

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Antioxidační aktivita vybraných druhů jedlých hub a
nastínění jejich možné aplikace ve vývoji funkčních
potravin**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Lucie Kubátová

Obor studia: Výživa a potraviny (AMD)

Vedoucí práce: Ing. Jan Tauchen, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antioxidační aktivita vybraných druhů jedlých hub a nastínění jejich možné aplikace ve vývoji funkčních potravin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému školiteli, panu Ing. Janu Tauchenovi, Ph.D. za cenné rady, odbornou pomoc a čas při vedení této diplomové práce. Poděkování také patří mé rodině a blízkým za neustálou podporu během psaní závěrečné práce i celého studia.

Antioxidační aktivita vybraných druhů jedlých hub a nastínění jejich možné aplikace ve vývoji funkčních potravin

Souhrn

Antioxidační aktivita je schopnost látky vychytávat volné radikály, zabraňovat jejich vzniku či je převádět na nereaktivní nebo méně reaktivní formy. Volné radikály v těle vznikají přirozeně při různých biologických reakcích a jsou žádoucí, avšak při jejich vysoké koncentraci vzniká v těle stav oxidačního stresu. Oxidační stres může být zodpovědný za vývoj a sekundární patologie některých lidských onemocnění, jako jsou specifické typy rakovin, neurodegenerativní nemoci (např. Alzheimerova a Parkinsonova choroba) a zánětlivá onemocnění. Jedním z preventivních a terapeutických přístupů je administrace látek s antioxidačním potenciálem. Kromě ovoce, zeleniny a léčivých rostlin se dnes antioxidační aktivita hojně diskutuje a studuje rovněž i u houbového materiálu.

Cílem magisterské práce bylo zjistit antioxidační účinky čtyř kmenů Hlívy ústřičné (*Pleurotus ostreatus*) a druhů *Pleurotus pulmonarius* a *Pleurotus flabellatus*. Dále vybrat vzorek s nejslibnějšími výsledky, který by se mohl následně využít při vývoji funkčních potravin sloužících pro prevenci nebo léčbu nemocí způsobených oxidačním stresem. Celkem bylo připraveno 6 vzorků houbového materiálu, které byly primárně testovány na antioxidační potenciál prostřednictvím dvou *in vitro* metod – DPPH a ORAC. Sekundárně se u vzorků stanovily protizánětlivé účinky enzymatickým *in vitro* testem za pomoci komerčního kitu a chemické složení prostřednictvím kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS) a plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS).

V rámci experimentu bylo prokázáno, že nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity vykazoval vzorek *Pleurotus flabellatus* s hodnotami $24,94 \pm 5,38$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu (DPPH) a $63,89 \pm 3,99$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu (ORAC). Oproti tomu nejslabší antioxidační účinek byl naměřen u vzorku *Pleurotus ostreatus* 5175, a to $4,28 \pm 0,29$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu (DPPH) a $21,68 \pm 4,18$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu (ORAC). Silné protizánětlivé účinky se projeví u tří vzorků, konkrétně se jednalo o *Pleurotus ostreatus* X ($86,71 \pm 1,94$ %, hexan:diethyletherový extrakt a $86,84 \pm 2,56$ %, chloroformový extrakt), *Pleurotus ostreatus* 5175 ($84,96 \pm 2,17$ %, hexan:diethyletherový extrakt a $82,21 \pm 2,67$ %, chloroformový extrakt) a *Pleurotus flabellatus* ($70,59 \pm 3,44$ %, hexan:diethyletherový extrakt a $85,04 \pm 0,73$ %, chloroformový extrakt). Výsledky naznačují, že druh *Pleurotus flabellatus* by mohl být perspektivní pro budoucí vývoj funkčních potravin, avšak před jejich případným uvedením na trh bude nezbytné provést další studie, zaměřené zejména na potvrzení jejich farmakologických účinků v *in vivo* podmínkách a detailní chemické složení.

Klíčová slova: doplňky stravy, léčivé houby, oxidační stres, volný radikál, zánět

Antioxidant activity of selected species of edible fungi and outline of their possible use in development of functional foods

Summary

Antioxidant activity is the ability of a substance to trap free radicals, prevent their formation or convert them to non-active forms or to less reactive forms. Free radicals are formed in human body naturally and they develop during various biological reactions. On the other hand excessive formation of reactive species causes oxidative stress in the body. Oxidative stress could be responsible for the development and secondary pathology of some human diseases, such as specific types of cancer, neurodegenerative diseases (eg. Alzheimer's and Parkinson's disease) and inflammatory diseases. One of the preventive and therapeutic approaches is the administration of substances with antioxidant potential. In addition to fruits, vegetables and medicinal plants, antioxidant activity is now widely discussed and also studied in edible fungi.

The aim of this master's thesis was to determine antioxidant effect of four species Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) a species *Pleurotus pulmonarius* a *Pleurotus flabellatus*. Next, select a sample with the most promising results that could continue to be used in the development of functional foods effective against oxidative stress related diseases (with special regard to inflammatory diseases). A total of 6 samples of fungal material were prepared and tested for antioxidant potential using an *in vitro* method based on the measurement of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical assay (DPPH) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC). Secondary, the anti-inflammatory effects of samples were determined by enzymatic *in vitro* assay using a commercial kit and chemical composition by liquid chromatography mass spectrometer (LC-MS) and gas chromatography mass spectrometer (GC-MS).

It was shown that the highest values of antioxidant activity were in the sample *Pleurotus flabellatus*, values $24,94 \pm 5,38$ $\mu\text{g TE/mg extract}$ (DPPH) and $63,89 \pm 3,99$ $\mu\text{g TE/mg extract}$ (ORAC). In contrast, the weakest antioxidant effect was measured in the sample *Pleurotus ostreatus* 5175, values $4,28 \pm 0,29$ $\mu\text{g TE/mg extract}$ (DPPH) a $21,68 \pm 4,18$ $\mu\text{g TE/mg extract}$ (ORAC). Strong anti-inflammatory effects were seen in three samples, namely *Pleurotus ostreatus* X ($86,71 \pm 1,94$ %, Hex:Et₂O extract and $86,84 \pm 2,56$ %, TCM extract), *Pleurotus ostreatus* 5175 ($84,96 \pm 2,17$ %, Hex:Et₂O extract and $82,21 \pm 2,67$ % TCM extract) and *Pleurotus flabellatus* ($70,59 \pm 3,44$ %, Hex:Et₂O extract and $85,04 \pm 0,73$ % TCM extract). Results suggest *Pleurotus flabellatus* species as prospective material for future development of functional foods. However, it is necessary to perform further studies which would be focused on their pharmacological effects under *in vivo* conditions and detailed characterization of their chemical composition.

Keywords: dietary supplements, medicinal fungi, oxidative stress, free radical, inflammation

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Teoretická část	11
3.1 Antioxidanty	11
3.2 Volné radikály	11
3.2.1 Vznik volných radikálů.....	12
3.2.2 Účinky volných radikálů a mechanismy jejich odstranění	13
3.3 Antioxidační účinky vybraných živin na odstranění volných radikálů	14
3.3.1 Bílkoviny	14
3.3.2 Tuky.....	14
3.3.3 Vitaminy	15
3.3.4 Minerální látky.....	15
3.4 Syntetické antioxidanty	16
3.5 Přírodní antioxidanty	16
3.5.1 Antioxidanty v houbách.....	16
3.5.2 Flavonoidy	17
3.5.3 Karotenoidy	18
3.5.4 Beta-glukany.....	19
3.6 Vliv antioxidantů na lidské zdraví.....	20
3.7 Oxidační stres a jeho účinky na lidské zdraví	21
3.7.1 Ateroskleróza	22
3.7.2 Cystická fibróza	23
3.7.3 Rakovina.....	24
3.7.4 Diabetes mellitus	25
3.7.5 Chronické střevní záněty	26
3.7.6 Neurogenerativní onemocnění.....	27
3.7.6.1 Alzheimerova choroba	27
3.7.6.2 Parkinsonova choroba	28
3.7.6.3 Amyotrofická laterální skleróza	28
3.7.7 Choroby očí	28
3.7.8 Ischemická onemocnění.....	29

3.8	Metody pro stanovení antioxidačních vlastností	30
3.8.1	Metoda DPPH.....	30
3.8.2	Metoda ORAC	31
4	Materiál a metody	32
4.1	Houbový materiál.....	32
4.2	Chemikálie a reagenty	32
4.3	Příprava vzorků	33
4.4	<i>In vitro</i> stanovení antioxidační aktivity.....	33
4.4.1	DPPH	33
4.4.2	ORAC	34
4.5	<i>In vitro</i> stanovení protizánětlivé aktivity.....	34
4.6	LC-MS.....	34
4.7	GC-MS	35
5	Výsledky	36
5.1	Výsledky stanovení antioxidační aktivity.....	36
5.2	Výsledky protizánětlivé aktivity	36
5.3	Výsledky LC-MS	37
5.4	Výsledky GC-MS.....	41
6	Diskuze	42
7	Závěr	45
8	Seznam použité literatury	46
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	59

1 Úvod

V posledních letech výrazně stoupl zájem o studium antioxidantů, volných radikálů a jejich vlivu na lidské zdraví. Produkce volných radikálů probíhá nepřetržitě ve všech buňkách jako součást normálních oxidačních procesů, které jsou životně důležité. Avšak nekontrolovaná tvorba těchto reaktivních entit a jejich kumulace v tkáních a buněčných strukturách může mít za následek poškození biologických molekul, jako jsou lipidy, proteiny, DNA aj., což vede k negativním účinkům na lidské zdraví (Young & Woodside 2001; Fang et al. 2002). Aby bylo možné těmto účinkům čelit, existují látky zvané antioxidanty, které mají schopnost svou aktivitou zabránit vzniku volných radikálů nebo snížit jejich množství či je přeměnit na méně reaktivní nebo zcela nereaktivní formy, a tím udržují homeostázu těla. Jakákoliv nerovnováha mezi reaktivními částicemi a antioxidanty vede ke stavu známého pod pojmem oxidační stres, který následně může vést k rozvoji různých patologických stavů (Halliwell 2012).

Lidské tělo má vyvinutou vlastní efektivní antioxidační ochranu v podobě endogenních antioxidačních systémů (např. některé formy enzymů superoxid dismutázy, katalázy aj.), avšak některé studie a články tvrdí, že je zapotřebí přijímat i antioxidanty z vnějšího prostředí, tj. ze stravy. Nejčastěji se vyskytují v rostlinných produktech a jedná se zejména o vitaminy (například C a E), flavonoidy, beta-glukany či karotenoidy. Tyto látky mají kromě antioxidačních schopností i jiné biologické aktivity. U flavonoidů byly například prokázány protizánětlivé a antimikrobiální účinky, u beta-glukanů se velmi často zmiňuje imunomodulační aktivita. Nicméně problémem některých antioxidantů je jejich odlišné chování v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Tento problém byl zjištěn konkrétně u flavonoidů, které se *in vitro* chovají jako velmi silné antioxidanty, ale za určitých okolností se v *in vivo* podmínkách chovají prooxidačně (Lambert et al. 2005). Podobně jsou na tom i karotenoidy, u kterých se prooxidační aktivita projevuje v závislosti na množství kyslíku (Sen Gupta & Ghosh 2013; Ribeiro et al. 2018). V současnosti vzbuzují poměrně velký zájem také syntetické antioxidanty, avšak stále se spíše směřuje cestou přírodních forem antioxidantů (Tauchen 2019).

Vhodným zdrojem antioxidačních látek jsou kromě ovoce, zeleniny, obilovin aj., také houby. Houby jsou nutričně velmi vyhovující potravinou, protože obsahují značné množství proteinů a vlákniny, a naopak nízké množství tuků a soli (Cheung 2010). Jejich oblibu zvyšuje i fakt, že jsou zdrojem cenných biologických látek s možnými zdravotními účinky. Jsou bohaté zejména na fenolové sloučeniny, beta-glukany, triterpeny a steroly (Quin et al. 2014), díky kterým jsou houbám přisuzovány antioxidační, antibakteriální, protinádorové či protizánětlivé účinky (Cheung 2010; Loyd et al. 2018). Z tohoto důvodu je velkým trendem některé druhy hub kultivovat. Jednou z nejkultivovanějších hub je Hlíva ústřičná (*Pleurotus ostreatus*) (Sánchez 2010). Jedná se o jedlou dřevokaznou houbu, které má široké spektrum využití, ať už v kulinářském či ve farmakologickém odvětví. Kromě vysokého obsahu zejména beta-glukanů má hlíva ústřičná také schopnost syntetizovat ergothionein, což je látka vykazující silné antioxidační účinky. I proto se spekuluje o možném využití této houby jako složky funkčních potravin či potravinových doplňků s pravděpodobnými léčebnými účinky. Vědci naznačují například možnost použití beta-glukanů Hlívy ústřičné k vytvoření funkčních potravin na bázi fermentovaných mléčných výrobků (např. jogurtů) (Antontceva et al. 2018; Üstün et al. 2018).

Na základě výše uvedených skutečností se tato diplomová práce zabývá stanovením *in vitro* antioxidační a protizánětlivé aktivity houbového materiálu a kvalitativním stanovením obsahových látek, které by za tyto biologické aktivity mohly být zodpovědné. Výsledky poté poslouží k vytipování vhodného kmene s nejslibnější biologickou aktivitou, který by mohl sloužit jako prospektivní materiál pro případnou integraci do funkčních potravin či doplňků stravy (např. do čokolády, jogurtů nebo sýrů).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce je stanovit antioxidační aktivitu vybraných druhů jedlých hub a následně zvolit druh, který bude mít nejlepší výsledky a případně by mohl být dále využitý při vývoji funkčních potravin. Tyto funkční potraviny by poté byly použity pro prevenci nebo v lepším případě léčbu nemocí, které jsou způsobené oxidačním stresem.

Hypotézou je, že systematické testování houbového materiálu může vést k objevu extraktu či jednotlivých látek s výraznou antioxidační aktivitou využitelných při vývoji funkčních potravin.

3 Teoretická část

3.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které mají schopnost již v nepatrném množství zcela inhibovat či částečně zpomalit oxidační procesy, ať už schopností vychytávat volné radikály nebo navázáním kovových iontů – tzv. chelatace (Halliwell & Gutteridge 1995; Brewer 2011). Jak naznačuje tato definice, fyziologickou rolí antioxidantů je proto zabránit poškození buněčných složek, které vzniká v důsledku chemických reakcí zahrnující volné radikály (Young & Woodside 2001). Obecně mohou antioxidanty v těle pracovat na třech různých úrovních:

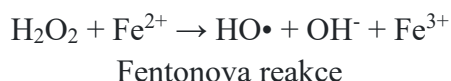
- 1) Prevence – tj. udržení tvorby reaktivních entit na minimum,
- 2) Zachycení – tj. zachycení reaktivních složek prostřednictvím katalytických nebo nekatalytických molekul,
- 3) Oprava – tj. reparace poškozeného cíle molekuly (Kohen & Nyska 2002).

Mezi antioxidanty můžeme zařadit celou řadu látek, ať už endogenního nebo exogenního původu. Antioxidanty endogenního původu jsou například koenzym Q, glutathion, peroxiredoxiny a různé varianty superoxid dismutázy a katalázy. Druhou skupinou jsou antioxidanty exogenního původu, které do těla dodáváme prostřednictvím potravin nebo doplňků stravy. Jedná se zejména o vitaminy, konkrétně vitaminy C, E, A, dále karotenoidy, polyfenoly, flavonoidy aj. Antioxidanty a enzymy s antioxidantními vlastnostmi společně kooperují a udržují hladinu volných radikálů v žádoucích koncentracích (Fang et al. 2002).

3.2 Volné radikály

Pod pojmem volný radikál si můžeme představit ionty, atomy či molekuly, v jejichž elektronovém obalu nalezneme jeden nebo více nepárových elektronů. Tyto charakteristické vlastnosti dělají volné radikály velice nestabilní a vysoce reaktivní (Gilbert 2000). Jejich vlivem dochází k oxidačním účinkům a tato reakce bývá často řetězová (Halliwell & Gutteridge 2015).

K nejznámější reaktivním sloučeninám patří reaktivní formy kyslíku, zkráceně ROS (reactive oxygen species), reaktivní formy dusíku tzv. RNS (reactive nitrogen species), a také atomy uhlíku, síry nebo chlóru (např. HClO) (Denisov & Afanas'ev 2005; Halliwell & Gutteridge 2015). ROS, RNS a reaktivní formy chlóru jsou produkovány u člověka i zvířat za fyziologických a patologických podmínek, tzn. že tyto skupiny zahrnují radikálové i neradikálové druhy (Fang et al. 2002). Mezi biologicky důležité volné radikály patří například hydroxylový radikál (HO•), superoxidový radikál ($\bullet\text{O}_2^-$), peroxylový a alkoxylový radikál, oxid dusnatý (NO•), oxid dusičitý (NO₂•) a mnoho dalších. Zařadit mezi reaktivní formy můžeme i peroxid vodíku (H₂O₂), který sám o sobě sice není volný radikál, ale v přítomnosti některých kovů (Fe²⁺, Cu⁺) se jeho reaktivita zvýší a může vzniknout hydroxylový nebo hydroxyperoxylový radikál. Jedná se o takzvanou Fentonovu reakci (Ledvina et al. 2009).

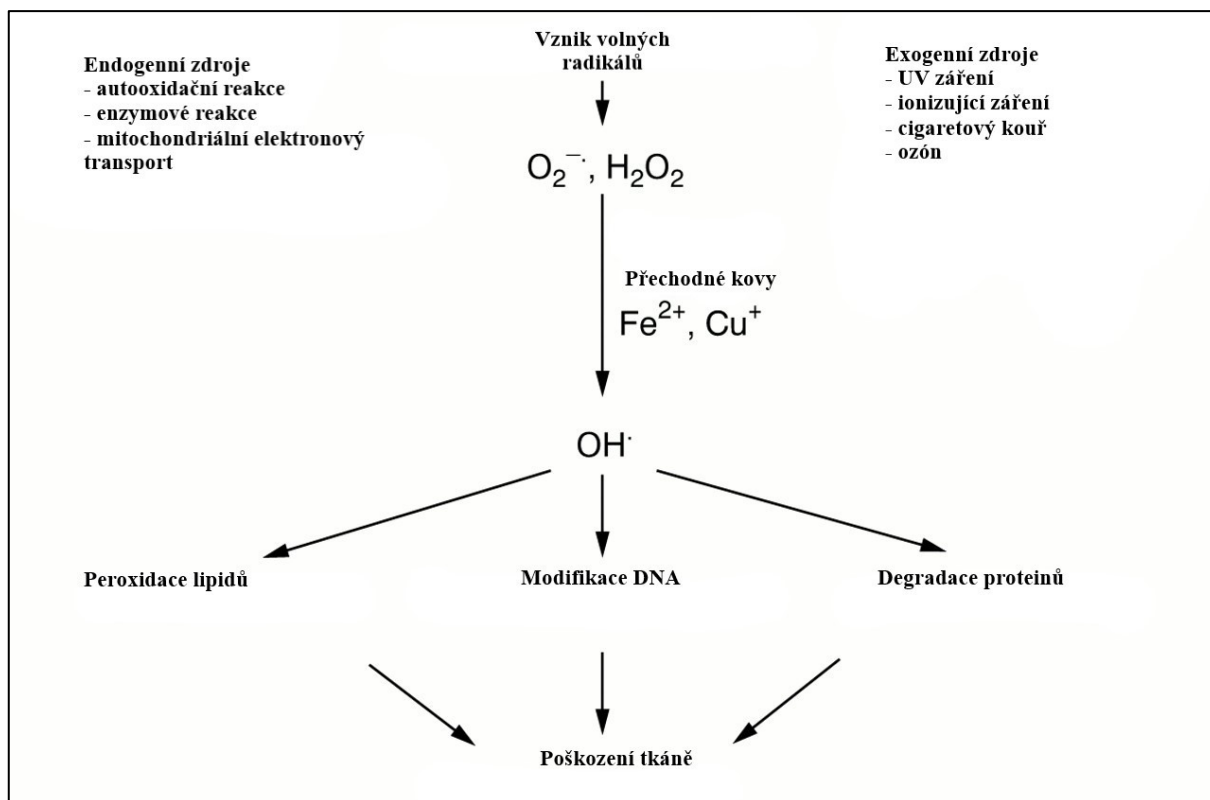


Oxidační reakce hrají podstatnou roli v mnoha důležitých biologických procesech například během oxidační fosforylace probíhající v mitochondriích, dále při buněčné signalizaci, fagocytóze, tvorbě enzymů a dalších významných biologických molekul (Denisov & Afanas'ev 2005; Halliwell & Gutteridge 2015). Na druhou stranu jsou volné radikály z velké části zodpovědny za oxidativní degradaci biologicky důležitých látek, především nukleových kyselin, lipidů, proteinů a dalších biomolekul, což může být domnělým spouštěčem několika závažných onemocnění jako je rakovina, diabetes mellitus, infarkt myokardu, mozkové mrtvice a další (Halliwell & Gutteridge 1990; Imlay 2003). Existují tedy „dvě tváře“ volných radikálů, kdy slouží jako signální a regulační molekuly, ale i jako vysoce škodlivé oxidanty. I přes zmíněná negativa hrají klíčovou roli v důležitých reakcích biologických systémů a je tedy zapotřebí udržet jejich tvorbu v rovnováze. Tento úkol mají již zmíněné látky zvané antioxidanty, které chrání buňky před oxidačním poškozením (Arnao et al. 2001; Halliwell & Gutteridge 2015).

3.2.1 Vznik volných radikálů

Volné radikály mohou vzniknout různými cestami skze zdravé nebo patogenní buňky, které se podílejí na metabolismu. Zjednodušeně řečeno lze ale tvrdit, že původ volných radikálů je dvojího typu. Vznikají buď přímo v organismu při metabolických dějích v důsledku aerobního metabolismu nebo se mohou do těla dostat ze zevního prostředí (Fang et al. 2002) (Obrázek 1).

Mezi exogenní zdroje volných radikálů řadíme například UV záření, ionizující záření, cigaretový kouř či ozón, který je velmi silným oxidantem způsobující zánětlivé reakce zejména v plicích (Fang et al. 2002). Endogenně mohou reaktivní částice vzniknout například během rozpadu fagocytů a makrofágů, což se projeví ve formě různých zánětů nebo sepsí. Dále se mohou tvořit při vzniku methemoglobinu, syntéze prostaglandinu nebo během hyperglykémie (Pokorný et al. 2001). Mezi endogenní zdroje také patří mitochondriální transport elektronů či autooxidační reakce (Young & Woodside 2001).



Obr. 1 Hlavní zdroje volných radikálů a důsledky jejich poškození (zpracováno podle Young & Woodside 2001).

3.2.2 Účinky volných radikálů a mechanismy jejich odstranění

Jak již bylo zmíněno výše, nebezpečí oxidativního poškození podléhají všechny důležité biologické struktury – lipidy, nukleové kyseliny, proteiny, a také sacharidy (Blokhina et al. 2003). Zejména poškození lipidů (tzv. peroxidace), kdy dochází k narušení membránové fluidity a poškození DNA, je u živočichů negativně spojováno s projevem některých onemocnění, jako je rakovina, ateroskleróza aj. (Imlay 2003). Přírodně může být peroxidace lipidů způsobena činností enzymů lipoxygenáz. Tento enzym katalyzuje přeměnu arachidonové kyseliny na eikosanoidy, konkrétně leukotrieny, jejichž účast je nezbytná při zánětlivých či alergických reakcích. Na druhé straně však existuje peroxidace lipidů způsobená kyslíkatými radikály, nejčastěji hydroxylovým radikálem, která je spíše nežádoucí (Blokhina et al. 2003).

Odstranění volných radikálů je možné dosáhnout enzymatickými či neenzymatickými reakcemi. Hlavními obrannými systémy jsou superoxid dismutáza (SOD), glutathion (GSH), glutathion peroxidáza (GPx), glutathion reduktáza (GR), kataláza (enzym hemu) a živiny s antioxidačními vlastnostmi (Fang et al. 2002). Klíčovou úlohu také hraje odbourávání glukózy pentosofosfátovou cestou. Tento cyklus zajišťuje přísun NADPH, tím je zachován poměr mezi GSH a GSSG (glutathion disulfid) a výsledkem je normální redoxní stav v buňkách. Pokud se intracelulární koncentrace GSH sníží a koncentrace GSSG zvýší, výrazně stoupne potřeba NADPH buňkami (Sies 1999). Při nedostatku NADPH může nastat

nerovnováha v koncentraci volných radikálů. Pokud je produkce volných radikálů větší než jejich vychytávání, dochází v buňkách a tkáních k oxidativnímu poškození (Fang et al. 2002).

3.3 Antioxidační účinky vybraných živin na odstranění volných radikálů

3.3.1 Bílkoviny

Aminokyseliny jsou základním stavebním kamenem pro syntézu bílkovin, a též některých enzymů s antioxidační aktivitou. Některé aminokyseliny či deriváty aminokyselin (např. arginin, glycin, histidin, taurin), malé peptidy (např. GSH a karnosin) a dusíkaté metabolity – kyselina močová a kreatin, mají schopnosti přímo zachycovat volné kyslíkaté radikály (Fang et al. 2002). Dle studie Wu & Meininger (2002), se také ukázalo, že taurin i taurin chloramin inhibují expresi syntázy oxidu dusnatého, zkráceně iNOS, čímž je narušena syntéza oxidu dusnatého v různých typech buněk včetně hepatocytů, makrofágů a gliových buněk. Deficit proteinů v potravě nejenže narušuje syntézu antioxidačních enzymů, ale také snižuje koncentraci antioxidantů ve tkáni, což vede ke zhoršení celkového antioxidačního stavu (Sies 1999; Fang et al. 2002).

V 60. letech minulého století byly velice populární diety s vysokým obsahem bílkovin, které se aplikovaly na pacienty trpící obezitou. Ačkoliv neexistují žádné dlouhodobé studie o jejich celkové účinnosti a bezpečnosti, lze ale předpokládat, že taková strava může vést ke zvýšenému oxidačnímu stresu (St. Jeor et al. 2001). Jedním z důkazů je i studie Mohanty et al. (2002), která tvrdí, že nadbytečný příjem bílkovin stimuluje tvorbu reaktivních forem kyslíku, a je tak vyšší riziko poškození základních buněčných součástí.

3.3.2 Tuky

Polynenasycené mastné kyseliny tzv. PUFAs, jsou náchylné k oxidaci volnými radikály (Hennig et al. 2001). Vysoký příjem těchto mastných kyselin tedy může vést ke zvýšenému riziku peroxidace lipidů, což lze zmírnit doplňováním vhodných antioxidantů – vitamínu C, vitamínu E aj. (Fang et al. 2002). Zvyšující se extracelulární koncentrace mastných kyselin a snižující se hustota lipoproteinů indukuje expresi iNOS v buňkách hladkého svalstva cév, makrofágů a pankreatických beta buněk (Wu & Meininger 2002). Podobně je to i s nadbytečným příjmem nasycených mastných kyselin. Nastane zvýšená aktivita iNOS v játrech a tlustém střevě, čímž se stimuluje tvorba volných radikálů a dochází k oxidativnímu poškození DNA v mitochondriích kosterního svalstva (Sreekumar et al. 2002).

Některé epidemiologické studie ukázaly, že konzumace potravin s vyšším obsahem omega-3 nenasycených mastných kyselin, například rybího oleje, snižuje riziko kardiovaskulárních chorob. Účinek rybího oleje má částečně za následek inhibici lipogeneze a stimulaci oxidace mastných kyselin v játrech (Brown & Hu 2001). Je však zajímavé, že rybí olej lze také snadno peroxidovat za vzniku hydrogenperoxidů, a tím zvýšit oxidační stres (Brown & Hu 2001; Fang et al. 2002). Tomuto paradoxu rybího oleje se věnuje mnoho vědeckých publikací, avšak stále neexistuje zcela uspokojivý výsledek. Nevyvratitelné je ale to, že omega-3 nenasycené mastné kyseliny jsou schopné inhibovat produkci volných radikálů,

a tím zajistit oxidační rovnováhu v těle (Fang et al. 2002; Takahashi et al. 2002; Wu & Meininger 2002).

3.3.3 Vitaminy

I mnoho vitaminů disponuje schopností inhibovat některé volné radikály, příkladem může být vitamin A, který brání transkripci genu syntázy oxidu dusnatého v buňkách cévního endotelu nebo v kardiomyocytech. Snížením tvorby oxidu dusnatého přispívá k prevenci vzniku radikálové cytotoxicity (Hirokawa et al. 1994; Fang et al. 2002). Vitamin B₃, vitamin K₂ a vitamin D₃ zase inhibují expresi iNOS v nervových buňkách – astrocytech a mikroglíích (Garcion et al. 1997; Fang et al. 2002). Vitaminy také přímo zachycují ROS a zvyšují tím aktivitu antioxidantních enzymů – vitamin E je například považován za jeden z nejdůležitějších antioxidantů. Konkrétně chrání buňky před peroxidací polynenasycených mastných kyselin v membránových fosfolipidech, před oxidačním poškozením lipoproteinů, poškozením DNA aj. (Topinka et al. 1989). Dalším významným antioxidantem je vitamin C, který plní v těle řadu důležitých funkcí. Chrání LDL částice před oxidací, blokuje reakce, kterými vznikají karcinogenní nitrosaminy, čímž chrání mukózní tkáň, v kombinaci s bioflavonoidy účinně blokuje volné radikály a v neposlední řadě jsou jeho prostřednictvím chráněny další antioxidanty, například vitamin E (Du et al. 2012). Za určitých podmínek se však vitamin C může chovat prooxidačně. Nadměrný příjem může indukovat produkci reaktivních druhů, peroxidu vodíku nebo se mohou vytvářet tzv. askorbátové radikály (Chen et al. 2007).

3.3.4 Minerální látky

Železo je nejhojnějším stopovým prvkem v těle a téměř veškeré se váže na proteiny. Koncentrace volného železa je nízká zejména ze dvou důvodů – Fe³⁺ není rozpustné ve vodě a Fe²⁺ se podílí na tvorbě volných radikálů – chová se jako prooxidant. Zvýšením extracelulární nebo intracelulární koncentrace železa je podpořena produkce reaktivních forem kyslíku, peroxidace lipidů a vyšší riziko oxidačního stresu (Dabbagh et al. 1994; Fang et al. 2002).

Měď, zinek a mangan jsou nezbytnými kovy pro činnost superoxid dismutáz. Superoxid dismutáza s mědí a zinkem (Cu/Zn-SOD) chrání cytoplazmu a metabolické činnosti v ní probíhající a superoxid dismutáza s manganem (Mn-SOD) má za úkol ochranu mitochondrií. Nedostatečným přísunem těchto minerálních látek v potravě se snižuje aktivita zmíněných superoxid dismutáz, což může mít za následek různá peroxidační poškození a mitochondriální dysfunkce (Fang et al. 2002).

Další důležitou minerální látkou je selen, který je nezbytným kofaktorem několika selenoproteinů (např. selenoprotein P), a je také součástí glutathion peroxidázy. Glutathion peroxidáza (GPx) je klíčový enzym, který v těle rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Už podle výsledků dávné studie Xia et al. (1985) se ukázalo, že množství selenu ve stravě hraje klíčovou roli v aktivitě glutathion peroxidázy, kdy výrazný nedostatek selenu snižuje aktivitu GPx až o 90 % (Fang et al. 2002).

3.4 Syntetické antioxidanty

Syntetické antioxidanty mají využití jak v potravinářském, tak farmaceutickém průmyslu, ale převážně jsou stále ve fázi klinického testování. Mezi syntetické antioxidanty patří například butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT), terciální butylhydrochinon (TBHQ), ethoxyquin (EQ) nebo propylgalát. Všechny tyto látky jsou efektivní antioxidanty schopné inhibovat oxidaci (Atta et al. 2017). Avšak některé syntetické antioxidanty mohou mít za určitých podmínek nepříznivé toxické účinky – například butylhydroxyanisol. Tato látka, která je často používána v potravinářském průmyslu, protože zpomaluje žluknutí tuků a má aromatické účinky, může ve vyšších dávkách negativně působit na regulaci aktivity MAPK (mitogenen aktivované proteinové kinázy) (Yu et al. 1997; Kozarski 2015). Musíme tedy brát na vědomí, že téměř všechny (ne-li zcela všechny) účinné léky a medikamenty mají vedlejší účinky. V posledních letech se však cílí na eliminaci negativních vedlejších účinků a vývoj lepších syntetických antioxidantů (Tauchen 2019).

3.5 Přírodní antioxidanty

3.5.1 Antioxidanty v houbách

Houby byly lidmi konzumovány již od nepaměti zejména pro jejich nutriční a potenciální léčivé účinky (Román et al. 2006). V dnešní době je oblíbenost hub dána nejen jejich senzoryckými vlastnostmi, ale i z důvodu nízkého obsahu kalorií, tuků a soli. Naopak jsou bohaté na bílkoviny, vlákninu, různé minerální látky (např. vápník, draslík, sodík, fosfor, hořčík, selen, měď, železo, zinek a mangan) a vitamíny skupiny B (např. niacin, riboflavin a foláty) (Cheung 2010). Kromě toho, že jsou považovány za výživnou potravinu, některé houby jsou také důležitým zdrojem biologicky aktivních látek s potenciální léčivou hodnotou. Mezi nejvýznamnější bioaktivní látky vyskytující se v houbách patří rostlinné fenolové sloučeniny, steroly, triterpeny a beta-glukany (Cheung 2010; Quin et al. 2014). Triterpeny představují jednu z nejrozmanitějších a důležitých skupin biologicky aktivních látek identifikovaných v léčivých houbách, například houba *Ganoderma lucidum* obsahuje více než 120 různých triterpenů (Kim & Kim 1999; Cheung 2010). U řady triterpenů z této houby byl prokázán antivirový účinek, některé byly naopak schopny inhibovat biosyntézu cholesterolu (Cheung 2010).

Na základě vědeckého výzkumu bylo potvrzeno mnoho farmakologických účinků hub, například antioxidační, antibakteriální, protinádorové a protizánětlivé (Cheung 2010). Proto jsou houby bohaté na bioaktivní složky často uplatňovány ve farmacii. Například v tradiční čínské a japonské medicíně bývají využívány již několik tisíc let druhy *Ganoderma*, v Číně běžně nazývané Lingzhi a v Japonsku Reishi, zejména pro posílení imunity, a také pro jejich protizánětlivé účinky (Cheung 2010; Loyd et al. 2018). Celosvětově mezi dva nejvíce kultivované jedlé druhy hub patří *Pleurotus ostreatus* a *Agaricus bisporus* (Sánchez 2010; Corrêa et al. 2016). V poslední době také přitahují některé druhy jedlých hub velkou pozornost jako potenciální komerční zdroje antioxidantů v podobě doplňků stravy. Byla popsána celá řada druhů vykazující antioxidační aktivitu (například rod *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Agaricus* aj.) (Corrêa et al. 2016). Mezi potvrzené antioxidanty obsažené v houbách řadíme flavonoidy,

karotenoidy, fenolové kyseliny, polysacharidy, minerální látky, tokoferoly, askorbovou kyselinu aj. (Mau et al. 2002; Kozarski et al. 2015). Jejich účinek může být zejména posílení antioxidační obrany, čímž přispějí ke snížení hladiny oxidačního stresu. Existuje řada důkazů, které podporují fungování této strategie *in vitro* (Kozarski et al. 2015). Zajímavé by mohlo být také využití velmi silného a stabilního antioxidantu ergothioneinu (ERG). Jedná se o thiohistidinovou betainovou aminokyselinu, která je syntetizovaná zejména houbami (např. *Pleurotus* spp.), ale i actinobakteriemi a cyanobakteriemi. Živočichové si pro transport této sloučeniny vyvinuli vysoce selektivní transportér, u lidí známý jako rodina solutů 22 (SLC22A4), což ukazuje na jeho důležitost a polemizuje se i nad tím, zda může mít ERG i status vitamínu (Borodina et al. 2020). Některé studie již naznačují, že ergothionein může být fungujícím dietárním antioxidantem, který by mohl fungovat při léčbě různých zánětlivých onemocnění spojených s oxidačním stresem (Cheah et al. 2017; Borodina et al. 2020).

3.5.2 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří největší podskupinu rostlinných fenolických látek. Podle chemické struktury bylo klasifikováno přibližně 4000 flavonoidů, které se dále dělí na několik podskupin – flavony, flavonoly, isoflavony, flavanoly, flavanonoly, flavanony, anthokyanidiny a proanthokyanidiny (Miller 1996; Pietta 2000). Nejrozšířenější a nejvýznamnější jsou pravděpodobně flavonoly a flavony, konkrétně se jedná o quercetin, kaempferol a myricetin (Goufo & Trindade 2014). Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin plnící různé biologické funkce – způsobují pigmentaci květů, plodů, semen, čímž lákají opylovače, dále chrání rostliny před patogenními mikroorganismy a UV zářením atd. Jelikož se flavonoidy vyskytují téměř v každé vyšší rostlině, jsou logicky nedílnou součástí lidské stravy. Poskytují barvu a chuť ovoci, zelenině, ořechům či semenům (Schijlen et al. 2004).

Flavonoidy mohou působit několika různými mechanismy, přičemž některé z nich zůstávají stále nejasné. Jednotlivě nebo v kombinaci vykazují protizánětlivé a antimikrobiální účinky, a také mají schopnost inhibovat hydrolytické a oxidativní enzymy (Kim et al. 2008; Xiao et al. 2011). Jejich příjem je mnohdy spojován se snížením rizika některých onemocnění, jako jsou některé druhy rakoviny, ischemické choroby srdeční, diabetes či obezita, ale nejedná se přímo o antioxidační účinek v pravém slova smyslu, jejich mechanismus je spíše na úrovni inhibice enzymů, které podněcují oxidační stres (Xiao et al. 2017). Kromě toho také inhibují produkci prozánětlivých cytokinů, mediátorů eikosanoidů, nukleárního faktoru kappaB aj. (Bhaskar et al. 2016). Do dnešní doby neexistuje žádná intervenční studie, která by s naprostou jistotou potvrdila, že použití flavonoidů je benefitem u nemocí spojených s oxidačním stresem (Ballard & Junior 2019).

Během posledních let se použití flavonoidů výrazně zvýšilo, a to jak v potravinářství, tak ve farmacii, či v zemědělství. Některé flavonoidy vykazují v *in vitro* podmínkách antioxidační vlastnosti – například u quercetinu a flavan-3-ol epikatechin gallátu byla naměřena pětikrát vyšší antioxidační aktivita než u vitamínu E a C (Schijlen et al. 2004). Znalosti o mechanismech jejich aktivity *in vivo* jsou však stále omezené a dosud se o nich diskutuje (González-Paramás et al. 2019). V některých studiích se dokonce objevuje, že za určitých okolností se mohou flavonoidy *in vivo* chovat prooxidačně (Procházková et al. 2011). Proto by

doplňky s vysokým obsahem flavonoidů měly být užívány v rozumné míře pod lékařským dohledem, protože potenciální toxicita těchto koncentrovaných sloučenin není dosud přesně stanovená (Ballard & Junior 2019).

3.5.3 Karotenoidy

Jedná se o barevné lipofilní pigmenty (žluté, oranžové, červené) rostlin, hub, řas, mikroorganismů a živočichů. Nacházejí se ve všech fotosyntetizujících rostlinných pletivech a jejich hlavním úkolem je ochrana rostlin před fotooxidačními procesy. Karotenoidy patří mezi nejčastější přírodní pigmenty a dosud bylo charakterizováno více než 700 různých sloučenin. Lze je klasifikovat na základě jejich chemické struktury do dvou skupin – karoteny (α -karoten, β -karoten, lykopen) a xantofyly (lutein, zeaxanthin, astaxanthin).

Karotenoidy začaly přitahovat více pozornosti poté, co několik epidemiologických studií odhalilo, že zvýšená konzumace stravy bohaté na karotenoidy souvisí se sníženým rizikem některých degenerativních poruch (Mayne 1996; Stahl & Sies 2003). Do biologické aktivity karotenoidů můžeme zahrnout:

- funkce jako provitamin vitamínu A,
- stimulace imunitní odpovědi,
- regulace buněčného cyklu/apoptózy,
- modulace růstových faktorů aj. (Fiedor & Burda 2014).

Tyto účinky jsou spojené s jejich antioxidační aktivitou, která závisí na mnoha faktorech. Rozhodující je jejich systém konjugovaných dvojných vazeb, který poskytuje karotenoidům vysokou reaktivitu. Dalším faktorem ovlivňující antioxidační vlastnosti je schopnost začlenění se do biologických membrán a následná interakce s reaktivními druhy. Aktivita karotenoidů je také v konečném výsledku závislá na přítomnosti další antioxidantů (např. α -tokoferol) (Gammone et al. 2015). V literatuře je obecně uváděno, že karotenoidy fungují jako zhasiče volných radikálů – jsou schopné přeměnit energii ultrafialového záření, která je předávána aktivním formám kyslíku, na teplo, čímž zabrání poškození buněčných struktur (Ribeiro et al. 2018). Nicméně karotenoidy jsou považovány spíše za „domnělé antioxidanty“, zejména proto, že nebylo prokázáno, že jejich ochranné biologické účinky přímo souvisí s jejich antioxidačními vlastnostmi (Halliwell 1996; Ribeiro et al. 2018).

S přibývajícím studiem na téma karotenoidů a jejich účinků se objevila možnost jejich prooxidační aktivity. Jak už bylo zmíněno výše, karotenoidy se vyznačují vysokou reaktivitou. Jsou tedy náchylné i k oxidaci působením reaktivních druhů, čímž vzniká množství nežádoucích sloučenin. Tyto sloučeniny, často označované jako oxidační produkty, nejsou dosud plně studovány či zcela identifikovány v biologických tkáních, ale existuje řada studií, které naznačují, že mohou mít silné oxidační účinky a jsou schopné indukovat růst rakovinných buněk (Nagao 2004; Ribeiro et al. 2018). Při studiu beta-karotenu se zjistilo, že množství kyslíku, je určující pro antioxidační či prooxidační aktivitu. Při běžném obsahu kyslíku, který je typický pro lidské tkáň, působí beta-karoten antioxidačně, avšak při zvyšujícím se množství je beta-karoten snadno autooxidován a může vykazovat prooxidační chování (Sen Gupta & Ghosh 2013; Ribeiro et al. 2018). Proto je důležité stále prohlubovat znalosti

v této oblasti a stanovit skutečný dopad karotenoidů a jejich oxidačních produktů na lidské zdraví (Ribeiro et al. 2018).

3.5.4 Beta-glukany

Beta-glukany jsou polysacharidy složené z molekul glukózy spojené β -glykosidovými vazbami. Tyto látky byly extrahovány z různých zdrojů, jako jsou například houby, mořské řasy, obiloviny aj. Fyzikální vlastnosti beta-glukanů se liší v závislosti na jejich struktuře, včetně typu vazby, stupně větvení, molekulární hmotnosti a konformaci (Tada et al. 2008). U beta-glukanů extrahovaných z obilovin, konkrétně z ječmene, bylo prokázáno, že mají pozitivní účinek na hladinu lipidů v krvi – snižují množství cholesterolu a triglyceridů, a tím potenciálně redukuje riziko vzniku ischemické choroby srdeční (Keenan et al. 2007). Kromě toho mají beta-glukany v obilovinách i jiné biologické účinky, například zvyšují viskozitu tráveniny, tím je omezené vstřebávání glukózy z tenkého střeva a výsledkem je snížení hladiny glukózy v krvi (Östman et al. 2006). Beta-glukany obilovin se proto často používají jako potravinářské přídatné látky, a také jako doplňky stravy (Kofuji et al. 2012). Ragaee et al. (2006) prokázali antioxidační aktivitu různých obilovin, jako je ječmen, proso, žito a čirok. Toto stanovisko bylo potvrzeno také studií Kofuji et al. (2012), kteří extrahovali beta-glukany z ječmene. Rovněž se ukázalo, že beta-glukany z ječmene mají výrazně vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s jinými obilovinami, což naznačuje, že antioxidační vlastnosti jsou ovlivněny strukturou beta-glukanů, a také metodou jejich zpracování (Kofuji et al. 2012).

U beta-glukanů hub byla zjištěna imunomodulační aktivita. Studie prováděné *in vitro* obecně naznačují, že beta-glukany mohou přímo aktivovat leukocyty, stimulovat jejich fagocytární, cytotoxickou a antimikrobiální aktivitu, včetně produkce reaktivních druhů kyslíku a dusíku. Stimulací beta-glukany se také zvyšuje schopnost makrofágů rozpoznávat a odstraňovat apoptické buňky (Brown & Gordon 2003). Podávání beta-glukanů *in vivo* může zvyšovat potenciální odpověď hostitele proti celé řadě stavů, jakou jsou houbové, bakteriální či virové patogeny, a také se polemizuje o zabránění tvorby nádorů (Tzianabos 2000). Ukázalo se, že beta-glukany izolované z hub *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* a *Lentinus edodes* mají antiproliferační účinek a proapoptickou aktivitu na nádorové buňky tlustého střeva a konečníku (Surenjav et al. 2006; Lavi et al. 2010). Přestože nedošlo k rozsáhlému farmaceutickému vývoji těchto látek, v Japonsku jsou povoleny beta-glukany lentinan a schizophyllan pro nádorovou imunoterapii (Brown & Gordon 2003; Nakashima 2018). S imunomodulační aktivitou beta-glukanů hub souvisí také jejich schopnost působit protizánětlivě. Regulují totiž hladiny prozánětlivých látek, jako jsou například interleukiny, prostaglandiny apod. (Du et al. 2015). Enzymy, podílející se na syntéze prostaglandinů z kyseliny arachidonové, se nazývají cyklooxygenázy (COX) a existují ve dvou formách – COX-1 a COX-2. COX-1 je exprimován ve většině tkání a buněk a předpokládá se, že řídí syntézu prostaglandinů důležitých pro normální buněčné funkce (např. ochrana žaludeční sliznice). Oproti tomu COX-2 není stabilně přítomen v organismu, ale jeho koncentrace je indukována v reakci na zánětlivé stimuly, což má za následek zvýšené uvolňování prostaglandinů a podpoření zánětlivých procesů. V klinické praxi se využívá několik inhibitorů,

kteře zmiřnřují rozvoj zánřtu, hojnř pouřzıvanř je napřıkřlad ibuprofen, kterř je inhibitorem obou variant COX nebo indometacin (Dewick 2009). Problřmem třchto neselektivnřch lřtek jsou vřak neřzřdoutı vedleřřı uřinky, zejmřna zvyřenř krvřcenı, gastrointestinřlnı problémy aj. Bohuřel i u selektivnřch COX-2 inhibitorř (tzv. coxiby), kterř byly napřıkřlad vyuřzıvanř při lřebř osteoartritidy a revmatoidnı artritidy, byly sledovřny komplikace (např. kardiovaskulřrnı potıře) (Jaismy et al. 2018). U druhé generace coxibř (etoricoxib a lumiracoxib) byly tyto vedleřřı uřinky relativnř potlačenř. I přes to dodnes neexistuje lřtka s ideřlnımi vlastnostmi (vhodnřm pomřrem terapeutickř uřinnosti a vedleřřch uřinkř) a neustřle se hledajı rřznř alternativy k břřznř vyuřzıvanřm protizřnřtlivřm lřtkřm (Dewick 2009). Jednřm z alternativnřch terapeutickřch cıľř, kterř se dnes hojnř studujı, je enzym 5-lipoxygenřza (5-LOX), kterř je zodpovřdnř za tvorbu zřnřtlivřch leukotrienř z esenciřlnřch mastnřch kyselin (Jaismy et al. 2018).

Beta-glukany mohou takř působit jako prebiotika, stimulovat tak rřst probiotickřch bakteriřlnřch kmenř v tlustřm střevř a inhibovat rřst patogennřch bakteriř. To takř hraje dřleřřitou roli pro sprřvnř fungovřnı gastrointestinřlnıho traktu a při prevenci rřznřch zřnřtř. Vzhledem k nřkolika přıznivřm uřinkřm, majı tyto lřtky velkř potenciřl pro pouřzıtı jako imunostimulanty v prevenci a lřebř nřkterřch nemocı (Ciecierska et al. 2019).

3.6 Vliv antioxidantř na lidskř zdravı

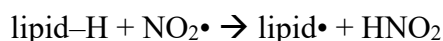
Dřıve byly antioxidanty povařzovřny spřře za lřtky konzervujıcı potraviny, pozdřji se zařalo polemizovat nad pozitivnımi uřinky na lidskř zdravı. V dneřnı době je vřnovřna zvyřenř pozornost uřinnosti antioxidantř a jejich suplementaci, ať uř třch přırozenř obsařenřch v potravinřch ři ve formř rřznřch doplřnkř stravy. Vzhledem ke schopnosti vychytřvat volnř radikřly, kterř mohou negativnř ovlivnit břřznř bunřrnř procesy a fyziologickř funkce, jsou antioxidanty řasto označovřny jako slibnř preventivnı ři terapeutickř lřtky ovlivņujıcı vznik a vřvoj nřkterřch onemocnřnı (Seifried et al. 2017). Problřmem mnohřch antioxidantř je vřak jejich jejich odliřnř chovřnı v podmınkřch *in vitro* a *in vivo* – řasto se totiř v *in vivo* podmınkřch chovajı prooxidařnř. Jednř se napřıkřlad o fenolickř sloučeniny, kterř jsou nřchylnř k oxidaci, takře se dř předpoklřdat, ře v *in vivo* podmınkřch budou generovat volnř radikřly, i přes to, ře se *in vitro* chovajı jako silnř antioxidanty (Lambert et al. 2005; Tauchen 2019). Před konzumaci potravin ři doplřnkř bohatřch na antioxidanty je proto nezbytnř, aby se jejich prokřzanř antioxidantnı aktivita *in vitro* projevovala i *in vivo* (Halliwell 2012).

V mysli veřejnosti jsou antioxidanty vnřmřny jako lřtky zdravı prospřřnř a neřkodnř, což vede k představř, ře řım vıce jich řlovřk zkonzumuje, tım lřpe (Halliwell 2012). Avřak jejich nadmřrnř spotřeba břvř řasto kontraproduktivnı a mřře vřst k rřznřm zdravotnım komplikacım. Přıkřladem mřře břt studie Klein et al. (2011), kterı prokřzali, ře existuje souvislost mezi vysokřmi dřvkřmi vitamınu E a rozvojem rakoviny prostaty. Existujı i dřkazy, ře lřtky povařzovanř za dobrř antioxidanty (např. vitamin E, C, flavonoidy aj.) i ve vřřřich dřvkřch nejsou dostateřnř uřinnř při snıřenı oxidacnıho stresu. Proto je v poslednřch letech snaha o vřvoj syntetickřch antioxidantř s prokazatelnř lepřimi vlastnostmi, kterř by mohly břt nřslednř pouřzity k lřebř nemocı zpřsobenřch oxidacnım stresem (Tauchen 2019). Nřkterı

vědci interpretují i jiné možnosti léčby chorob souvisejících s oxidačním stresem (Fernando et al. 2019). Jedná se například o použití prooxidačních látek, které by stimulovaly tvorbu endogenních antioxidantních systémů (Glorieux & Calderon 2018). Pozitivním přístupem se také jeví konzumace hub, které jsou bohaté jak na antioxidantní látky, tak na látky s protizánětlivými účinky. Již dříve bylo navrženo, že oxidační stres úzce souvisí s patogenními zánětlivými procesy. Předpokládá se, že ROS působí jako sekundární posli, které mohou dále vyvolat tvorbu prozánětlivých mediátorů (Halliwell & Gutteridge 2015). Proto vychytávání těchto volných radikálů pomocí antioxidantů by mohlo zmírnit vleklé a dlouhé záněty, které jsou pro tělo nežádoucí (Cheung 2010; Halliwell & Gutteridge 2015). Nicméně žádná studie dosud neformulovala jednoznačný závěr a pochybností, zda antioxidantní aktivita může přímo či nepřímo souviset s protizánětlivým účinkem, stále zůstává mnoho.

3.7 Oxidační stres a jeho účinky na lidské zdraví

Zjednodušeně řečeno, oxidační stres nastává při nerovnováze mezi hladinou volných radikálů a antioxidantů (Halliwell et al. 1992). Nerovnováha může být zapříčiněna nejčastěji zvýšeným výskytem reaktivních entit v tkáních a buněčných strukturách, nebo také nedostatečným množstvím antioxidantů v těle (Southorn & Powis 1988; Halliwell et al. 1992). Jedním ze spouštěčů oxidačního stresu je působení některých toxinů, produkující volné radikály či poškozující antioxidantní obranu. Takové látky můžeme rozdělit do čtyř hlavních skupin (Aust et al. 1993). První skupina zahrnuje toxiny, jež jsou samy o sobě volným radikálem – například oxid dusičitý (NO₂). Tato sloučenina je dobrým iniciátorem lipidové peroxidace:



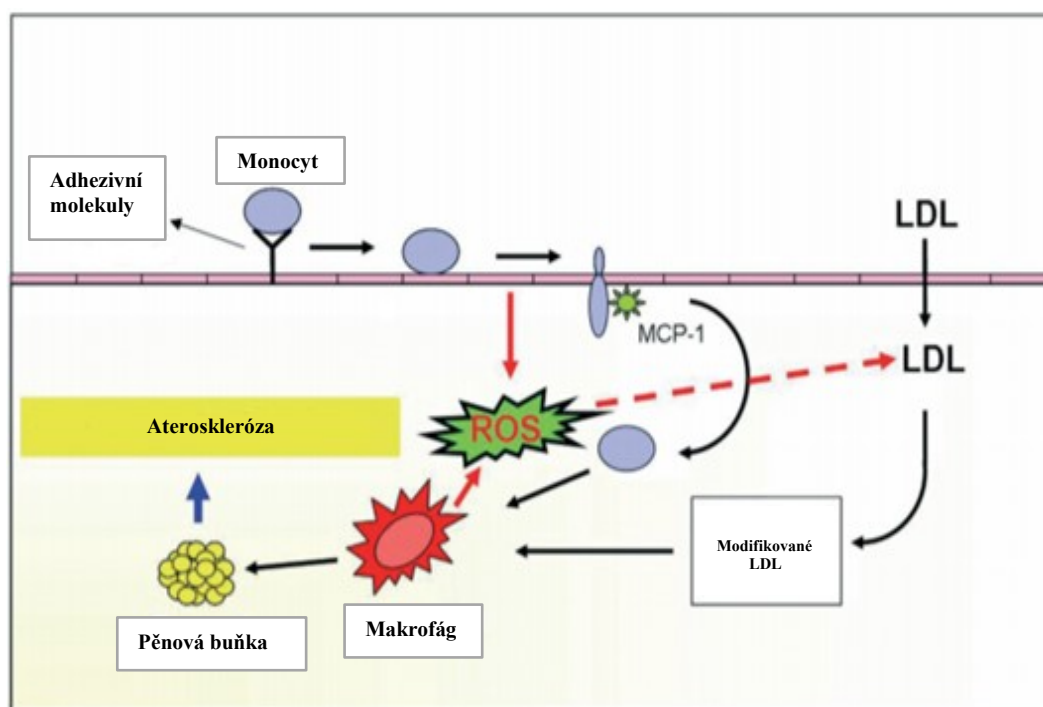
Do druhé skupiny řadíme toxiny metabolizující se na volný radikál – například tetrachlormethan, který je přeměněn na trichloromethyl pomocí cytochromu P-450. Třetí skupina je tvořena toxiny, které metabolizují tvorbu volných kyslíkových radikálů. Poslední skupinu tvoří toxiny, které vyčerpávají zásobu antioxidantů. Takovým případem je metabolismus paracetamolu jaterním cytochromem P-450. Vytvoří se produkt, který reaguje a následně odstraňuje GSH (Aust et al. 1993; Halliwell et al. 1994).

Oxidační stres je často dáván do souvislosti s procesem stárnutí a projevem několika odlišných onemocnění – mnoho studií tvrdí, že se jedná o přibližně 150 lidských chorob (Southorn & Powis 1988; Halliwell et al. 1992). Avšak realita je poněkud jiná. Vliv oxidačního stresu byl zatím prokázán u některých typů rakovin (například žaludku, prostaty, jater, vaječníku nebo prsu), dále u neurogenerativních onemocnění jako je Parkinsonova a Alzheimerova choroba, a také u chronických střevních zánětů (Crohnova choroba či ulcerózní kolitida). Na pomyslném pomezí je ateroskleróza, kde nepochybně oxidační stres má vliv, ale vědci zde mají stále jisté pochybnosti (Libby et al. 2011; Halliwell 2012, Tauchen 2019). U dalších lidských nemocí zatím není prokázáno, že by byly primárně způsobeny oxidačním stresem.

3.7.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je progresivní onemocnění postihující zejména velké a střední cévy a je charakterizované ukládáním tzv. aterosklerotických plátů do cévní stěny, čímž dochází k jejímu lokálnímu zesílení. Aterosklerotické pláty si můžeme představit jako shluky cholesterolu, lipoproteinů, leukocytů a zbytků mrtvých buněk. Pokud aterosklerotický plát praskne, na jeho povrchu se začne srážet krev a dochází k rozvoji trombů (Ross, 1993; Bonomini et al. 2008). Zvýšený výskyt těchto plátů v tepnách způsobuje klinické zúžení až uzávěr artérií a výsledkem je nedostatečný průtok krve do orgánů, zejména do srdce a mozku. Tento stav vede ke vzniku onemocnění všeobecně známých jako ischemické choroby srdeční (infarkt myokardu) a cévní mozková příhoda (Ross, 1993).

Kouření cigaret, obezita, hypertenze, diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémie, ale i věk a pohlaví, patří mezi známé rizikové faktory aterosklerózy. Tyto iniciátory jsou spojeny se zvýšenou produkcí volných kyslíkových radikálů (Antoniades et al. 2003; Bonomini et al. 2008). Reaktivní druhy kyslíku mají škodlivé účinky na cévní funkce prostřednictvím několika různých mechanismů, z nichž patrně nejvýznamnější je schopnost oxidovat lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) (Bonomini et al. 2008). Průběh oxidačního stresu při ateroskleróze je znázorněn na Obrázku 2.



Obr. 2 Oxidační stres při ateroskleróze (převzato podle Bonomini et al. 2008).

Monocyty patří mezi zánětlivé typy buněk aterosklerotických cév. Do vnitřního prostoru cévy pronikají za pomoci adhezních molekul a MCP-1. Jejich migrace je stimulována prostřednictvím oxidovaných LDL. V subendoteliálním prostoru jsou monocyty diferencovány v makrofágy. Makrofágy pohlcují oxidované LDL a při dostatečném nasycení se mění na tzv. pěnové buňky, které jsou součástí aterosklerotických plátů (Bonomini et al. 2008).

V posledních několika letech se mnoho klinických studií věnuje použití vhodných antioxidantů k prevenci, případně k léčbě aterosklerózy. Existuje velké množství farmaceutických antioxidantů využívaných v klinické praxi – mezi nejstudovanější antioxidanty, aplikovaných do léčby kardiovaskulárních onemocnění, patří vitamín C a E. Observační studie naznačují, že oba vitamíny by mohly obnovit endoteliální funkci a mít protizánětlivý a protitrombotický účinek. Avšak počáteční pozitivní zprávy z těchto studií nebyly potvrzeny rozsáhlejšími randomizovanými zkouškami (Antoniades et al. 2003). Výsledky vědeckých studií zabývající se aterosklerózou prokázaly, že oxidační stres má vliv na patogenezi tohoto onemocnění – respektive dochází při něm k oxidačnímu poškození lipidů (Steinberg 2002; Antoniades et al. 2003; Bonomini et al. 2008). Avšak jestli má tento jev výrazný vliv na lidské zdraví, případně na rozvoj nemoci, zatím není jasné.

3.7.2 Cystická fibróza

Jedná se o autozomálně recesivní genetické onemocnění postihující zejména dýchací cesty a plíce. Tato choroba je způsobena abnormalitou proteinu CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který je kódován genem uloženým na dlouhém raménku chromozomu 7. Defektem tohoto genu dochází k poškození transportu chloridových iontů přes epitely buněk. Následkem toho dochází k nerovnoměrné distribuci vody a elektrolytů nejen do dýchacích cest, ale také do jater, pankreatu, žlučových, gastrointestinálního traktu či do kůže (Collins et al. 2016). Dysfunkce CFTR je také spojena se změnou sekrece tekutin a elektrolytů a jejich zvýšenou viskozitou (Rowntree & Harris 2003).

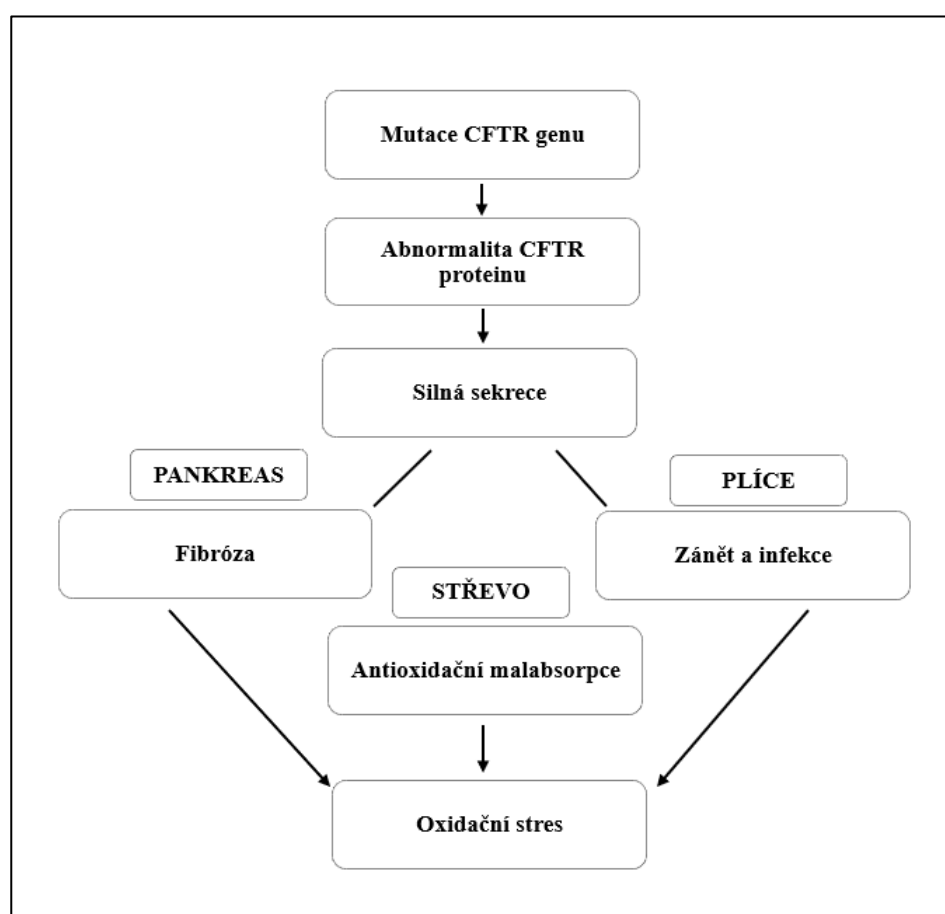
Oxidační stres u pacientů s cystickou fibrózou je dokumentován již několik let, avšak význam oxidačního poškození je stále nejistý (Van Der Vliet et al. 1996; Ziady & Hansen 2014). Zdá se, že přítomnost defektního CFTR vyvolává redoxní nerovnováhu v epiteliálních buňkách a extracelulárních tekutinách, čímž způsobuje abnormální tvoření reaktivních druhů kyslíku, což dále vede k rozvoji systémového oxidačního stresu (Galli et al. 2012). Antioxidační stav je tedy narušen dysfunkcí CFTR, kdy dochází ke změně transportu glutathionu (GSH) přes membrány epiteliálních buněk (Gao et al. 1999). Na rozdíl od jiných genetických chorob porušující glutathionový systém, u cystické fibrózy není pozorováno poškození redoxních, transferázových a recyklačních systémů. Snížení obsahu GSH v plicích tedy může být způsobeno jak abnormálním transportem CFTR, tak zesílením zánětlivých procesů, které se v průběhu nemoci projevují (Hudson 2001; Ntimbane et al. 2009).

S ohledem na tyto uvedené aspekty se předpokládá, že lidé trpící cystickou fibrózou mají vyšší potřebu antioxidační ochrany. Zvýšená potřeba antioxidantů je klíčová zejména v přítomnosti obtíží slinivky břišní, jater či plicních komplikací. Plicní komorbidita je v tomto kontextu obzvláště důležitá, protože je spojena s opakujícími se periodami, kdy se střídají infekce s chronickými záněty. Ty udržují ROS v dýchacích cestách, dále napomáhají tvorbě vedlejších produktů druhé generace poškozením biomolekul, které se mohou šířit také na systémové úrovni, aby poté podporovaly nepříznivé či toxické biologické reakce (Galli et al. 2012).

Pankreatická insuficience způsobuje podvýživu, což může vést k rozvoji endokrinních či metabolických poruch. Tyto události mohou být dále zhoršeny souběžnou dysfunkcí jater

a špatným nutričním stavem (Munck 2010). Péče o správný nutriční stav u pacientů trpících cystickou fibrózou, vede k lepším klinickým výsledkům, a může tak zajistit vyšší možnost dosažení antioxidantní ochrany. Přestože podání antioxidantů zjevně nemoc nevyléčí, může to přinést i jisté výhody, avšak je zapotřebí tento předpoklad podpořit dalšími klinickými výzkumy (Back et al. 2004; Galli et al. 2012). Co je nezpochybnitelné je každodenní potřeba vysokého příjmu energie, dále suplementace vitaminů rozpustných v tucích a v neposlední řadě také substituční terapie pankreatickými enzymy (Galli et al. 2012).

U pacientů s cystickou fibrózou je malnutrice, infekce a zánět – s tím související i zvýšený energetický výdej, hlavními příčinami oslabeného antioxidantního stavu a zvýšeného oxidačního stresu (Ntimbane et al. 2009). Z dosud publikovaných studií prozatím nevyplývá, že by toto onemocnění tedy bylo primárně způsobeno oxidačním stresem. Možné souvislosti mezi dysfunkcí CFTR a oxidačním stresem jsou schématicky znázorněny na Obrázku 3.



Obr. 3 Možné souvislosti mezi dysfunkcí CFTR a oxidačním stresem (vytvořeno podle Ntimbane et al. 2009).

3.7.3 Rakovina

Nádorová onemocnění jsou skupinou chorob charakterizované masivním růstem určité populace buněk v lidském těle. Nádor může být definován jako abnormální množství tkáně s vysokou rychlostí růstu a nekoordinovanou komunikací s ostatními buňkami v organismu. Nejčastěji jsou nádory klasifikovány dle míry růstu – na benigní (nezhoubné) a maligní

(zhoubné). Benigní tumory se podobají původní tkáni, zůstávají v místě vzniku a později se obvykle uzavřou vrstvou vláknitého materiálu tvořeného okolní tkání. Oproti tomu maligní nádory působí fatální následky. Mají schopnost cestovat z místa původu krevním řečištěm a lymfatickým systémem za vzniku sekundárních nádorů – tzv. metastáz. Rychlost růstu a metastázy souvisí s typem nádoru – u rakoviny kůže metastázy pozorujeme spíše zřídka, na rozdíl od melanomu, u kterého je výskyt metastáz velmi častý (Poste & Fidler 1980).

Vývoj rakoviny u lidí je komplexní proces zahrnující změny na buněčné a molekulární úrovni, které jsou zprostředkované různými endogenními a exogenními stimuly. Složitý proces přeměny normální buňky do maligního stavu (tzv. karcinogeneze) je iniciován hlavně změnou DNA (Valko et al. 2004; Pham-Huy et al. 2008). Modifikovaná DNA je poté úspěšně replikována a následná buněčná proliferace umožní začlenění mutace do DNA budoucích buněk. Karcinogeneze je zapříčiněna genetickou predispozicí, genovými defekty (onkogeny, tumor-supresorové geny aj.), ale také faktory prostředí. Na rozdíl od jiných nemocí, jako je například výše zmíněná cystická fibróza, kde mutace v jednom genu může způsobit onemocnění, u rakoviny defekt jednoho genu nevyvolá toto onemocnění (Vogelstein et al. 2004).

Již dříve bylo naznačeno, že oxidační stres a reaktivní částice jsou úzce spjaté s karcinogenezí. Reaktivní entity mohou být zapojeny do karcinogeneze prostřednictvím dvou základních mechanismů:

- 1) indukce genových mutací, které jsou výsledkem poškození buněk,
- 2) účinek na signální transdukcí a transkripční faktory (Noda & Wakasugi 2001).

Jelikož je známo, že některé kovy (železo či měď) podporují oxidační stres, nabízí se tento model využít pro studium úlohy oxidačního poškození v karcinogenezi (Chen et al. 2000; Noda & Wakasugi 2001). Chen et al. (2000) pozorovali, co se přihodí po podání železa potkanům, kteří trpí postižením podobnému gastroezofageálnímu refluxu u lidí. Svou studií zjistili, že dochází k depozici tohoto kovu v jícnu, dále k oxidaci DNA a lipidů, a také k rozvoji adenokarcinomu jícnu (Chen et al. 2000). Objevila se také idea, že zhoubné nádory jsou samy schopné produkovat ROS, což by mohlo přispět k dalšímu rozvoji sekundárních nádorů (Arbiser et al. 2002).

Obecně pro léčbu rakoviny platí, že podáním chemoterapeutik či využitím radioterapie, se vytváří v těle stav oxidačního stresu. Ačkoliv jsou chemoterapeutika navržena tak, aby co nejméně poškozovala normální buňky, mají i tak značné vedlejší účinky (například bleomycin) (Chen & Stubbe 2005). Kromě toho patogenita některých nádorů je ještě podtržena skutečností, že určité typy rakovinných buněčných linií mají resistenci, ať už vlastní či získanou, k běžně používaným protirakovinným látkám (například rezistence na methotrexát při rakovině prsu) (Lindgren et al. 2006).

3.7.4 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je chronické onemocnění vyznačující se zvýšenou hladinou glukózy v krvi (hyperglykémie) a moči. Vzniká v důsledku nedostatečné produkce inzulínu β -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu (typ 1) nebo rezistencí cílových buněk na inzulín (typ 2).

Nedostatek inzulínu nebo rezistence na inzulín v těle vede ke snížení absorpce glukózy ve tkáních, což má za následek intracelulární hypoglykémii a extracelulární hyperglykémii. Intracelulární hypoglykémie stimuluje glykogenolýzu a glukoneogenezi, která vede k rozkladu tuků (způsobuje diabetickou ketoacidózu), zatímco extracelulární hyperglykémie způsobuje hyperglykemické kóma a osmotickou diurézu (Ozougwu et al. 2013). První typ diabetu se objevuje spíše v dětském věku nebo v průběhu dospívání a předpokládá se, že spouštěčem je genetická predispozice k této nemoci. Zatímco diabetes mellitus druhého typu je nejčastěji pozorován u dospělých a je spojen zejména s obezitou, nedostatkem pohybu a nesprávnou výživou (Halliwell & Gutteridge 2015).

Existují protichůdné důkazy, zda oxidační stres zásadně ovlivňuje tuto nemoc. Na jedné straně se většina studií přiklání k faktu, že oxidační stres hraje roli ve vývoji komplikací této nemoci, zejména u diabetu 2. typu (Pham-Huy et al. 2008; Asmat et al. 2016). Například Maritim et al. (2003) ve své studii uvádí, že tvorba volných radikálů neenzymatickou glykací proteinů, oxidací glukózy a zvýšenou peroxidací lipidů, vede k poškození enzymů, a také k zesílení rezistence tkání na inzulín v důsledku oxidačního stresu. Vyšší hladiny ROS u diabetu mohou být také způsobeny destrukcí antioxidantních systémů – katalázy, superoxid dismutázy a glutathion peroxidázy. Střídáním hladin těchto enzymů je způsobena vyšší citlivost tkání k oxidačnímu stresu, což může vést k rozvoji diabetických obtíží (Lipinski 2001). Komplikace vyvolané volnými radikály a oxidačním stresem se mohou projevat jako neuropatie, nefropatie či retinopatie (Phillips et al. 2004; Asmat et al. 2016). Na druhé straně existují náznaky, že podávání antioxidantů paradoxně může vést k metabolickým dysfunkcím a predispozicím k diabetu (Halliwell 2012).

3.7.5 Chronické střevní záněty

Mezi chronické střevní záněty kategorizujeme Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. V případě Crohnovy choroby může být postižen jakýkoliv oddíl gastrointestinálního traktu, nejčastěji to však bývá zasažení tlustého a tenkého střeva. Jedná se o segmentální postižení, tzn. že se střídá úsek zdravé a nemocné tkáně. Ulcerózní kolitida je charakterizována kontinuálním postižením a postihuje pouze tlusté střevo a konečník.

Ačkoliv patofyziologie těchto onemocnění není s jistotou určena a je velmi diskutována, mnoho dostupných experimentálních a klinických údajů ukazuje na fakt, že kromě genetické predispozice, environmentálních faktorů aj., může být chronický střevní zánět důsledkem neregulované imunitní odpovědi na přirozené bakteriální antigeny (Pavlick et al. 2002). Tato nekontrolovaná aktivace imunitního systému poté vede k nadprodukci reaktivních druhů kyslíku a dusíku. Testováním na myších modelech několik studií také naznačuje, že k rozvoji chronických střevních zánětů může přispět oxidační stres společně s progresí rakoviny (reaktivní druhy jsou zprostředkované poškozením DNA) (D'Inca et al. 2004). Jiné studie však přinášejí protichůdné výsledky, které dokonce ukazují, že by reaktivní druhy mohly mít prospěšný účinek (Pavlick et al. 2002). Většina se ale stále přiklání k faktu, že se reaktivní druhy podílejí na poškození tkáně u chronických střevních onemocnění.

Hlavní ideologie léčby chronických střevních zánětů se zaměřuje zejména na snížení zánětu a okamžité zmírnění symptomů. V tradičních terapeutických přístupech se podávají

protizánětlivá činidla (např. sulfasalazin), která však obvykle mívají silné vedlejší účinky – anémii, přecitlivělost, v krajním případě i nesnášenlivost dalších léků. Alternativní možností proto může být použití imunitních modulátorů, jako jsou cyklosporiny a thiopuriny (Piechota-Polanczyk & Fichna 2014; Tian et al. 2017). Avšak i tyto látky mohou mít cytotoxické účinky, které mohou zhoršovat průběh jiných nemocí či infekcí. S rostoucí incidencí a závažností chronických střevních onemocnění se proto zvyšují požadavky na revoluční léčebné metody. Z nekonvenčních terapeutických přístupů přitahují pozornost doplňkové nebo alternativní léky na bázi inhibitorů tvorby reaktivních druhů, dále přírodní či syntetické látky, které inhibují buněčnou smrt a aktivují antioxidantní enzymy (Yanai et al. 2016; Tian et al. 2017). K potvrzení přesných účinků, vhodných dávek a způsobů podávání těchto slibných léčiv jsou však zapotřebí další detailní studie.

3.7.6 Neurogenerativní onemocnění

3.7.6.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je multifaktoriální neurogenerativní porucha postihující zejména starší osoby. Je charakterizována selektivní ztrátou neuronů, senilními plakami tvořené depozity β -amyloidu, a také neurofibrilární spleť, která vznikla intracelulární agregací hyperfosforylovaného tau proteinu (Hardy & Higgins 1992). Vyznačuje se celou řadou příznaků, jako je ztráta paměti, pokles kognitivních funkcí, abnormální chování a psychické problémy. Obecně se předpokládá, že genetika hraje v progresi Alzheimerovy choroby důležitou roli, avšak vývoj této choroby ovlivňují i další faktory, včetně nesprávné výživy (nízký příjem vitaminů B₆, B₉ a B₁₂), vysoký obsah cholesterolu a homocysteinu v krvi, a také nízká intelektuální aktivita (Ravaglia et al. 2005).

Jak už bylo zmíněno výše, Alzheimerova choroba se vyznačuje přítomností tzv. senilních plaků. Jsou to extracelulární oblasti degenerujících a často oteklých axonů vzniklé depozicí β -amyloidu – toxického peptidu. Senilní plakky se do jisté míry nacházejí i v normálně stárnoucím mozku, avšak v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou jsou hladiny β -amyloidu pětikrát až stokrát vyšší (Piccini et al. 2005). Takzvaná amyloidní hypotéza, která byla formulovaná před více než 25 lety, považuje β -amyloid za hlavní spouštěcí faktor Alzheimerovy choroby. S rozsáhlejším výzkumem však byla vytvořena doplňková hypotéza, tzv. alternativní, která tvrdí, že β -amyloid je ve skutečnosti spíše sekundární příčinou nemoci (Pimplikar 2009). Obě hypotézy se nicméně shodují v tom, že β -amyloid je spojen s tvorbou reaktivních druhů kyslíku. Různé markery oxidačního stresu v postižených mozcích pacientů dokazují, že oxidační stres způsobuje mitochondriální dysfunkci, která vede k neurotoxické a poškození neuronálních synapsí (Devi & Anandatheerthavarada 2010). Další případ oxidačního poškození dokazující patologii této choroby je oxidační stres vyvolaný přechodnými kovy – redoxně aktivním železem a mědí a redoxně neaktivním zinkem (Valko et al. 2016). Pomocí speciálních fyzikálních technik byla odhalena zvýšená koncentrace těchto tří prvků v amyloidních placích. Bez ohledu na přesný multifaktoriální původ Alzheimerovy choroby, tyto údaje podporují hypotézu, že i kovem indukovaný oxidační stres hraje důležitou roli v patologii onemocnění (Butterfield & Halliwell 2019).

3.7.6.2 Parkinsonova choroba

Jedná se o progresivní neurogenerativní onemocnění, které je charakterizováno degenerativními změnami buněk *substantia nigra* obsahujících melanin. Úbytkem těchto nervových buněk je porušena produkce dopaminu, který je důležitý pro správnou funkci motorického systému. Projevuje se rytmickým třesem rukou či nohou a s vývojem nemoci dochází k rostoucím problémům s kontrolou pohybu. Zahájení pohybu je velmi obtížné (tzv. akineze), pohyb je pomalý (tzv. bradykineze) a třes je stále výraznější (Moore et al. 2005). Stejně jako jiné melaniny je i neuromelanin redoxně aktivní a je schopen chelatace kovových iontů. Kromě toho je Parkinsonova choroba spojena s výskytem tzv. Lewyho tělísek, což jsou útvary v neuronech tvořené amorfni bílkovinou hmotou, konkrétně se jedná o α -synuclein, ubiquitin a neurofilamenta. Všechny tyto proteiny jsou náchylné k oxidaci a nitraci (Ischiropoulos et al. 2003).

Téměř většina případů Parkinsonovy choroby je ojedinělá – objevují se bez zjevného genetického původu. Nicméně jsou známy vzácné případy, kdy se tato choroba prostřednictvím genů objevila také u mladistvých a u dospělých středního věku (Houlden & Singleton, 2012). Dodnes není možné stanovit, které faktory spouštějí tyto sporadické formy Parkinsonovy choroby, ale předpokládá se, že důležitou roli by mohly hrát toxiny. Jedná se například o 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), 2,5-hexandion, dále deguelin, rotenon a annonacin (Pezzoli et al. 1995; Przedborski et al. 2001; Caboni et al. 2004; Potts et al. 2012). Tyto sloučeniny jsou považovány za významné inhibitory mitochondriálního komplexu I, což má za následek generování oxidačního stresu. Potenciální neurotoxické účinky *in vivo* mají také oxidované metabolity dopaminu monoaminoxidázou (MAO) či reaktivní druhy kyslíku vzniklé autooxidací dopaminu (Hald & Lotharius 2005).

3.7.6.3 Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je progresivní, neurogenerativní choroba, způsobená degenerací motorických neuronů mozku a míchy. ALS začíná jako bezbolestná svalová slabost, později se zhoršuje svalový tonus, což vede k atrofii. V pokročilejším stádiu následují problémy s řečí a polykáním. Průměrný věk nástupu této nemoci je 57 let a její progrese je velmi rychlá. Často vede ke smrti během několika let, obvykle pacienti umírají na sekundární pneumonii či respirační selhání (Dib 2003). Nejčastější verzí (přibližně 90 %) amyotrofické laterální sklerózy je forma sporadická a přibližně 10 % případů tvoří genetické predispozice k nemoci. Bylo prokázáno, že u ALS dochází ke zvýšenému oxidačnímu stresu (vyšší hladiny produktů oxidace DNA, mutace v genu kódující SOD, aj.), ale jeho význam v patologii tohoto onemocnění je stále nejasný (Wang et al. 2019).

3.7.7 Choroby očí

Ačkoliv šedý zákal a makulární degenerace, tj. postižení, které jsou hlavními příčinami slepoty, souvisí s věkem, způsob jejich vzniku není zcela jasný. Předpokládá se, že tato onemocnění by mohla být důsledkem poškození, ať už fotochemicky či nefotochemicky,

různých typů buněk v oku oxidačním stresem (Santosa 2005). Protože se ochranné vláknové buňky oka samy neobnovují, je čočka nejcitlivější na oxidativní poškození. Působením volných radikálů se krystalické proteiny obsažené v čočce mohou zesítovat a agregovat, což vede k tvorbě šedého zákalu. Také sítnice, která pojímá mnoho kyslíku, je náchylná k oxidačnímu poškození. Dlouhodobá expozice zářením může poškodit vnější segmenty fotoreceptorů, inhibovat mitózu v retinálním pigmentovém epitelu, a také byla spojena s peroxidací lipidů (Beatty et al. 2000; Santosa 2005). Existuje ovšem stále málo důkazů, které by potvrdily, že oxidační stres hraje klíčovou roli v rozvoji očních chorob, proto se předpokládá, že zřejmě není primárním spouštěčem.

3.7.8 Ischemická onemocnění

Ischemická onemocnění jsou souborem chorobných stavů, jejichž společným znakem je ischemie neboli krevní nedostatečnost. Jelikož je omezen transport krve ke tkáním a orgánům, dochází k jejich poškození, v krajním případě až k odumření.

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je považována za jeden z nejběžnějších typů kardiovaskulárních chorob. Téměř vždy je hlavní příčinou koronární ateroskleróza – dochází k ukládání aterosklerotických plátů do koronárních tepen, tím je porušen přísun kyslíku a živin a srdeční svalovina ztrácí svou funkci a vitalitu (Bandyopadhyay et al. 2004). V klinické praxi se k obnově dodávky krve do srdce nejčastěji používají trombolytické látky nebo je provedena reperfuze. Ačkoliv je známo, že reperfuze snižuje možnost infarktu a celkovou úmrtnost (Bandyopadhyay et al. 2004), je také dokázáno, že pozdní opětovné zavedení okysličené krve paradoxně může vést k tzv. ischemicko-reperfuznímu poškození. Z dlouhodobého hlediska je sice srdeční tkáň zachráněna, avšak z krátkodobého pohledu dochází k buněčné dysfunkci a buněčné nekróze (Bartekova et al. 2016; Chakraborti et al. 2019). Předpokládá se, že oxidační stres hraje důležitou roli v genezi rizikových kardiovaskulárních faktorů (např. ateroskleróza, hypertenze, trombóza), které přispívají k výskytu ICHS, a také se jeví jako důležitý faktor v rozvoji ischemicko-reperfuzního poškození (Chakraborti et al. 2019). Dochází totiž k interakci několika typů buněk, včetně koronárních endoteliálních buněk, leukocytů, krevních destiček a srdečních myocytů, přičemž většina těchto buněk je schopna vytvářet reaktivní druhy kyslíku (Bandyopadhyay et al. 2004). Oxidační stres tudíž vede ke změnám membránové permeability v srdečních buňkách a dysfunkci intracelulárních i extracelulárních proteinů (Chakraborti et al. 2019).

Dalším častým ischemickým onemocněním je cévní mozková příhoda (CMS). Obecně rozeznáváme dva druhy cévní mozkové příhody – ischemickou a hemorhagickou. Ischemická je nejčastěji způsobena uzavřením mozkové nebo krční tepny krevní sraženinou, čímž dochází k poškození určité oblasti mozku způsobené nedostatečným příjmem kyslíku a glukózy, které jsou nezbytné pro fungování buněk. U hemorhagické cévní mozkové příhody dochází k prasknutí krevní cévy, po kterém se hromadí krev v mozku (Woodruff et al. 2011). Ačkoliv mají oba typy cévních mozkových příhod odlišné rizikové faktory a patofyziologické mechanismy, jeden jev je společný, a tím je zvýšená produkce reaktivních druhů, což vede k oxidačnímu stresu, který pravděpodobně sekundárně přispívá k poškození mozku (Cherubini et al. 2005). Oxidační poškození DNA je jedním z neškodlivějších důsledků

zvýšeného oxidačního stresu při mozkové příhodě (Li et al. 2011). Pokud nedojde k včasnému zapojení reparačních mechanismů, poškozením DNA se spustí mnoho signálních drah indukující buněčnou apoptózu, což může ve výsledku ohrozit funkční zotavení po mrtvici (Li et al. 2011; Li et al. 2018). Nejnovější studie proto zaměřují svůj výzkum zejména na endogenní reparační mechanismy oxidované DNA, které by při správném fungování mohly urychlit neurologické uzdravení (Li et al. 2018).

3.8 Metody pro stanovení antioxidačních vlastností

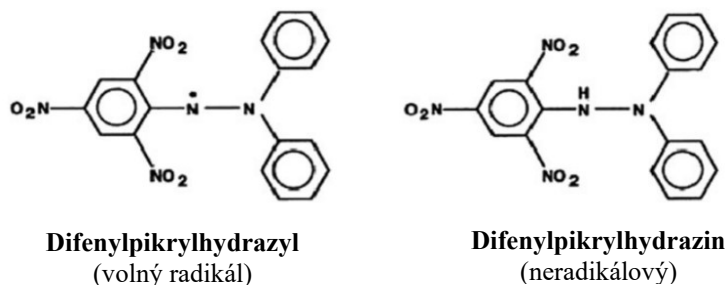
Stanovení antioxidační aktivity u látek se nejčastěji provádí metodami *in vitro*. Jedná se zejména o metodu ORAC, dále metody inhibující radikál DPPH aj. V posledních letech se však začínají využívat i metody *in vivo*, konkrétně postupy založené na buněčných kulturách, které charakterizují vztah mezi volným radikálem a antioxidantem. Avšak oba využívané přístupy jsou značně limitovány protichůdnými výsledky – materiál vykazující silný antioxidační potenciál *in vitro*, nemusí vždy vykazovat také *in vivo* a naopak. Nejprůkaznějších výsledků dosahujeme v modelech *in vivo*, například při stanovení stupně oxidačního stresu pomocí biologických markerů, kdy měříme hladinu isoprostanů (biologický marker peroxidace lipidů) nebo 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (produkt oxidace DNA). Nicméně správná interpretace získaných dat je i tak zpravidla velmi obtížná. Zároveň je nutné brát v úvahu fakt, že jedinci, kteří netrpí žádnou chorobou, mohou mít odlišné hladiny biomarkerů, což je zřejmé dáno i geneticky. Výrazný postup vpřed představuje vývoj lepších sond k měření volných radikálů v buňkách a malých organismech. Tyto sondy jsou založené například k detekci peroxidu pomocí kyseliny boronové. Ovšem i zde mohou být výsledky částečně zpochybnitelné či zavádějící, protože kyselina boronová nereaguje pouze s peroxidem, ale i s jinými činidly. Dalším využívaným postupem pro stanovení míry oxidačního stresu je metoda DCFH, která je založená na diacetátu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceinu. Tato látka za přítomnosti volných radikálů degraduje na fluorescentní dichlorofluorescein (DCF). Nicméně i tato technika má některá omezení a její výsledky jsou nejednoznačné (Tauchen 2019).

In vitro metody pro stanovení antioxidačního potenciálu můžeme obecně rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinou jsou metody posuzující redoxní vlastnosti látek, které dále dělíme na metody elektrochemické a chemické (např. FRAP). Druhou kategorií tvoří metody hodnotící schopnost vychytávat volné radikály – jedná se o techniky hodnotící eliminaci syntetických radikálů (např. DPPH), kyslíkových radikálů (např. ORAC) nebo metody hodnotící schopnost eliminovat lipidovou peroxidaci (Antolovich et al. 2002; Alam et al. 2013).

3.8.1 Metoda DPPH

Molekula 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) je charakterizována jako stabilní volný radikál tmavé purpurové barvy s hydrofobním charakterem, proto se vždy používá v kombinaci s nepolárními rozpouštědly. Reakcí s jinými radikály, atomy vodíku či elektrony, roztok ztrácí fialové zbarvení, protože dochází k přechodu radikálové formy DPPH na neradikálovou (Obrázek 4). Aby se vyhodnotil antioxidační potenciál testovaných vzorků, sleduje se změna

optické hustoty radikálů DPPH (Kedare & Singh 2011; Alam et al. 2013). Antioxidanty totiž snižují koncentraci stabilního radikálu DPPH za vzniku žlutého difenylpikrylhydrazinu. Tato redukce DPPH je následována poklesem absorbance při charakteristické vlnové délce reakce (obvykle 517 nm) (Alam et al. 2013).



Obr. 4 Struktura volného radikálu DPPH a jeho rekombinace antioxidantem za vzniku difenylpikrylhydrazinu (podle Kedare & Singh 2011).

Výhodou této metody je její rychlost, jednoduchost a příznivá cena, díky čemuž se stala velmi populární a často využívanou. Nedostatkem této metody může být například komplikovaná interpretace výsledků, kdy testované sloučeniny mohou mít podobná spektra, která se budou překrývat se spektrem DPPH (Kedare & Singh 2011). V neprospěch této metody hraje i malá podobnost DPPH radikálů s peroxylovými radikály, které jsou zapojené do peroxidace lipidů (MacDonald-Wicks et al. 2006). Důsledkem toho je, že mnoho antioxidantů, které rychle reagují s peroxylovými radikály budou pomalu reagovat či budou zcela inertní vůči DPPH (Prior et al. 2005; MacDonald-Wicks et al. 2006).

3.8.2 Metoda ORAC

Metoda absorpční kapacity kyslíkových radikálů (Oxygen Radical Absorbance Capacity) je založena na generování volných radikálů za použití iniciátorů a stanovuje se schopnost sledované látky zpomalit nebo zcela zastavit radikálovou reakci (MacDonald-Wicks et al. 2006). Nejčastějším iniciátorem tvorby peroxylových radikálů je 2,2-azobis-2-amidopropan-dihydrochlorid (AAPH), pro generaci hydroxylových radikálů se používá systém $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$. Vzniklé radikály poté reagují s fluorescenční sondou a následně se měří pokles fluorescence v přítomnosti volných radikálů (Ou et al. 2001; Alam et al. 2013). Původní ORAC metoda využívá jako sondu β -fykoerythrin (ORAC_{PE}), má široké možnosti použití a poskytuje důležité informace o antioxidační aktivitě vzorků různého typu. Avšak při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů byla objevena určitá omezení této fluorescenční sondy, zejména se jedná o její špatnou fotostabilitu. Proto se pro zpřesnění této metody začala využívat jiná sonda – fluorescein (ORAC_{FL}). Fluorescein je malá organická molekula s jednoduchou strukturou, která je ve srovnání s β -fykoerythrinem velmi fotostabilní, a kromě toho je cenově příznivá (Ou et al. 2001). Na druhou stranu je fluorescein citlivý na změny pH, proto je zapotřebí tento parametr pečlivě sledovat (MacDonald-Wicks et al. 2006).

4 Materiál a metody

Studie probíhala za účelem vytipování vhodného druhu hub pro následný výzkum a vývoj funkčních potravin na základě získaných výsledků z *in vitro* metod založených na inhibici/vychytávání volných radikálů s různým stupněm biologické relevance – konkrétně 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) a oxygen radical absorbance capacity (ORAC), a také protizánětlivé aktivity založené na inhibici enzymu cyklooxygenázy 1 a 2. Studovaný materiál byl rovněž podroben analýze pomocí LC-MS a GC-MS technik za účelem identifikace látek, které by mohly být zodpovědné za výše uvedené biologické aktivity.

4.1 Houbový materiál

K testování bylo použito 6 vzorků hub. Jedná se o čtyři kmeny Hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) a druhy *Pleurotus pulmonarius* a *Pleurotus flabellatus*. Seznam testovaných vzorků a specifikace jednotlivých kmenů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1 Seznam testovaných vzorků

DRUH	SPECIFICKÝ KMEN
<i>Pleurotus ostreatus</i>	opuntiae
<i>Pleurotus ostreatus</i>	ivory
<i>Pleurotus ostreatus</i>	5175
<i>Pleurotus ostreatus</i>	X
<i>Pleurotus flabellatus</i>	-
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	-

4.2 Chemikálie a reagenty

Rozpouštědla o analytické kvalitě (methanol, ethanol, chloroform, hexan, diethylether, dimethylsulfoxid), 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH), 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylový radikál (DPPH), fluorescein, Trolox, hematin, L-epinefrin, Na₂EDTA dihydrát, arachidonová kyselina, kyselina mravenčí formiát, enzymy COX-1 a COX-2 a ibuprofen byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Kit na protizánětlivou aktivitu (Prostaglandin E2 Enzyme Immunoassay Kit) byl zakoupen od Assay Designs (Praha, Česká republika). Anorganické soli, kyseliny a další reagenty (K₂HPO₄, KH₂PO₄, Tris, HCl) byly zakoupeny od PENTA-chemical (Praha, Česká republika) či Lach-ner (Neratovice, Česká republika).

4.3 Příprava vzorků

Houbový materiál byl nejprve lyofilizován po dobu 72 hodin. Vzorky po lyofilizaci byly následně homogenizovány laboratorním mlýnkem na jemný prášek. Poté byl odebrán 1 g z každého vzorku a extrahován. Extrakce proběhla u každého vzorku jiným způsobem:

- a) 80% methanolem (MeOH; 12 ml),
- b) chloroformem (TCM; 10 ml),
- c) hexan:diethyletherem (Hex:Et₂O; 4:1; v/v; 10 ml).

V případě nepolárních extraktů bylo nutné ještě přidat 0,5 ml destilované vody. Extrahované vzorky byly odpařeny pomocí vakuové odparky při 40 °C (Büchi, Švýcarsko) a následně k nim bylo přidáno stejné množství původního rozpouštědla. Z těchto konečných extraktů byl odebrán 1 ml, který byl použit na instrumentální analýzy. Dále byly vzorky opět odpařeny za stejných podmínek a podle hmotnosti byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). V případě extraktů 80% methanolem byla požadovaná koncentrace 20,48 mg/ml, u ostatních extraktů se jednalo o koncentraci 2,048 mg/ml. Methanolvé extrakty byly použity na stanovení antioxidační a protizánětlivé aktivity, a také pro analýzu obsahových látek polárnějšího charakteru (využití kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem; LC-MS). Naopak hexan:diethyletherové extrakty se použily pro analýzu látek nepolární povahy (využití plynové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem; GC-MS). Nepolární extrakty byly také testovány na protizánětlivou aktivitu.

4.4 *In vitro* stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita 80% methanolvých extraktů byla stanovena pomocí dvou *in vitro* metod. Jednalo se o metodu založenou na inhibici radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH), jejíž princip je popsán v kapitole 3.8.1 a metodu Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), která je popsána v kapitole 3.8.2.

4.4.1 DPPH

K vyhodnocení schopnosti vzorků inhibovat radikál DPPH byla použita mírně modifikovaná metoda dle Sharma & Bhat (2009). Koncentrace a objemy vzorků, standardů a reagentů byly upraveny tak, aby byly použitelné ve formátu mikrodestičky. Dvojnásobné sériové ředění každého vzorku, v konečném koncentračním rozmezí: 1,25–5120 µg/ml, bylo připraveno v methanolu (175 µl) na 96-jamkových mikrotitračních destičkách. Následně bylo do každé jamky přidáno 25 µl čerstvě připraveného 1 mM DPPH v methanolu, aby se zahájila antioxidační reakce. Směs byla udržována ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Absorbance byla měřena při 517 nm pomocí čtečky Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Trolox (v koncentracích 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 254 a 512 µg/ml) byl použit jako standard a methanol jako slepý pokus. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty Troloxu (µg TE/mg extraktu).

4.4.2 ORAC

Do vnějších jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 200 μ l destilované vody. Zásobní roztoky radikálu AAPH (153 mM) a fluoresceinu (480 μ M) byly připraveny ve fosfátovém pufru (75 nM, pH 7). Poté bylo 25 μ l každého vzorku, v konečném koncentračním rozmezí 6,4–32 μ g/ml, zředěno ve 150 μ l fluoresceinu (48 nM) a inkubováno při 37 °C po dobu 10 minut. Reakce byla následně zahájena přidáním 25 μ l AAPH. Jako standard byl použit Trolox a kalibrační řada byla vytvořena v pěti koncentračních úrovních – 64, 32, 16, 8 a 4 μ g/ml. Fosfátový pufr (75 nM) byl použit jako slepý pokus. Změny fluorescence byly měřeny v 1minutových intervalech po dobu 120 minut za použití čtečky Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Čtení probíhalo při 519 nm.

4.5 *In vitro* stanovení protizánětlivé aktivity

Protizánětlivá aktivita testovaná u všech extraktů (80% methanolových, chloroformových a hexan:diethyletherových) byla stanovena enzymatickým *in vitro* testem za pomoci komerčního kitu (Prostaglandin E2 Enzyme Immunoassay Kit; Assay Designs; USA). Test je založen na inhibici enzymů cyklooxygenázy 1 a 2 (COX-1, COX-2). Za přítomnosti kofaktorů tyto enzymy vytváří z arachidonové kyseliny prozánětlivý mediátor prostaglandin E2. Tato reakce neproběhne v přítomnosti inhibitorů těchto enzymů. Inhibiční účinek je poté porovnáván se standardním inhibitorem Ibuprofenem.

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky bylo přidáno 180 μ l inkubační směsi, která sestávala z 100 mM Tris pufru (pH 8), 5 μ M hematinu, 18 mM L-epinefrinu a 50 μ M roztoku Na₂EDTA. Poté se přidal COX-1 (1 jednotka do každé reakce) nebo COX-2 (0,5 jednotky do každé reakce) a následně bylo napipetováno 10 μ l testovaného vzorku nebo DMSO (v případě slepého pokusu). Po dobu 5 minut byla směs inkubována při pokojové teplotě. Reakce byla zahájena přidáním 5 μ l arachidonové kyseliny (10 μ M). Po 20 minutách inkubace při teplotě 37 °C byla reakce zastavena přidáním 10 μ l 10% kyseliny mravenčí. Konečný roztok byl zředěn v poměru 1:15 s testovacím pufrům a následně analyzován ELISA kitem. Absorbance byla měřena při 405 nm s referenčními hodnotami 570 a 590 nm pomocí čtečky Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Švýcarsko). Výsledky byly vyjádřeny jako 50% inhibiční koncentrace (IC₅₀) v μ g/ml.

4.6 LC-MS

Pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostním spektrometrem (LC/MS) v režimu s vysokým rozlišením (HRAM) typu Q-TOF (Impact II, Bruker Daltonic) byly screeningově analyzovány polárnější látky ve dvou typech extraktů (MeOH/H₂O a CHCl₃). Analýza byla provedena na poměrně univerzální koloně Acclaim RSLC 120 C18 (2 μ m, 2,1x100 mm, Thermo Scientific). Z důvodu rozdílné ionizovatelnosti některých molekul byla jako mobilní fáze zvolena kombinace MeOH a dvou variant polární fáze:

- a) voda s přidavkem 5 mM COONH₄,
- b) voda s 0,1% COOH.

Každý vzorek byl analyzován oběma těmito variantami. Aby bylo zajištěno co nejširší rozpětí polarit analytů obsažených v testovaných extraktech a zároveň byly vzorky vzájemně porovnatelné, byl pro screening použit gradient v rozpětí 1% až 100% organické fáze (MeOH) v průběhu 26 minut a poté izokraticky 10 minut při 100% MeOH. Pro zajištění fragmentačních spekter nejvýznamnějších analytů, respektive jejich iontů, které budou využity pro pozdější identifikaci, probíhal sběr dat v ddMS2 módu. Rozsah m/z monitorovaných iontů se pohyboval v rozpětí od 60 do 2000.

4.7 GC-MS

Nepolární hexan:diethyletherové extrakty byly analyzovány pomocí plynového chromatografu, který sestával z pece (7890A) a hmotnostního spektrometru (5975C; oba komponenty od Agilent, Santa Clara, USA). Separace daných analytů byla provedena na koloně DP-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m i.d.; Agilent, Santa Clara, USA) za následujícího teplotního gradientu – počáteční teplota byla nastavena na 70 °C a ihned po nástřiku byla zvedána na 280 °C (za 3 °C/min) a držena po dobu 5 minut. Teplota inletu byla nastavena na 250 °C. Vzorky byly nastříknuty o objemu 1 μ l. Jako nosný plyn bylo zvoleno helium (flow: 1 ml/min). Analýzy proběhly v režimu split, který byl nastaven na hodnotu 1:12. Parametry hmotnostního spektrometru byly nastaveny následovně:

- a) teplota interface: 280 °C,
- b) teplota iontového zdroje: 230°C,
- c) teplota kvadrupolu: 150 °C,
- d) ionizační energie: 70 eV.

Hmotnostní spektra byla nasbírána v rozsahu 40-400 m/z. Analýza naměřených dat byla provedena v softwaru ChemStation za využití NIST databáze (National Institute of Standards and Technology; ver. 2.0f). Retenční indexy analytů byly vypočítány na základě retenčních časů *n*-alkanů pomocí lineární interpolace (Kováts, 1958).

5 Výsledky

5.1 Výsledky stanovení antioxidační aktivity

Z naměřených výsledků z obou použitých metod vychází (Tabulka 2), že nejvyšší antioxidační účinek byl naměřen u vzorku *Pleurotus flabellatus*. Metodou DPPH byla hodnota antioxidační aktivity tohoto vzorku stanovena na $24,94 \pm 5,38$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu a metodou ORAC se jednalo o hodnotu $63,89 \pm 3,99$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu. Naopak nejnižší hodnoty antioxidačního potenciálu byly naměřeny u vzorku *Pleurotus ostreatus* 5175, konkrétně $4,28 \pm 0,29$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu (metoda DPPH) a $21,68 \pm 4,18$ $\mu\text{g TE/mg}$ extraktu (metoda ORAC).

Tabulka 2 Antioxidační aktivita testovaného materiálu vyjádřená v ekvivalentech Troloxu (TE)

VZOREK	DPPH	ORAC
	průměr \pm směrodatná odchylka	průměr \pm směrodatná odchylka
<i>Pleurotus flabellatus</i>	$24,94 \pm 5,38$	$63,89 \pm 3,99$
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	$8,54 \pm 1,32$	$35,40 \pm 2,18$
<i>Pleurotus ostreatus</i> opuntiae	$13,47 \pm 4,57$	$36,22 \pm 2,39$
<i>Pleurotus ostreatus</i> ivory	$9,01 \pm 1,78$	$44,54 \pm 4,52$
<i>Pleurotus ostreatus</i> 5175	$4,28 \pm 0,29$	$21,68 \pm 4,18$
<i>Pleurotus ostreatus</i> X	$9,63 \pm 1,01$	$34,00 \pm 4,26$

5.2 Výsledky protizánětlivé aktivity

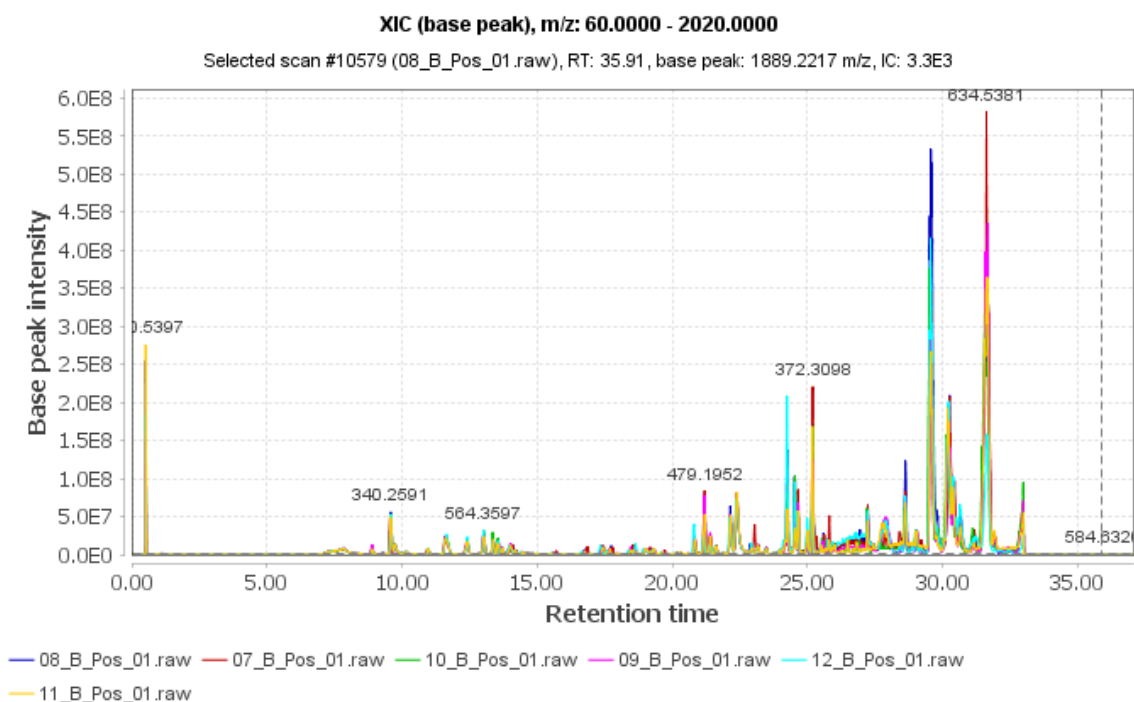
Ze získaných výsledků vyplývá, že u všech testovaných kmenů vykazují nejlepší protizánětlivou aktivitu všechny nepolární extrakty, tzn. hexan:diethyletherové a chloroformové (viz Tabulka 3). Naopak polární 80% methanolové extrakty měly velmi nízkou protizánětlivou aktivitu. Jednotlivé testované kmeny měly mezi sebou také výrazné odlišnosti. Vysokou protizánětlivou aktivitu vykazoval kmen *Pleurotus ostreatus* X s hodnotami $86,71 \pm 1,94$ % (hexan:diethyletherový extrakt) a $86,84 \pm 2,56$ % (chloroformový extrakt), dále kmen *Pleurotus ostreatus* 5175, konkrétní naměřené hodnoty průměrné inhibice byly $84,96 \pm 2,17$ % (hexan:diethyletherový extrakt) a $82,21 \pm 2,67$ % (chloroformový extrakt). Dobré výsledky vykazoval také vzorek *Pleurotus flabellatus* s hodnotami $70,59 \pm 3,44$ % (hexan:diethyletherový extrakt) a $85,04 \pm 0,73$ % (chloroformový extrakt). Testováno bylo vždy 10 μl daného extraktu o hmotnostní koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka 3 Protizánětlivá aktivita testovaného materiálu

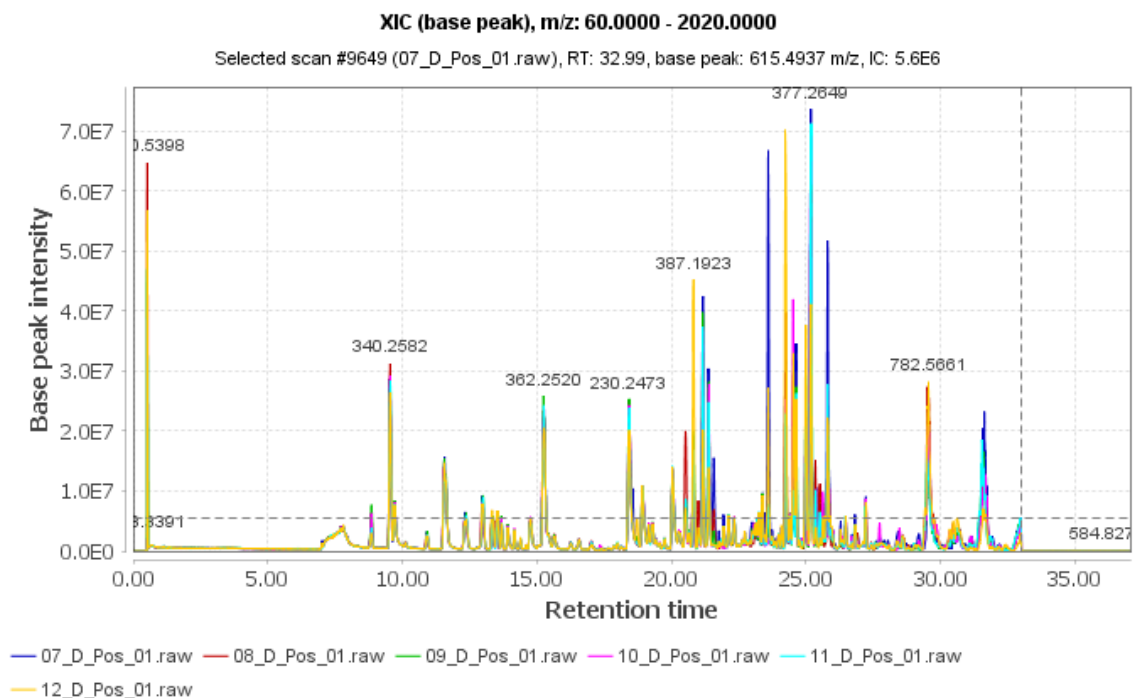
VZOREK	EXTRAKT	PRŮMĚRNÁ INHIBICE ± ODCHYLKA (%)
<i>Pleurotus flabellatus</i>	Hex:Et ₂ O (4:1)	70,59 ± 3,44
	TCM	85,04 ± 0,73
	80% MeOH	28,35 ± 9,34
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Hex:Et ₂ O (4:1)	66,23 ± 5,37
	TCM	55,57 ± 2,76
	80% MeOH	-2,19 ± 16,33
<i>Pleurotus ostreatus opuntiae</i>	Hex:Et ₂ O (4:1)	50,51 ± 3,73
	TCM	43,56 ± 12,86
	80% MeOH	2,35 ± 3,62
<i>Pleurotus ostreatus ivory</i>	Hex:Et ₂ O (4:1)	57,38 ± 6,58
	TCM	52,76 ± 8,70
	80% MeOH	24,02 ± 6,62
<i>Pleurotus ostreatus 5175</i>	Hex:Et ₂ O (4:1)	84,96 ± 2,17
	TCM	82,21 ± 2,67
	80% MeOH	-30,43 ± 16,00
<i>Pleurotus ostreatus X</i>	Hex:Et ₂ O (4:1)	86,71 ± 1,94
	TCM	86,84 ± 2,56
	80% MeOH	-34,24 ± 31,75
Standard (20 μM Ibuprofen)	-	78,95 ± 10,84

5.3 Výsledky LC-MS

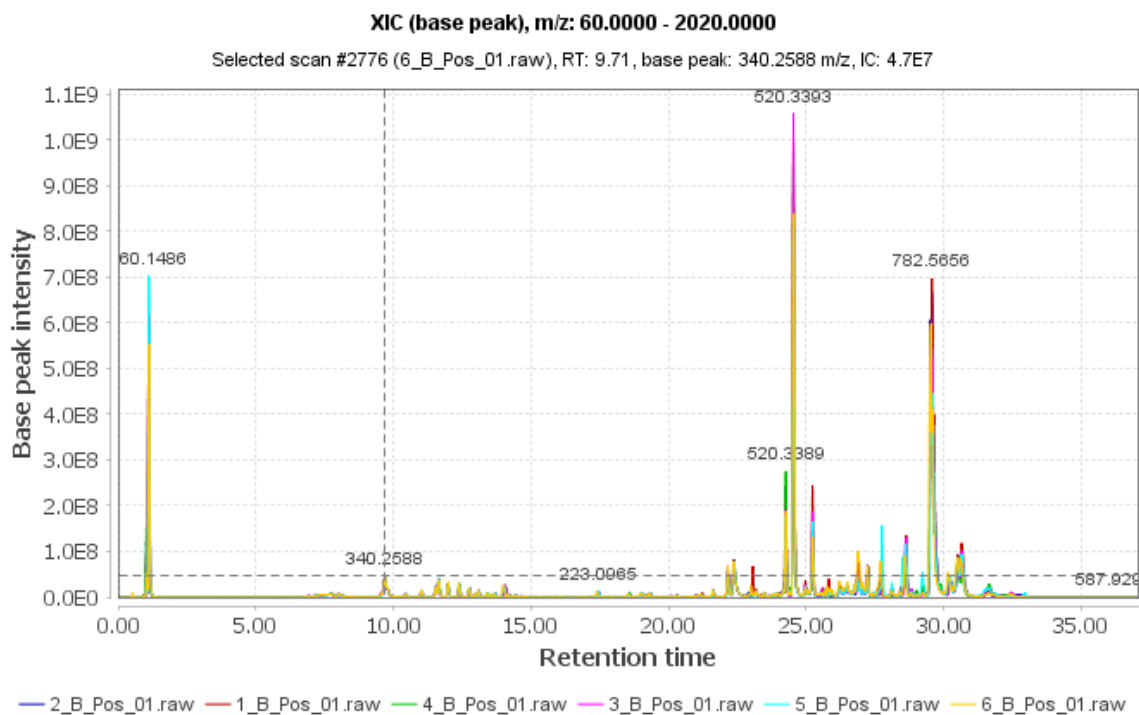
Výsledky chemické analýzy pomocí LC-MS byly vyhodnocovány pomocí softwaru XCMS a Mzmine. Na základě těchto výstupů byly identifikovány soubory rozdílových signálů (tzv. features) pro každý typ extraktu. Celkový počet identifikovaných features byl v řádech desítek tisíc, proto byl následně redukován v procesu čištění dat. Výsledkem bylo několik stovek potenciálních metabolitů, které byly dále identifikovány. V chloroformových extraktech byla na základě screeningových dat zjištěna přítomnost množství lipidových látek, konkrétně se jednalo o fosfolipidy, acylglyceroly a několik látek steroidního charakteru (Obrázek 5 a 6). V methanolových extraktech byly identifikovány zejména látky s větší molekulovou hmotností, zejména oligosacharidy, peptidy a jejich konjugáty s menšími molekulami (Obrázek 7 a 8). Jako příklad identifikovaného nízkomolekulárního metabolitu s biologickou aktivitou v těchto extraktech je možné uvést ergothionein (Obrázek 9), jehož přítomnost byla potvrzena i fragmentovým spektrem (Obrázek 10).



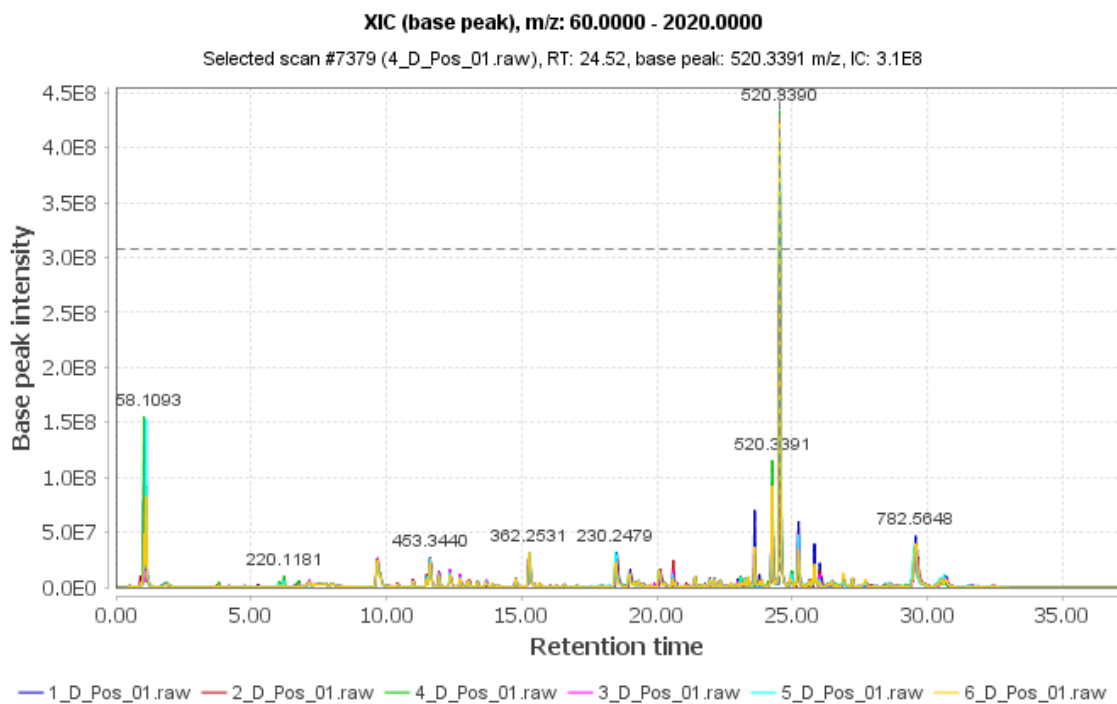
Obř. 5 Chloroformový extrakt (použitá mobilní fáze H₂O + 5mM COONH₄/MeOH).



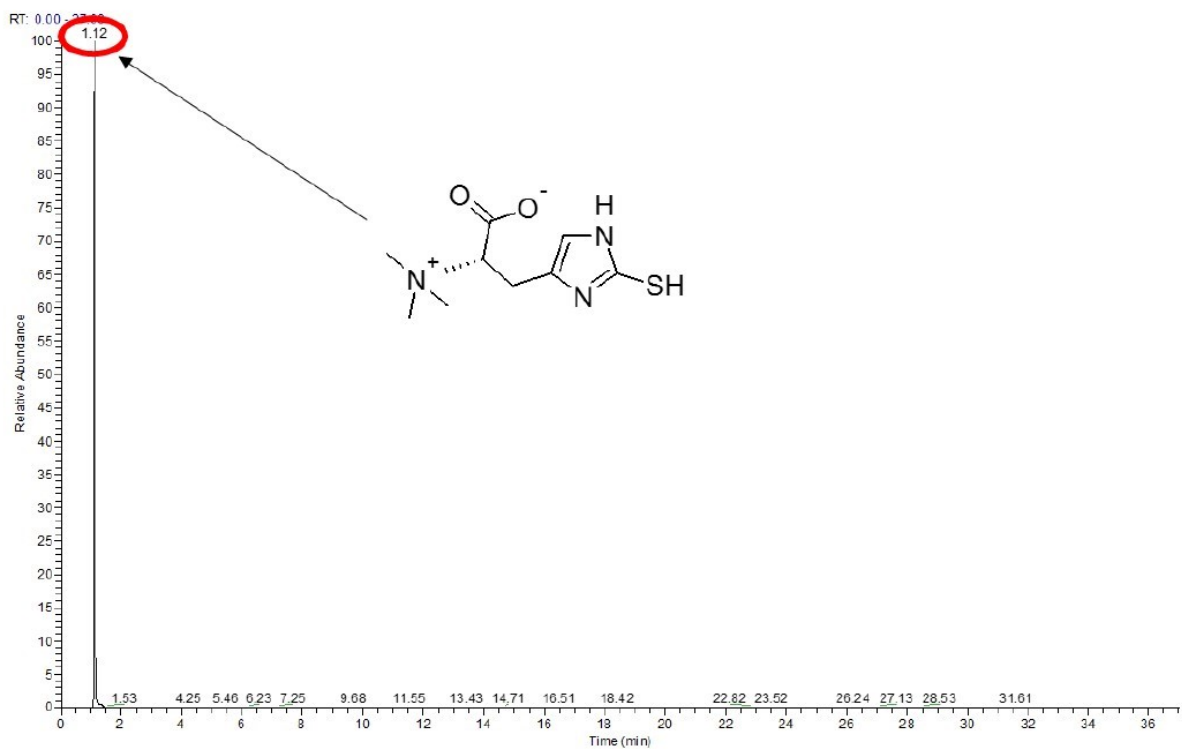
Obř. 6 Chloroformový extrakt (použitá mobilní fáze H₂O + 0,1% COOH/MeOH).



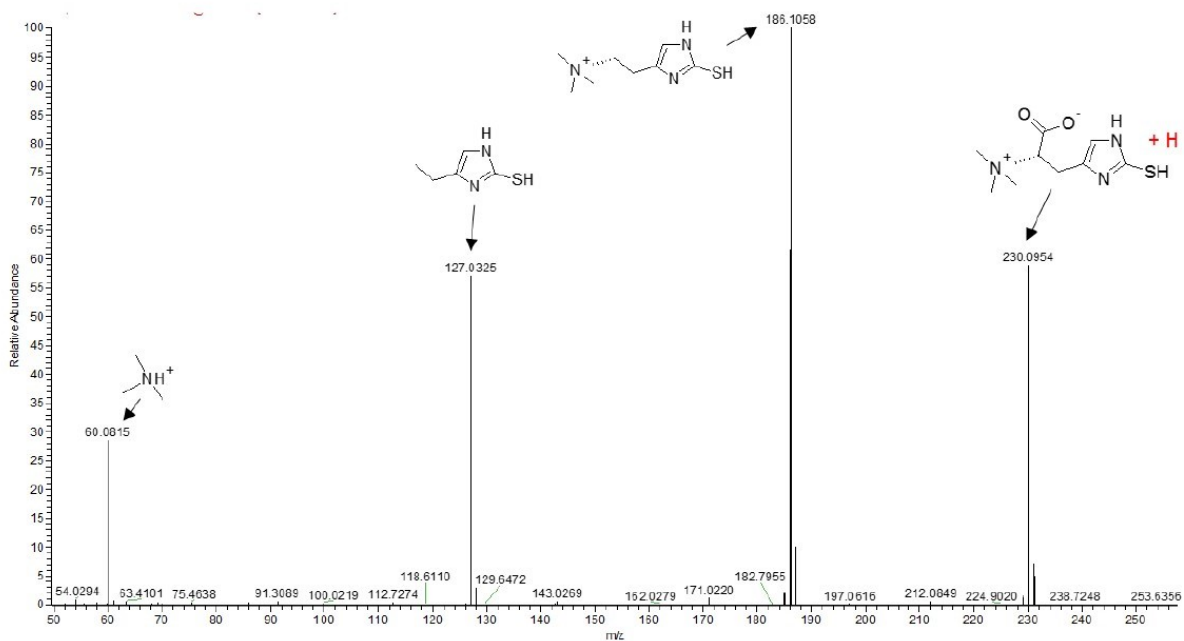
Obr. 7 Methanolový extrakt (použitá mobilní fáze H₂O + 5mM COONH₄/MeOH).



Obr. 8 Methanolový extrakt (použitá mobilní fáze H₂O + 0,1% COOH/MeOH).



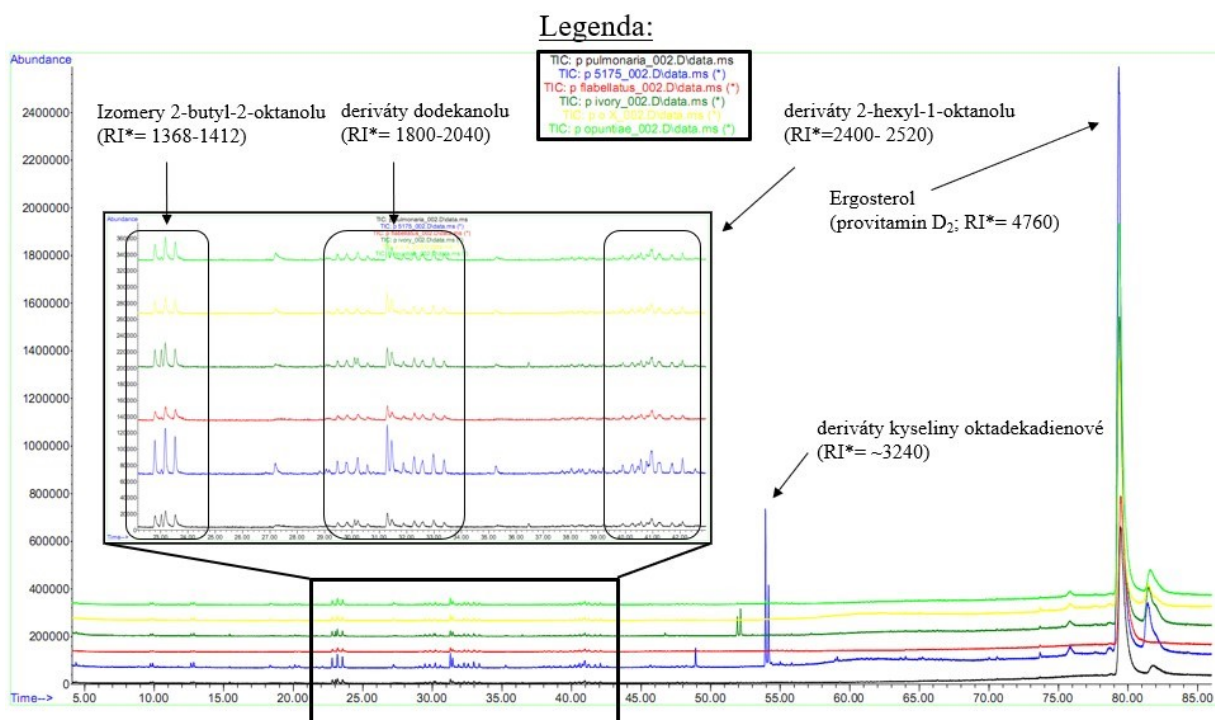
Obr. 9 Extrahovaný iontový chromatogram ergothioneinu.



Obr. 10 Fragmentační spektrum ergothioneinu.

5.4 Výsledky GC-MS

Hmotnostní spektra byla zaznamenávána v režimu TIC (Obrázek 11). Hlavní složkou všech testovaných extraktů byl ergosterol, což je prekurzor vitamínu D₂. Dále byly ve všech vzorcích identifikovány izomery derivátů 2-butyl-2-oktanolu, dodekanolu a 2-hexyl-1-oktanolu, což jsou typické izomery vyskytující se v houbách. Významně se od ostatních vzorků lišil pouze kmen *Pleurotus ostreatus* 5175, u kterého byla identifikována přítomnost derivátů kyseliny oktadekadienové, pravděpodobně linolenové.



* Retenční indexy vypočítané na základě retenčních časů směsi *n*-alkanů

Obr. 11 Chromatogramy hexan:diethyletherových extraktů z GC-MS.

6 Diskuze

Oxidační stres, způsobený vysokou hladinou volných radikálů, je často interpretován v kontextu s vývojem nebo sekundární patologií některých lidských onemocnění (Halliwell et al. 1992; Halliwell 2012). Kromě endogenních antioxidačních obranných mechanismů je příjem dietárních antioxidantů dalším důležitým zdrojem, který může přispět k oxidační homeostáze organismu. Některé syntetické antioxidanty by mohly účinně zlepšit obranné mechanismy, ale vzhledem k jejich nepříznivým účinkům, které se za určitých podmínek projevují, se stále upřednostňují přírodní zdroje antioxidantů (Tauchen 2019). V minulých letech byla antioxidační aktivita primárně zkoumána u běžných potravin, jako je ovoce a zelenina. Poté se však výzkum začal přesouvat i k jiným možným zdrojům antioxidantů, například k jedlým houbám. Už v roce 1986 prokázalo několik vědeckých studií potenciální příznivé účinky jedlých hub na lidské zdraví, a proto se stávaly stále vyhledávanější složkou funkčních potravin (Corrêa et al. 2016). Z tohoto důvodu se dodnes intenzivně studuje jejich chemické složení, antioxidační potenciál a další biologické aktivity (Kozarski et al. 2015). Celosvětově populární a často aplikovanou houbou ve funkčních potravinách a potravinových doplncích je Hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*). Avšak daleko zajímavější se jeví i jiné druhy rodu *Pleurotus*, například *Pleurotus pulmonarius* či *Pleurotus flabellatus*, které vykazují poměrně slibné výsledky. Například již dříve provedená studie Smiderle et al. (2008) prokázala protizánětlivé účinky některých chemických sloučenin obsažených ve vzorcích *Pleurotus pulmonarius*. Dalším testováním se také zjistilo, že extrakty výše zmíněných druhů vykazují uspokojivé antioxidační účinky *in vitro* (Pattar & Ramesh 2010), což potvrzují i výsledky našeho výzkumu.

V této diplomové práci byl zkoumán potenciální preventivní či terapeutický přínos několika druhů jedlých hub v léčbě nemocí způsobených oxidačním stresem a zánětlivými procesy. Pro tento účel byl použit relativně inovativní přístup založený na stanovení kombinující antioxidační a protizánětlivé vlastnosti jednotlivých vzorků. Nejzajímavější výsledky, týkající se inhibice COX enzymů a významné antioxidační aktivity provedené testy DPPH a ORAC, byly pozorovány u druhu *Pleurotus flabellatus*. Vzorek *Pleurotus flabellatus* byl od ostatních velmi dobře rozeznatelný, protože vykazoval výrazné oranžovo-růžové zbarvení, za které jsou patrně zodpovědné látky tetraterpenové povahy, konkrétně beta-karoten a lykopen. Tyto látky budou zřejmě výrazně přispívat k antioxidačnímu potenciálu (Pumtes et al. 2016). Další látkou, vykazující slibný antioxidační účinek, je ergothionein. Jedná se o derivát histidinu, který byl již dříve identifikován jako bohatá složka všech druhů *Pleurotus*. Dnes tato sloučenina vyvolává řadu otázek, a proto se jejímu zkoumání věnuje stále více vědeckých prací. Ergothionein se do lidského těla dostává prostřednictvím stravy, protože je součástí některých rostlinných potravin. Testováním této látky v *in vitro* podmínkách se prokázaly nadějně antioxidační účinky, které se ale nemusí projevovat i *in vivo*. Nedávné studie však identifikovaly vysoce specifický transportér ergothioneinu, tzv. OCTN1, a také odhalily, že se ergothionein hromadí např. v červených krvinkách, játrech, kostní dřeni, mozku či oku (Cheah et al. 2017; Borodina et al. 2020). Toto zjištění jen prohloubilo domněnku, že ergothionein bude pro lidský organismus nějakým způsobem užitečný. Vědecké studie se proto začaly zaměřovat na jeho možné terapeutické účinky, které by se využily k léčbě nemocí způsobených oxidačním stresem. Cheah et al. (2017) jako první zkoumali podání

čistého ergothioneinu lidským dobrovolníkům. Příjem a retence této látky v těle naznačuje důležitou fyziologickou funkci. Klesající hodnoty biomarkerů oxidačního poškození byly v souladu s výsledky provedené na zvířatech a naznačují, že ergothionein může fungovat jako účinný antioxidant, ale zatím pravděpodobně pouze v podmínkách oxidačního stresu (Cheah et al. 2017). Další studie provedená na potkanech prokázala, že ergothionein chrání nervové buňky před apoptózou indukovanou beta-amyloidy, a je tedy schopen mírnit oxidační poškození v mozku (Jang et al. 2004). Problémem je, že toto zjištění zatím nebylo prokázáno u lidí. Z dostupných informací je dosud zřejmé, že hladina ergothioneinu je u pacientů s neurodegenerativními poruchami výrazně vyšší než u zdravých jedinců, což ukazuje na jeho potenciální příznivou roli (Hang et al. 2016; Shao & Le 2019). Definitivně potvrdit, že má ergothionein preventivní či léčivé účinky v lidských onemocněních, zatím není možné z důvodu nedostatku důkazů, nicméně na základě dosud provedených experimentů je patrné, že tuto látku je možné považovat za důležitou zdraví prospěšnou bioaktivní sloučeninu (Borodina et al. 2020). Další významné sloučeniny obsažené v houbách mající antioxidační, případně i protizánětlivé, antibakteriální či imunomodulační účinky, jsou flavonoidy a beta-glukany. Flavonoidy byly vždy prezentovány jako velmi silné antioxidanty *in vivo*. Nicméně i u nich se s postupem času objevily některé pochybnosti související například s prooxidačním chováním *in vivo* nebo s nedostatečným účinkem na zmírnění oxidačního stresu i ve vysokých dávkách (Procházková et al. 2011; Ballard & Junior 2019). Dalším faktem je, že jsou tyto látky pravděpodobně velmi rychle metabolizovány a vylučovány z těla ven, tedy organismus s nimi pracuje jako s cizorodými látkami. Je to patrně důsledek evolučního tlaku, kterému se člověk musel přizpůsobit, vzhledem k tomu, že jsou flavonoidy součástí našeho jídelníčku a přijímáme je ve velkém množství, což nemusí být vždy ku prospěchu (Ballard & Junior 2019; González-Paramás et al. 2019). Proto je nutné vyčkat na relevantní studie, které by s jistotou interpretovaly jejich terapeutický účinek při léčbě nemocí indukovaných oxidačním stresem.

Při kvalitativní analýze houbových vzorků se zjistilo, že hlavní složkou všech extraktů byl ergosterol – prekurzor ergokalciferolu (vitaminu D₂). Tento vitamin se produkuje exogenně ozářením ergosterolu či vstupuje do organismu prostřednictvím stravy. Vzhledem k tomu, že jsou zdrojem tohoto vitaminu houby a kvasinky, dá se předpokládat jeho relativní nedostatek u lidí (zejm. v České republice je dokumentován významný nedostatek vitaminu D). Nyní je u ergokalciferolu hojně diskutována imunomodulační aktivita. U pacientů s roztroušenou sklerózou, revmatoidní artritidou a zánětlivým onemocněním střev byl nedostatek vitaminu D₂ spojen se zvýšeným rizikem zhoršení průběhu těchto nemocí. Některé vědecké práce podporují, že suplementací ergokalciferolu může dojít ke zlepšení průběhu imunitních onemocnění (Goldsmith 2015; Miraglia del Giudice et al. 2018). Avšak stále existuje závažně málo důkazů, které by potvrdily nebo vyvrátily, zda ergokalciferol může být účinným imunitním modulátorem či ne. Kvalitativním testováním houbového materiálu se také ukázalo, že od ostatních vzorků se významně lišil pouze *Pleurotus ostreatus* 5175, u kterého byla zjištěna přítomnost derivátů kyseliny linolenové. Vzhledem k tomu, že u nenasycených mastných kyselin bývá zmiňován jejich vliv na potlačování zánětu *in vitro* i *in vivo*, mohl by tento fakt podpořit i naše výsledky protizánětlivé aktivity, kde si tento vzorek vedl velmi dobře. Henry et al. (2002) testovali kromě jiného i nenasycené mastné kyseliny a jejich schopnost inhibovat cyklooxygenázové enzymy COX-1 a COX-2. Výsledky naznačují, že nenasycené mastné kyseliny se dvěma nebo více dvojnými vazbami a řetězcem delším než 15 uhlíků,

vykazují vysokou inhibici COX-2, z čehož vyplývá, že by se daly považovat za potenciálně vhodnou složku funkčních potravin s protizánětlivými účinky (Henry et al. 2002).

S ohledem na výsledky této studie lze zvolit druh *Pleurotus flabellatus* jako neslibnější pro další použití, vzhledem k tomu, že prokázal dobré antioxidační i protizánětlivé účinky. Je tedy možné tento druh doporučit pro zavedení do funkčních potravin a doplňků stravy.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo stanovení antioxidačních schopností zvolených druhů jedlých hub a poté vybrání vzorku s nejlepšími výsledky, který by se mohl v budoucnu uplatnit při vývoji funkčních potravin. Druhotně byla u vzorků stanovována protizánětlivá aktivita a jejich chemické složení.

Antioxidační potenciál houbového materiálu byl prokázán pomocí *in vitro* metod DPPH a ORAC. Nejlepší výsledky vykázal vzorek *Pleurotus flabellatus*. Za dobré antioxidační vlastnosti tohoto vzorku jsou pravděpodobně zodpovědné látky na bázi tetraterpenů, a také ergothionein. Významné hodnoty protizánětlivé aktivity se objevily hned u tří kmenů. Jednalo se o nepolární extrakty vzorků *Pleurotus ostreatus* X, *Pleurotus ostreatus* 5175 a *Pleurotus flabellatus*, jejichž hodnoty průměrné inhibice enzymů COX-1 a COX-2 byly poměrně vysoké.

Na základě tohoto výzkumu bylo prokázáno, že kmen *Pleurotus flabellatus* by zřejmě mohl sloužit jako prospektivní materiál pro získání extraktů či čistých látek, které se mohou přidávat do rozličných potravin nebo doplňků stravy. Nicméně pro úplné potvrzení získaných výsledků jsou zapotřebí další studie, založené například na buněčných liniích či provedené *in vivo* na zvířatech. Je rovněž nutná detailnější chemická charakterizace daných vzorků.

8 Seznam použité literatury

- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal **21**:143-152.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. The Analyst **127**:183-198.
- Antoniades C, Tousoulis D, Tentolouris C, Toutouzas P, Stefanadis C. 2003. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. Herz **28**:628-638.
- Antontceva E, Sorokin S, Shamtsyan M, Krasnikova L. 2018. Influence of *Pleurotus ostreatus* preparations on fermentation products of lactic acid cultures. Journal of Hygienic Engineering and Design **22**:47-52.
- Arbiser JL et al. 2002. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. Proceedings of the National Academy of Sciences **99**:715-720.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry **73**:239-244.
- Asmat U, Abad K, Ismail K. 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress – A concise review. Saudi Pharmaceutical Journal **24**:547-553.
- Atta EM, Mohamed NH, Abdelgawad AAM. 2017. Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. European Chemical Bulletin **6**:365-375.
- Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. 1993. Free radicals in toxicology. Toxicology and Applied Pharmacology **120**:168-178.
- Back EI, Frindt C, Nohr D, Frank J, Ziebach R, Stern M, Ranke M, Biesalski HK. 2004. Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? The American Journal of Clinical Nutrition **80**:374-384.
- Ballard CR, Junior MRM. 2019. Health Benefits of Flavonoids. Pages 185-201 in Bioactive Compounds. Woodhead Publishing, Campinas, Brazil.
- Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, Datta A. 2004. Oxidative stress-induced ischemic heart disease: Protection by antioxidants. Current Medicinal Chemistry **11**:369-387.

- Bartekova M, Barancik M, Dhalla NS. 2016. Role of oxidative stress in subcellular defects in ischemic heart disease. Pages 129-146 in *Biochemistry of Oxidative Stress*. In: Gelpi R, Boveris A, Poderoso J, editors. *Biochemistry of Oxidative Stress. Advances in Biochemistry in Health and Disease*. Springer International Publishing Switzerland.
- Beatty S, Koh H-H, Phil M, Henson D, Boulton M. 2000. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology* **45**:115-134.
- Bhaskar S, Sudhakaran PR, Helen A. 2016. Quercetin attenuates atherosclerotic inflammation and adhesion molecule expression by modulating TLR-NF- κ B signaling pathway. *Cellular Immunology* **310**:131-140.
- Blokhina O. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany* **91**:179-194.
- Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. 2008. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and histopathology*.
- Borodina I, Kenny LC, McCarthy CM, Paramasivan K, Pretorius E, Roberts TJ, van der Hoek SA, Kell DB. 2020. The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical. *Nutrition Research Reviews*:1-28.
- Brewer MS. 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **10**:221-247.
- Brown AA, Hu FB. 2001. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**:673-686.
- Brown GD, Gordon S. 2003. Fungal β -Glucans and mammalian immunity. *Immunity* **19**:311-315.
- Butterfield DA, Halliwell B. 2019. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience* **20**:148-160.
- Caboni P, Sherer TB, Zhang N, Taylor G, Na HM, Greenamyre JT, Casida JE. 2004. Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. *Chemical Research in Toxicology* **17**:1540-1548.
- Ciecierska A, Drywień ME, Hamulka J, Sadkowski T. 2019. Nutraceutical functions of beta-glucans in human nutrition. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* **70**:315-324.
- Collins FS, Riordan JR, Tsui L-C. 2016. The cystic fibrosis gene: Isolation and significance. *Hospital Practice* **25**:47-57.

- Corrêa RCG, Brugnari T, Bracht A, Peralta RM, Ferreira ICFR. 2016. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science & Technology* **50**:103-117.
- Dabbagh AJ, Mannion T, Lynch SM, Frei B. 1994. The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status *in vivo*. *Biochemical Journal* **300**:799-803.
- Denisov ET, Afanas'ev IB. 2005. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Taylor & Francis and CRC Press, Boca Raton, FL.
- Devi L, Anandatheerthavarada HK. 2010. Mitochondrial trafficking of APP and alpha synuclein: Relevance to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1802**:11-19.
- Dewick PM. 2009. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach 3rd Edition. John Wiley&Sons, West Sussex, England.
- Dib M. 2003. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Drugs* **63**:289-310.
- D'Incà R, Cardin R, Benazzato L, Angriman I, Martines D, Sturniolo GC. 2004. Oxidative DNA damage in the mucosa of ulcerative colitis increases with disease duration and dysplasia. *Inflammatory Bowel Diseases* **10**:23-27.
- 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**:49-59.
- Du J, Cullen JJ, Buettner GR. 2012. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1826**:443-457.
- Fang Y-Z, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**:872-879.
- Fernando W, Rupasinghe HPV, Hoskin DW. 2019. Dietary phytochemicals with anti-oxidant and pro-oxidant activities: A double-edged sword in relation to adjuvant chemotherapy and radiotherapy? *Cancer Letters* **452**:168-177.
- Fiedor J, Burda K. 2014. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* **6**:466-488.

- Galli F, Battistoni A, Gambari R, Pompella A, Bragonzi A, Pilolli F, Iuliano L, Piroddi M, Dehecchi MC, Cabrini G. 2012. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1822**:690-713.
- Gammone M, Riccioni G, D'Orazio N. 2015. Marine carotenoids against oxidative stress: Effects on human health. *Marine Drugs* **13**:6226-6246.
- Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR, Forman HJ. 1999. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **277**:113-118.
- Garcion E, Nataf S, Berod A, Darcy F, Brachet P. 1997. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Molecular Brain Research* **45**:255-267.
- Gilbert D. 2000. Fifty Years of Radical Ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences* **899**:1-14.
- Glorieux C, Calderon PB. 2018. Catalase down-regulation in cancer cells exposed to arsenic trioxide is involved in their increased sensitivity to a pro-oxidant treatment. *Cancer Cell International* **18**:24.
- Goldsmith J. 2015. Vitamin D as an immunomodulator: Risks with deficiencies and benefits of supplementation. *Healthcare* **3**:219-232.
- González-Paramás AM, Ayuda-Durán B, Martínez S, González-Manzano S, Santos-Buelga C. 2019. The mechanisms behind the biological activity of flavonoids. *Current Medicinal Chemistry* **26**:6976-6990.
- Goufo P, Trindade H. 2014. Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid. *Food Science & Nutrition* **2**:75-104.
- Hald A, Lotharius J. 2005. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental Neurology* **193**:279-290.
- Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet* **344**:721-724.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition* **16**:33-50.

- Halliwell B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews* **70**:257-265.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. Pages 1-85 in *Methods in enzymology*. Academic Press.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *The Journal of laboratory and clinical medicine* **119**:598-620.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine* **18**:125-126.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Hang L, Basil AH, Lim K-L. 2016. Nutraceuticals in Parkinson's disease. *NeuroMolecular Medicine* **18**:306-321.
- Hardy J, Higgins G. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**:184-185.
- Hennig B, Toborek M, McClain CJ. 2001. High-energy diets, fatty acids and endothelial cell function: Implications for atherosclerosis. *Journal of the American College of Nutrition* **20**:97-105.
- Henry GE, Momin RA, Nair MG, Dewitt DL. 2002. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:2231-2234.
- Hirokawa K, O'Shaughnessy KM, Ramrakha P, Wilkins MR. 1994. Inhibition of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle by retinoids. *British Journal of Pharmacology* **113**:1448-1454.
- Houlden H, Singleton AB. 2012. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica* **124**:325-338.
- Hudson VM. 2001. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Radical Biology and Medicine* **30**:1440-1461.
- Chakraborti S, Dhalla NS, Ganguly NK, Dikshit M. 2019. *Oxidative Stress in Heart Diseases*. Springer Singapore, Singapore.

- Cheah IK, Tang RMY, Yew TSZ, Lim KHC, Halliwell B. 2017. Administration of pure ergothioneine to healthy human subjects: Uptake, metabolism, and effects on biomarkers of oxidative damage and inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling* **26**:193-206.
- Chen J, Stubbe JA. 2005. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nature Reviews Cancer* **5**:102-112.
- Chen Q et al. 2007. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:8749-8754.
- Chen X, Ding YW, Yang G-yu, Bondoc F, Lee M-J, Yang C. 2000. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* **21**:257-263.
- Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. 2005. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology and Medicine* **39**:841-852.
- Cheung PCK. 2010. The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin* **35**:292-299.
- Imlay JA. 2003. Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology* **57**:395-418.
- Ischiropoulos H, Beckman JS. 2003. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? *Journal of Clinical Investigation* **111**:163-169.
- Jaismy JP, Manju SL, Ethiraj KR, Elias G. 2018. Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: A structure-based approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **121**:356-381.
- Jang J-H, Aruoma OI, Jen L-S, Chung HY, Surh Y-J. 2004. Ergothioneine rescues PC12 cells from β -amyloid-induced apoptotic death. *Free Radical Biology and Medicine* **36**:288-299.
- Kedare SB, Singh RP. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* **48**:412-422.
- Keenan JM, Goulson M, Shamliyan T, Knutson N, Kolberg L, Curry L. 2007. The effects of concentrated barley β -glucan on blood lipids in a population of hypercholesterolaemic men and women. *British Journal of Nutrition* **97**:1162-1168.
- Kim HW, Kim BK. 1999. Biomedical Triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**:121-138.

- Kim M-Y et al. 2008. Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:7265-7270.
- Klein EA et al. 2011. Vitamin E and the risk of prostate cancer: The selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *Jama* **306**:1549-1556.
- Kofuji K, Aoki A, Tsubaki K, Konishi M, Isobe T, Murata Y. 2012. Antioxidant Activity of β -Glucan. *ISRN Pharmaceutics* **2012**:1-5.
- Kohen R, Nyska A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* **30**:620-650.
- Kozarski M, Klaus A, Jakovljevic D, Todorovic N, Vunduk J, Petrović P, Niksic M, Vrvic M, van Griensven L. 2015. Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules* **20**:19489-19525.
- Lambert JD, Hong J, Yang G-yu, Liao J, Yang CS. 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**:284-291.
- Lavi I, Levinson D, Peri I, Tekoah Y, Hadar Y, Schwartz B. 2010. Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**:1977-1990.
- Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. 2009. *Biochemie pro studující medicíny*. Vydání 2. Karolinum, Praha.
- Li P, Hu X, Gan Y, Gao Y, Liang W, Chen J. 2011. Mechanistic insight into DNA damage and repair in ischemic stroke: Exploiting the base excision repair pathway as a model of neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling* **14**:1905-1918.
- Li P, Stetler RA, Leak RK, Shi Y, Li Y, Yu W, Bennett MVL, Chen J. 2018. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology* **134**:208-217.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**:317-325.
- Lindgren M, Rosenthal-Aizman K, Saar K, Eiríksdóttir E, Jiang Y, Sassian M, Östlund P, Hällbrink M, Langel Ü. 2006. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochemical Pharmacology* **71**:416-425.

- Lipinski B. 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications* **15**:203-210.
- Loyd AL, Richter BS, Jusino MA, Truong C, Smith ME, Blanchette RA, Smith JA. 2018. Identifying the “Mushroom of Immortality”: Assessing the *Ganoderma* species composition in commercial Reishi products. *Frontiers in Microbiology* **9**:1557.
- MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**:2046-2056.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **17**:24-38.
- Mau JL, Lin HC, Song SF. 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International* **35**:519-526.
- Mayne ST. 1996. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB Journal* **10**:690-701.
- Miller A. 1996. Antioxidant flavonoids: Structure, function and clinical usage. *Alternative medicine review: A Journal of Clinical Therapeutic* **1**:103-111.
- Miraglia del Giudice M, Indolfi C, Strisciuglio C. 2018. Vitamin D. *Journal of Clinical Gastroenterology* **52**:86-88.
- Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Garg R, Dandona P. 2002. Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *The American Journal of Clinical Nutrition* **75**:767-772.
- Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. 2005. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience* **28**:57-87.
- Munck A. 2010. Nutritional considerations in patients with cystic fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine* **4**:47-56.
- Nagao A. 2004. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *The Journal of Nutrition* **134**:237-240.
- Nakashima A, Yamada K, Iwata O, Sugimoto R, Atsuji K, Ogawa T, Ishibashi-Ohgo N, Suzuko K. 2018. β -Glucan in foods and its physiological functions. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **64**:8-17.

- Noda N, Wakasugi H. 2001. Cancer and Oxidative Stress. *Japan Medical Association Journal* **44**:535-539.
- Ntimbane T, Comte B, Mailhot G, Berthiaume Y, Poitout V, Prentki M, Rabasa-Lhoret R, Levy E. 2009. Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress. *The Clinical Biochemist Reviews* **30**:153-177.
- Östman E, Rossi E, Larsson H, Brighenti F, Björck I. 2006. Glucose and insulin responses in healthy men to barley bread with different levels of (1→3;1→4)- β -glucans; predictions using fluidity measurements of in vitro enzyme digests. *Journal of Cereal Science* **43**:230-235.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:4619-4626.
- Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu CD, Unakalamba CB. 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology* **4**:46-57.
- Pattar MG, Ramesh CH. 2010. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research* **2**:107.
- Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. 2002. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radical Biology and Medicine* **33**:311-322.
- Pezzoli G, Antonini A, Barbieri S, Canesi M, Perbellini L, Zecchinelli A, Mariani CB, Bonetti A, Leenders KL. 1995. N-Hexane-induced parkinsonism: Pathogenetic hypotheses. *Movement Disorders* **10**:279-282.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* **4(2)**:89-96.
- Phillips M, Cataneo RN, Cheema T, Greenberg J. 2004. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta* **344**:189-194.
- Piccini A et al. 2005. β -amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry* **280**:34186-34192.
- Piechota-Polanczyk A, Fichna J. 2014. The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **387**:605-620.

- Pietta P-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**:1035-1042.
- Pimplikar SW. 2009. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**:1261-1268.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. 2001. *Antioxidants in food: practical applications*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, Cambridge, England.
- Poste G, Fidler IJ. 1980. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* **283**:139-146.
- Potts LF, Luzzio FA, Smith SC, Hetman M, Champy P, Litvan I. 2012. Annonacin in *Asimina triloba* fruit: Implication for neurotoxicity. *NeuroToxicology* **33**:53-58.
- Prior RL, 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**:4290-4302.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**:513-523.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, Akram M. 2001. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): A technical review of its utility and safety. *Journal of Neurochemistry* **76**:1265-1274.
- Pumtes P, Rojsuntornkitti K, Kongbangkerd T, Jittrepotch N. 2016. Effects of different extracting conditions on antioxidant activities of *Pleurotus flabellatus*. *International Food Research Journal* **23**.
- Quin MB, Flynn CM, Schmidt-Dannert C. 2014. Traversing the fungal terpenome. *Nat. Prod. Rep* **31**:1449-1473.
- Ragaee S, Abdelaal E, Noaman M. 2006. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry* **98**:32-38.
- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, Porcellini E, Licastro F. 2005. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* **82**:636-643.
- Ribeiro D, Freitas M, Silva AMS, Carvalho F, Fernandes E. 2018. Antioxidant and prooxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology* **120**:681-699.
- Román M de, Boa E, Woodward S. 2006. Wild-gathered fungi for health and rural livelihoods. *Proceedings of the Nutrition Society* **65**:190-197.

- Ross R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**:801-809.
- Rowntree RK, Harris A. 2003. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Annals of Human Genetics* **67**:471-485.
- Sánchez C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**:1321-1337.
- Santosa S. 2005. Oxidative stress in ocular disease: Does lutein play a protective role? *Canadian Medical Association Journal* **173**:861-862.
- Seifried RM, Harrison E, Seifried HE. 2017. Antioxidants in health and disease. Pages 321-346 in *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*. Academic Press
- Sen Gupta S, Ghosh M. 2013. *In Vitro* Antioxidative evaluation of α - and β -carotene, isolated from crude palm oil. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2013**:1-10.
- Sharma OP, Bhat TK. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* **113**:1202-1205.
- Shao Y, Le W. 2019. Recent advances and perspectives of metabolomics-based investigations in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration* **14**:3.
- Schijlen EGWM, Ric de Vos CH, van Tunen AJ, Bovy AG. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* **65**:2631-2648.
- Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* **27**:916-921.
- Southorn P, Powis G. 1988. Free Radicals in Medicine. II. Involvement in Human Disease. *Mayo Clinic Proceedings* **63**:390-408.
- Sreekumar R, Unnikrishnan J, Fu A, Nygren J, Short KR, Schimke J, Barazzoni R, Nair KS. 2002. Impact of high-fat diet and antioxidant supplement on mitochondrial functions and gene transcripts in rat muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **282**:1055-1061.
- Stahl W, Sies H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* **24**:345-351.
- Steinberg D. 2002. Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine* **8**:1211-1217.

- St. Jeor ST, Howard BV, Prewitt TE, Bovee V, Bazzarre T, Eckel RH. 2001. Dietary protein and weight reduction. *Circulation* **104**:1869-1874.
- Surenjav U, Zhang L, Xu X, Zhang X, Zeng F. 2006. Effects of molecular structure on antitumor activities of (1→3)-β-d-glucans from different *Lentinus Edodes*. *Carbohydrate Polymers* **63**:97-104.
- Tada R, Tanioka A, Iwasawa H, Hatashima K, Shoji Y, Ishibashi K-ichi, Adachi Y, Yamazaki M, Tsubaki K, Ohno N. 2008. Structural characterisation and biological activities of a unique type β-d-glucan obtained from *Aureobasidium pullulans*. *Glycoconjugate Journal* **25**:851-861.
- Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Ezaki O. 2002. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARα activation and ROS production. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **282**:338-348.
- Tauchen J. 2019. Antioxidanty v léčbě lidských nemocí: Pravda, či klam? *Vesmír* **89**:306-307.
- Tian T, Wang Z, Zhang J. 2017. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**:1-18.
- Topinka J, Binkova B, Sram RJ, Erin AN. 1989. The influence of α-tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes. *Mutation Research Letters* **225**:131-136.
- Tzianabos AO. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews* **13**:523-533.
- Üstün NŞ, Bulam S, Pekşen A. 2018. The use of mushrooms and their extracts and compounds in functional foods and nutraceuticals. *Türkmen* **1**:1205-1222.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* **266**:37-56.
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musilek K. 2016. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of Toxicology* **90**:1-37.
- Van Der Vliet A, Eiserich JP, Marelich GP, Halliwell B, Cross CE. 1996. Oxidative stress in cystic fibrosis: Does it occur and does it matter? Pages 491-513 in *Advances in pharmacology*. Academic Press.

- Vogelstein B, Kinzler KW. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* **10**:789-799.
- Wang Z, Bai Z, Qin X, Cheng Y. 2019. Aberrations in oxidative stress markers in amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**:1-9.
- Woodruff TM, Thundyil J, Tang S-C, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. 2011. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration* **6**:11.
- Wu G, Meininger CJ. 2002. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annual Review of Nutrition* **22**:61-86.
- Xiao L, Liu L, Guo X, Zhang S, Wang J, Zhou F, Liu L, Tang Y, Yao P. 2017. Quercetin attenuates high fat diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice: A critical role of NADPH oxidase. *Food and Chemical Toxicology* **105**:22-33.
- Xiao Z-P, Peng Z-Y, Peng M-J, Yan W-B, Ouyang Y-Z, Zhu H-L. 2011. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry* **11**:169-177.
- Xia Y, Hill KE, Burk RF. 1985. Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-induced glutathione release from the isolated perfused rat heart. *The Journal of Nutrition* **115**:733-742.
- Yanai H, Salomon N, Lahat A. 2016. Complementary therapies in inflammatory bowel diseases. *Current Gastroenterology Reports* **18**:62.
- Young IS, Woodside JV. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* **54**:176-186.
- Yu R, Tan TH, Kong ANT. 1997. Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **272**:28962-28970.
- Ziady AG, Hansen J. 2014. Redox balance in cystic fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **52**:113-123.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

- AAPH:** 2,2-azobis-2-amidopropan-dihydrochlorid
BHA: Butylhydroxyanisol
BHT: Butylhydroxytoluen
CFTR: Transmembránový regulátor cystické fibrózy
DCFH: Dichloro-dihydro-fluorescein
DCF: Dichlorofluorescein
DMSO: Dimethylsulfoxid
DPPH: 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
ERG: Ergothionein
EQ: Ethoxyquin
FRAP: Ferric reducing antioxidant potential
GSH: Glutathion
GSSG: Glutathion disulfid
GPx: Glutathion peroxidáza
GR: Glutathion reductáza
iNOS: Syntáza oxidu dusnatého
LDL: Nízkodenzitní lipoprotein
MAPK: Mitogenen aktivovaná proteinová kináza
MCP-1: Monocytový chemoatraktant-protein 1
MPTP: 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NADPH: Nikotinamid adenin nukleotid fosfát
Na₂EDTA: Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
NO: Oxid dusnatý
NO₃: Dusičnany
OCTN1: Organic cation transporter novel, type 1
ORAC: Oxygen radical absorbance capacity
PUFAs: Polynenasycené mastné kyseliny
RNS: Reaktivní druhy dusíku
ROS: Reaktivní druhy kyslíku
SOD: Superoxid dismutáza
TBHQ: Terciální butylhydrochinon
5-LOX: Enzym 5-lipoxygenáza