, M. H., Ringel, B. L. 1994. Does diet or alcohol explain the French paradox? *The Lancet*. 344(8939). 1719-1723.

- Cugnet-Anceau, C., Nazare, J. A., Biorklund, M., Le Coquil, E., Sassolas, A., Sothier, M., Holm, J., Landin-Olsson, M., Önning, G., Laville, M. 2010. A controlled study of consumption of  $\beta$ -glucan-enriched soups for 2 months by type 2 diabetic free-living subjects. *British journal of nutrition*. 103(03). 422-428.
- Curhan, G. C., Willett, W. C., Rimm, E. B., Stampfer, M. J. 1996. A prospective study of the intake of vitamins C and B6, and the risk of kidney stones in men. *The Journal of urology*. 155(6). 1847-1851.
- Curhan, G. C., Willett, W. C., Speizer, F. E., Stampfer, M. J. 1999. Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *Journal of the american society of nephrology*. 10(4). 840-845.
- Davies, S., Underwood, S., Wickens, D., Feneck, R., Dormandy, T., Walesby, R. 1990. Systemic pattern of free radical generation during coronary bypass surgery. *British heart journal*. 64(4). 236-240.
- Decker, A. 1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*. 55(11). 396-398.
- Deng, J., Cheng, W., Yang, G. 2011. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*. 125(4). 1430-1435.
- Domenico, R. 2004. Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Current pharmaceutical design*. 10(14). 1667-1676.
- Douglas, R. M., Hemilä, H. 2005. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *PLoS medicine*. 2(6). e168.
- Du, B., Lin, C., Bian, Z., Xu, B. 2015. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends in Food Science & Technology*. 41(1). 49-59.
- Du, J., Cullen, J. J., Buettner, G. R. 2012. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 1826(2). 443-457.
- Duell, E. J., Lujan-Barroso, L., Llivina, C., Muñoz, X., Jenab, M., Boutron-Ruault, M. C., Clavel-Chapelon, F., Racine, A., Boeing, H., Buijsse, B. 2013. Vitamin C transporter gene (SLC23A1 and SLC23A2) polymorphisms, plasma vitamin C levels, and gastric cancer risk in the EPIC cohort. *Genes & nutrition*. 8(6). 549-560.

- Elmastas, M., Isildak, O., Turkekul, I., Temur, N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20(3). 337-345.
- Epstein, F. H., Barnes, P. J., Karin, M. 1997. Nuclear factor- $\kappa$ B—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine*. 336(15). 1066-1071.
- Epstein, F. H., Ross, R. 1999. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine*. 340(2). 115-126.
- Falandysz, J., Borovička, J. 2013. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. *Applied microbiology and biotechnology*. 97(2). 477-501.
- Fang, Y., Z., Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 18(10). 872-879.
- Feeney, M. J., Dwyer, J., Hasler-Lewis, C. M., Milner, J. A., Noakes, M., Rowe, S., Wach, M., Beelman, R. B., Caldwell, J., Cantorna, M. T. 2014. Mushrooms and health summit proceedings. *The Journal of nutrition*. 144(7). 1128S-1136S.
- Ferrari, C. K. B., Torres, E. 2003. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57(5). 251-260.
- Ferrières, J. 2004. The French paradox: lessons for other countries. *Heart*. 90(1). 107-111.
- Fidler, M., Kolářová, L. 2009. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chem. Listy*. 103. 232-235.
- Filip, G. 1998. *Edible Wild Mushrooms*.
- Friedman, M., Jürgens, H. S. 2000. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(6). 2101-2110.
- Fu, H. Y., Shieh, D. E., Ho, C. T. 2002. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of food lipids*. 9(1). 35-43.
- Förstermann, U. 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 459(6). 923-939.
- Förstermann, U., Sessa, W. C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 33(7). 829-837.

- Gan, C. H., Nurul Amira, B., Asmah, R. 2013. Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporous* and *Agaricus brasiliensis*). International Food Research Journal. 20(3). 1095-1102.
- Gladyshev, V. N. 2014. The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! Antioxidants & redox signaling. 20(4). 727-731.
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., Rostagno, M. A., Villares, A., Martínez, J. A. 2010. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. Fitoterapia. 81(7). 715-723.
- Gülçin, İ. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of Toxicology. 86(3). 345-391.
- Güçlü, K., Altun, M., Özyürek, M., Karademir, S. E., Apak, R. 2006. Antioxidant capacity of fresh, sun-and sulphited-dried Malatya apricot (*Prunus armeniaca*) assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and folin methods. International journal of food science & technology. 41(s1). 76-85.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical journal. 219(1). 1.
- Han, X. Q., Wu, X. M., Chai, X. Y., Chen, D., Dai, H., Dong, H. L., Ma, Z. Z., Gao, X. M., Tu, P. F. 2011. Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. Food Research International. 44(1). 489-493.
- Harman, D. 1992. Free radical theory of aging. Mutation Research/DNAging. 275(3). 257-266.
- Harman, D. 2006. Free radical theory of aging: an update. Annals of the New York Academy of Sciences. 1067(1). 10-21.
- Hatfield, D. L., Berry, M. J., Gladyshev, V. N. 2011. Selenium: its molecular biology and role in human health: Springer Science & Business Media.
- Havlik, J., de la Huebra, R. G., Hejtmankova, K., Fernandez, J., Simonova, J., Melich, M., Rada, V. 2010. Xanthine oxidase inhibitory properties of Czech medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 132(2). 461-465.
- He, L., Zhang, X., Xu, H., Xu, C., Yuan, F., Knez, Ž., Novak, Z., Gao, Y. 2012. Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) seed

- residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS+ assay. *Food and bioproducts processing*. 90(2). 215-223.
- Hemilä, H. 1994. Does vitamin C alleviate the symptoms of the common cold? A review of current evidence. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 26(1). 1-6.
- Henríquez-Sánchez, P., Sánchez-Villegas, A., Ruano-Rodríguez, C., Gea, A., Lamuela-Raventós, R., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Covas, M., Corella, D., Schröder, H. 2015. Dietary total antioxidant capacity and mortality in the PREDIMED study. *European journal of nutrition*. 1-10.
- Hermans, N., Cos, P., Maes, L., De Bruyne, T., Vanden Berghe, D., J Vlietinck, A., Pieters, L. 2007. Challenges and pitfalls in antioxidant research. *Current medicinal chemistry*. 14(4). 417-430.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands.
- Heunks, L. M., Dekhuijzen, P. R. 2000. Respiratory muscle function and free radicals: from cell to COPD. *Thorax*. 55(8). 704-716.
- Hevel, J. M., Marletta, M. A. 1994. [25] Nitric-oxide synthase assays. *Methods in enzymology*. 233. 250-258.
- Hobbs, C. 2003. *Medicinal mushrooms*: Book Publishing Company.
- Holeček, V. 2006. Volné radikály, antioxidanty a jak dále. *Klinická biochemie a metabolismus*. 14. 140-145.
- Holeček, V. 2010. Oxidační stres u nádorových onemocnění. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2010-2014.
- Holeček, V. 9. září 2014, pers. comm.
- Hutchinson, J., Lentjes, M. A. H., Greenwood, D. C., Burley, V. J., Cade, J. E., Cleghorn, C. L., Threapleton, D. E., Key, T. J., Cairns, B. J., Keogh, R. H. 2012. Vitamin C intake from diary recordings and risk of breast cancer in the UK Dietary Cohort Consortium. *European journal of clinical nutrition*. 66(5). 561-568.
- Immerstrand, T., Andersson, K. E., Wange, C., Rascon, A., Hellstrand, P., Nyman, M., Cui, S. W., Bergenståhl, B., Trägårdh, C., Öste, R. 2010. Effects of oat bran, processed to different

- molecular weights of  $\beta$ -glucan, on plasma lipids and caecal formation of SCFA in mice. *British journal of nutrition*. 104(03). 364-373.
- Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y. 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*. 30(4). 433-446.
- Joseph, S. V., Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B. M. 2015. Fruit polyphenols: a review of anti-inflammatory effects in humans. *Critical reviews in food science and nutrition* (just-accepted). 00-00.
- Kalač, P. 2010. Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: a review for the period 2000–2009. *Food Chemistry*. 122(1). 2-15.
- Kalač, P., Svoboda, L. 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 69(3). 273-281.
- Kalogeropoulos, N., Yanni, A. E., Koutrotsios, G., Aloupi, M. 2013. Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. *Food and Chemical Toxicology*. 55. 378-385.
- Kasper, H., Burghardt, W. 2015. *Výživa v medicíně a dietetika* (11. ed.). Grada. Praha. 592 s. ISBN: 978-8024745336
- Kaur, C., Kapoor, H. C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International journal of food science & technology*. 36(7). 703-725.
- Kim, M. Y., Seguin, P., Ahn, J. K., Kim, J. J., Chun, S. C., Kim, E. H., Seo, S. H., Kang, E. Y., Kim, S. L., Park, Y. J. 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(16). 7265-7270.
- Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Stefanoska, I., Van Griensven, L. J. L. D. 2013. The edible mushroom *Laetiporus sulphureus* as potential source of natural antioxidants. *International journal of food sciences and nutrition*. 64(5). 599-610.
- Knight, J. A. 1998. Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 28(6). 331-346.
- Kochhar, S. P., Rossell, J. B. 1990. Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems. In *food antioxidants*. (pp. 19-64): Springer.



- Kopp, P. 1998. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *European Journal of Endocrinology*. 138(6). 619-620.
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S., Cosic, V. 2001. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of clinical pathology*. 54(5). 356-361.
- Kröncke, K. D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V. 1997. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection—how, why, when, and where? *Nitric oxide*. 1(2). 107-120.
- Kujala, T. S., Loponen, J. M., Klika, K. D., Pihlaja, K. 2000. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) Root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48(11). 5338-5342.
- Lavi, I., Friesem, D., Geresh, S., Hadar, Y., Schwartz, B. 2006. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and proapoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*. 244(1). 61-70.
- Leal, A. R., Barros, L., Barreira, J. C. M., Sousa, M. J., Martins, A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. 2013. Portuguese wild mushrooms at the “pharma–nutrition” interface: Nutritional characterization and antioxidant properties. *Food Research International*. 50(1). 1-9.
- Lehmann, B., Meurer, M. 2010. Vitamin D metabolism. *Dermatologic therapy*. 23(1). 2-12.
- Leonard, M., Lawton, K., Watson, I., MacFarlane, I. 1995. Free radical activity in young adult cigarette smokers. *Journal of clinical pathology*. 48(4). 385-387.
- Li, H., Horke, S., Förstermann, U. 2014. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 237(1). 208-219.
- Lim, C. W., Kang, K. K., Yoo, Y. B., Kim, B. H., Bae, S. H. 2012. Dietary fiber and  $\beta$ -glucan contents of *Sparassis crispa* fruit fermented with *Lactobacillus brevis* and *Monascus pilosus*. *Journal of the Korean society of food science and nutrition*(41).
- Lima, A. D. L., Costa Fortes, R., Carvalho Garbi Novaes, M. R., Percário, S. 2012. Poisonous mushrooms: a review of the most common intoxications. *Nutr Hosp*. 27(2). 402-408.
- Liochev, S. I. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 60. 1-4.

- Liu, J. K., Hu, L., Dong, Z. J., Hu, Q. 2004. DPPH radical scavenging activity of ten natural p-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China. *Chemistry & biodiversity*. 1(4). 601-605.
- MacLean, I., Lowdell, M., Blake, D., Lunec, J., Archer, J. 1992. Absence of a specific effect of free radicals on HLA-B27. *Annals of the rheumatic diseases*. 51(8). 963-964.
- Maeno, T., Tano, R., Takenaka, H., Mano, T. 2009. Edaravone (MCI-186) is effective as a free radical scavenger following arteriovenous sheathotomy for treatment of macular oedema associated with branch retinal vein occlusion. *British Journal of Ophthalmology*. 93(11). 1479-1482.
- Magenta, A., Greco, S., Capogrossi, M. C., Gaetano, C., Martelli, F. 2014. Nitric oxide, oxidative stress, and interplay in diabetic endothelial dysfunction. *BioMed research international*. 2014.
- Makropoulou, M., Aligiannis, N., Gonou-Zagou, Z., Pratsinis, H., Skaltsounis, A. L., Fokialakis, N. 2012. Antioxidant and cytotoxic activity of the wild edible mushroom *Gomphus clavatus*. *Journal of medicinal food*. 15(2). 216-221.
- Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology*. 16(1). 77-84.
- Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food chemistry*. 73(3). 321-325.
- Manzi, P., Pizzoferrato, L. 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 68(3). 315-318.
- Marcocci, L., Maguire, J. J., Droylefaix, M. T., Packer, L. 1994. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochemical and biophysical research communications*. 201(2). 748-755.
- Mikirova, N., Casciari, J., Rogers, A., Taylor, P. 2012. Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. *J Transl Med*. 10(189). 189.
- Mizuno, M. 2000. Anti-tumor polysaccharides from mushrooms during storage. *Biofactors*. 12(1). 275-281.
- Napoli, C., Ignarro, L. J. 2001. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric oxide*. 5(2). 88-97.

- Nathan, C., Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 78(6). 915-918.
- Neubauer, O., Reichhold, S., Nics, L., Hoelzl, C., Valentini, J., Stadlmayr, B., Knasmüller, S., Wagner, K. H. 2010. Antioxidant responses to an acute ultra-endurance exercise: impact on DNA stability and indications for an increased need for nutritive antioxidants in the early recovery phase. *British journal of nutrition*. 104(08). 1129-1138.
- Niki, E. 2014. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Free Radical Biology and Medicine*. 66. 3-12.
- Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., Von Rekowski, R. W., Altenbach, H. J., Mölleken, H. 2011. A new colorimetric method to quantify  $\beta$ -1, 3-1, 6-glucans in comparison with total  $\beta$ -1, 3-glucans in edible mushrooms. *Food chemistry*. 127(2). 791-796.
- Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A., Fukushima, S. 1983. Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 31(11). 3984.
- Nyberg, M., Jensen, L. G., Thaning, P., Hellsten, Y., Mortensen, S. P. 2012. Role of nitric oxide and prostanoids in the regulation of leg blood flow and blood pressure in humans with essential hypertension: effect of high-intensity aerobic training. *The Journal of physiology*. 590(6). 1481-1494.
- Opitz, S. E. W., Smrke, S., Goodman, B. A., Keller, M., Schenker, S., Yeretjian, C. 2014. Antioxidant generation during coffee roasting: A comparison and interpretation from three complementary assays. *Foods*. 3(4). 586-604.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(11). 3122-3128.
- Pacifici, R. E., Davies, K. J. A. 1991. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*. 37(1-3). 166-180.
- Packer, J. E., Slater, T., Willson, R. L. 1979. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C.

- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*. 22(1). 18-35.
- Padilha, M. M., Avila, A. A. L., Sousa, P. J. C., Cardoso, L. G. V., Perazzo, F. F., Carvalho, J. C. T. 2009. Anti-inflammatory activity of aqueous and alkaline extracts from mushrooms (*Agaricus blazei Murill*). *Journal of medicinal food*. 12(2). 359-364.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'arrigo, M., Rostagno, M., Martínez, J., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. 2011. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 128(3). 674-678.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.
- Papežová, H. 2010. Spektrum poruch příjmu potravy: Interdisciplinární přístup: Grada Publishing as. Praha. 432 s. IBAN: 978-8024724256
- Park, Y. M., Won, J. H., Kim, Y. H., Choi, J. W., Park, H. J., Lee, K. T. 2005. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *Journal of ethnopharmacology*. 101(1). 120-128.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., Tiwari, B. K. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*. 21(1). 3-11.
- Paulová, H., Bochořáková, H. 2004. Metody stanovené antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chem. Listy*. 98. 174-179.
- Peponis, V., Papathanasiou, M., Kapranou, A., Magkou, C., Tyligada, A., Melidonis, A., Drosos, T., Sitaras, N. 2002. Protective role of oral antioxidant supplementation in ocular surface of diabetic patients. *British journal of ophthalmology*. 86(12). 1369-1373.
- Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S., Sautebin, L. 2006. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric oxide*. 15(1). 30-39.
- Pergola, C., Rossi, A., Dugo, P., Cuzzocrea, S., Sautebin, L. 2006. Inhibition of nitric oxide biosynthesis by anthocyanin fraction of blackberry extract. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. 15(1). 30-39.

- Petteys, B. J., Frank, E. L. 2011. Rapid determination of vitamin B 2 (riboflavin) in plasma by HPLC. *Clinica Chimica Acta*. 412(1). 38-43.
- Pietta, P. G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*. 63(7). 1035-1042.
- Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., Lichtenberg, D. 2012. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and physics of lipids*. 165(6). 638-647.
- Pláteník, J. 2009. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi*. 30-33.
- Prior, R. L., Cao, G. 1999. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*. 27(11). 1173-1181.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(11). 3273-3279.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53(10). 4290-4302.
- Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., Somasundaram, R. 2006. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*. 54(26). 9764-9772.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K. M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied mikrobiology*. 90(4). 494-507.
- Rajasekaran, M., Kalaimagal, C. 2011. In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of a medicinal mushroom, *Ganoderma Lucidum*. *Journal of Pharmaceutical Sciences Research*. 3. 1427-1433.
- Ramel, A., Wagner, K., Elmadfa, I. 2004. Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men. *British journal of sports medicine*. 38(5). e22-e22.
- Ramesh, C., Pattar, M. G. 2010. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy research*. 2(2). 107.

- Reblova, Z. 2012. Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech J Food Sci.* 30(2). 171-177.
- Rivlin, R. S., Pinto, J. T. 2001. Riboflavin (vitamin B2). *Handbook of vitamins.* 3rd ed. New York: Marcel Dekker. 255-273.
- Robertson, R. P. 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *Journal of Biological Chemistry.* 279(41). 42351-42354.
- Romieu, I., Sienna-Monge, J., Ramirez-Aguilar, M., Moreno-Macias, H., Reyes-Ruiz, N., del Rio-Navarro, B. E., Hernandez-Avila, M., London, S. 2004. Genetic polymorphism of GSTM1 and antioxidant supplementation influence lung function in relation to ozone exposure in asthmatic children in Mexico City. *Thorax.* 59(1). 8-10.
- Ross, A. C. 2014. *Modern Nutrition in Health and Disease.* Williams & Wilkins. Philadelphia. 1616 s. ISBN: 1605474614
- Rozin, P., Kabnick, K., Pete, E., Fischler, C., Shields, C. 2003. The ecology of eating smaller portion sizes in France than in the United States help explain the French paradox. *Psychological science.* 14(5). 450-454.
- Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., Iacomini, M. 2015. D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate polymers.* 117. 753-761.
- Ryan, G. B., Majno, G. 1977. Acute inflammation. A review. *The american journal of pathology.* 86(1). 183.
- Réblová, Z. 2011. Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů. *Chem. Listy.* 105. 667-673.
- Sachan, S. K. S., Patra, J. K., Thatoi, H. N. 2013. Indigenous knowledge of ethnic tribes for utilization of wild mushrooms as food and medicine in similipal biosphere reserve, Odisha, India. *Journal of Agricultural Technology.* 9(2). 403-416.
- Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F. C. 2007. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular nutrition & food research.* 51(12). 1461-1471.
- Schwarz, K., Foltz, C. M. 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society.* 79(12). 3292-3293.

- Serafini, M., Bugianesi, R., Salucci, M., Azzini, E., Raguzzini, A., Maiani, G. 2002. Effect of acute ingestion of fresh and stored lettuce (*Lactuca sativa*) on plasma total antioxidant capacity and antioxidant levels in human subjects. *British Journal of Nutrition*. 88(06). 615-623.
- Serafini, M., Peluso, I., Raguzzini, A. 2010. Session 1: Antioxidants and the immune system flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc*. 69. 273-278.
- Severoglu, Z., Sumer, S., Yalcin, B., Leblebici, Z., Aksoy, A. 2013. Trace metal levels in edible wild fungi. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 10(2). 295-304.
- Shacter, E., Weitzman, S. A. 2002. Chronic inflammation and cancer. *Oncology*. 16(2). 217-232.
- Sharma, O. P., Bhat, T. K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113(4). 1202-1205.
- Sies, H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H. ed. *Oxidative stress*. London. Academic press 1-8.
- Siesjö, B. K., Agardh, C. D., Bengtsson, F. 1988. Free radicals and brain damage. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*. 1(3). 165-211.
- Slater, T. F. 1988. Free radical mechanisms in tissue injury. In *Cell Function and Disease*. (pp. 209-218): Springer.
- Smith, J. E., Rowan, N. J., Sullivan, R. 2002. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology letters*. 24(22). 1839-1845.
- Spencer, J. P., Abd El Mohsen, M. M., Minihane, A. M., Mathers, J. C. 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*. 99(01). 12-22.
- Stanner, S., Hughes, J., Kelly, C., Buttriss, J. 2004. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. *Public health nutrition*. 7(03). 407-422.
- Steinmetz, K. A., Potter, J. D. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*. 96(10). 1027-1039.

- Stihi, C., Radulescu, C., Busuioc, G., Popescu, I. V., Gheboianu, A., Ene, A. 2011. Studies on accumulation of heavy metals from substrate to edible wild mushrooms. *Rom J Phys.* 56(1-2). 257-264.
- Sugiyama, M. 1992. Role of physiological antioxidants in chromium (VI)-induced cellular injury. *Free Radical Biology and Medicine.* 12(5). 397-407.
- Sumbul, S., Ahmad, M. A., Mohd, A., Mohd, A. 2011. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences.* 3(3). 361.
- Sun, Y. 1990. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine.* 8(6). 583-599.
- Svačina, Š. et. al. 2010. *Poruchy metabolismu a výživy.* 1. vyd. Galén. Praha. 2010. 505 s. ISBN: 978-8072626762.
- Svačina, Š. 8. září 2014, pers. comm.
- Svačina, Š., Owen, K. 2003. *Syndrom inzulínové rezistence: Triton.* Praha. 182 s. ISBN: 8072543539
- Svirbely, J. L., Szent-Györgyi, A. 1933. The chemical nature of vitamin C. *Biochemical Journal.* 27(1). 279.
- Svoboda, L., Zimmermannová, K., Kalač, P. 2000. Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter. *Science of the Total Environment.* 246(1). 61-67.
- Sweeney, T., Collins, C., Reilly, P., Pierce, K., Ryan, M., O'Doherty, J. 2012. Effect of purified  $\beta$ -glucans derived from *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* and *Saccharomyces cerevisiae* on piglet performance, selected bacterial populations, volatile fatty acids and pro-inflammatory cytokines in the gastrointestinal tract of pigs. *British Journal of Nutrition.* 108(07). 1226-1234.
- Sánchez de Medina, F., Zarzuelo, A. 2008. Polyphenols and immunity. *Proceedings of the Nutrition Society.* 67(OCE1). E1.
- Tel, G., Ozturk, M., Duru, M. E., Turkoglu, A. 2015. Antioxidant and anticholinesterase activities of five wild mushroom species with total bioactive contents. *Pharmaceutical Biology(0).* 1-7.



- Temelli, F. 1997. Extraction and functional properties of barley  $\beta$ -Glucan as affected by temperature and pH. *Journal of food science*. 62(6). 1194-1201.
- Thomas, L. D. K., Elinder, C. G., Tiselius, H. G., Wolk, A., Åkesson, A. 2013. Ascorbic acid supplements and kidney stone incidence among men: a prospective study. *JAMA internal medicine*. 173(5). 386-388.
- Tláskal, P. Význam vitamínu D v pediatrické praxi [online]. 1. března 2013 [cit. 2015-10-4] Dostupné z <<http://www.pediatriepropraxi.cz/pdfs/ped/2013/02/06.pdf>>
- Traxer, O., Huet, B., Poindexter, J., Pak, C. Y. C., Pearle, M. S. 2003. Effect of ascorbic acid consumption on urinary stone risk factors. *The Journal of urology*. 170(2). 397-401.
- Tsao, R., Akhtar, M. H. 2005. Nutraceuticals and functional foods. I. Current trend in phytochemical antioxidant research. *J Food Agric Environ*. 3(1). 10-17.
- Valerio, A., Nisoli, E. 2015. Nitric oxide, interorganelle communication, and energy flow: a novel route to slow aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 3(6).
- Valk, E. E. J., Hornstra, G. 2000. Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 70(2). 31-42.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160(1). 1-40.
- Vallance, P., Collier, J., Moncada, S. 1989. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *The Lancet*. 334(8670). 997-1000.
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., Paredes-López, O. 2015. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*. 2015.
- Van Straten, M., Josling, P. 2002. Preventing the common cold with a vitamin C supplement: a double-blind, placebo-controlled survey. *Advances in therapy*. 19(3). 151-159.
- Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., de Nadra, M. C. M. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 18(2). 93-101.

- Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Vasconcelos, M. H., Ferreira, I. C. 2011. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*. 126(2). 610-616.
- Violi, F., Loffredo, L., Musella, L., Marcocchia, A. 2004. Should antioxidant status be considered in interventional trials with antioxidants? *Heart*. 90(6). 598-602.
- Viña, J., Borras, C., Abdelaziz, K. M., Garcia-Valles, R., Gomez-Cabrera, M. C. 2013. The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxidants & redox signaling*. 19(8). 779-787.
- Wan, H., Liu, R., Sun, H., Yu, X., Li, Y., Cong, Y., Liu, D. 2014. Caco-2 cell-based Antioxidant Activity of 36 Vegetables Commonly Consumed in China. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2(2). 88-95.
- Wang, J., Mazza, G. 2002. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN- $\gamma$ -activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50(4). 850-857.
- Wang, L., Sesso, H. D., Glynn, R. J., Christen, W. G., Bubes, V., Manson, J. E., Buring, J. E., Gaziano, J. M. 2014. Vitamin E and C supplementation and risk of cancer in men: posttrial follow-up in the Physicians' Health Study II randomized trial. *The American journal of clinical nutrition*, ajcn-085480.
- Wasser, S. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*. 60(3). 258-274.
- Wasser, S. P., Weis, A. L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of medicinal mushrooms*. 1(1).
- Weitzberg, E., Lundberg, J. O. N. 1998. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric oxide*. 2(1). 1-7.
- Wiseman, H. 1993. Vitamin D is a membrane antioxidant ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS letters*. 326(1). 285-288.
- Wolf, G. 2005. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *The Journal of nutrition*. 135(3). 363-366.

- Xu, X., Yasuda, M., Nakamura-Tsuruta, S., Mizuno, M., Ashida, H. 2012.  $\beta$ -Glucan from *Lentinus edodes* inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated murine RAW 264.7 macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 287(2). 871-878.
- Yalin, S., Bagis, S., Polat, G., Dogruer, N., Aksit, S. C., Hatungil, R., Erdogan, C. 2005. Is there a role of free oxygen radicals in primary male osteoporosis? *Clinical and experimental rheumatology*. 23(5). 689.
- Yang, J., Du, Y. 2003. Chemical modification, characterization and bioactivity of Chinese lacquer polysaccharides from lac tree *Rhus vernicifera* against leukopenia induced by cyclophosphamide. *Carbohydrate polymers*. 52(4). 405-410.
- Yang, J. H., Lin, H. C., Mau, J. L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*. 77(2). 229-235.
- Yoon, S. J., Yu, M., Pyun, Y. R., Hwang, J. K., Chu, D. C., Juneja, L. R., Mourão, P. A. S. 2003. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research*. 112(3). 151-158.
- Young, I., Woodside, J. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. 54(3). 176-186.
- Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D., Moucheng, W. 2005. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *International Immunopharmacology*. 5(5). 811-820.
- Ziche, M., Morbidelli, L. 2000. Nitric oxide and angiogenesis. *Journal of neuro-oncology*. 50(1-2). 139-148.

