

Biologický účinek polyfenolů obsažených v jedlých květech

Bc. Ivana Mikésková

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana MIKÉSKOVÁ**
Osobní číslo: **T10416**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Biologický účinek polyfenolů v jedlých květech.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- 1. Charakteristika jednotlivých polyfenolů.**
- 2. Vliv polyfenolů na lidský organismus.**
- 3. Seznámit se s kultivací buněk.**

II. Praktická část

- 1. Metodika buněčné kultivace a mikrobiologie.**
- 2. Základní testy v metodách testování.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] ROSYTAL, S. Nový přehled biologie, Scientia, Praha, 2003.

[2] ALBERTS, B. et al. Molecular Biology of the Cell 4th ed., Garland Science, 2002

[3] ISNUSTAD, D. P. a kol. Genetika, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno, 2009.

[4] Scientific databases Web of Science, Science Direct.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů


Datum zadání diplomové práce:

1. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 5. 4. 2012

Mikéšková

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Polyfenoly a jejich protinádorové účinky jsou studovány po mnoho let. Vykazují řadu biologicky významných funkcí, jako je ochrana proti oxidačnímu stresu a degeneračním onemocněním. Experimentální údaje ukazují, že většina z těchto biologických funkcí může být přičtena jejich antioxidační aktivitě. Cílem diplomové práce bylo sledovat vliv polyfenolů extrahovaných z květů bylin (*B. perennis*, *T. officinale*, *T. pratensis*, *C. intybus*) na proliferaci buněk. Navíc byl také zkoumán jejich antimikrobiální efekt. Antiproliferační efekt byl vyhodnocen pomocí MTT testu za použití různých koncentrací polyfenolů. Testy byly provedeny pomocí dvou buněčných linií (HaCaT, HepG2). Antimikrobiální efekt byl vyhodnocen pomocí diskové difúzní metody za použití mikroorganismů *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* a *A. niger*.

Klíčová slova: Proliferace, polyfenolické látky, kultivace buněk, květy bylin.

ABSTRACT

Polyphenols and their antitumor effects have been studied for many years. They exhibit a number of biologically important functions such as protection against oxidative stress and degenerations diseases. Experimental data show that most of these biological functions may be attributed to their antioxidant activity. The aim of thesis was to analyze the influence of polyphenols extracted from flowers herbs (*B. perennis*, *T. officinale*, *T. pratensis*, *C. intybus*) to cell proliferation. Moreover there was also studied their antimicrobial effect. Antiproliferative effect was evaluated by MTT assay with different concentrations of polyphenols. Tests were performed with two cell lines (HaCaT, HepG2). Antimicrobial effect was evaluted with the disk diffusion method for the use of us microorganisms *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* and *A. niger*.

Keywords: Proliferation, polyphenolic substances, cell culture, flowers herbs.

Chtěla bych touto cestou poděkovat svému vedoucímu práce Ing. Petrovi Humpolíčkovi, Ph. D. za odborné vedení této práce a za čas strávený při jejím konzultování. Chci také poděkovat doktorantce Ing. Zdence Kucekové a Ing. Daniele Veselé za cenné rady. A chci také poděkovat své rodině a přátelům za velkou podporu. Děkuji univerzitě, za poskytnutý materiál k práci a za asistenci v laboratořích.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CHARAKTERISTIKA POLYFENOLŮ	13
1.1 STRUKTURA ROSTLINNÝCH POLYFENOLŮ	13
1.1.1 Flavonoidy.....	14
1.1.1.1 Flavonoly	15
1.1.1.2 Antokyanidiny.....	16
1.1.1.3 Flavony	16
1.1.1.4 Isoflavonoidy	17
1.1.1.5 Flavanony.....	18
1.1.1.6 Katechiny	18
1.1.2 Fenolové kyseliny.....	19
1.2 BIOLOGICKÉ ÚČINKY POLYFENOLŮ	20
1.2.1 Flavonoidy.....	20
1.2.2 Kvercetin	21
1.2.3 Resveratrol	21
1.2.4 Katechiny.....	21
1.2.5 Antokyany	21
1.2.6 Antioxidační účinky polyfenolů.....	22
2 VÝSKYT POLYFENOLŮ V JEDLÝCH KVĚTECH.....	23
2.1 SEDMIKRÁSKA CHUDOBKA (<i>BELLIS PERENNIS</i>).....	23
2.2 SMETÁNKA LÉKAŘSKÁ (<i>TARAXACUM OFFICINALE</i>)	23
2.3 ČEKANKA OBECNÁ (<i>CICHORIUM INTYBUS</i>)	24
2.4 BEZ ČERNÝ (<i>SAMBUCUS NIGRA</i>).....	24
2.5 JERLÍN VIKVOLISTÝ (<i>SOPHORA VICIFOLIA</i>)	25
2.6 ŠŤOVÍK KYSELÝ (<i>RUMEX ACETOSA</i>).....	25
2.7 ŠALVĚJ LÉKAŘSKÁ (<i>SALVIA OFFICINALIS</i>).....	26
3 POLYFENOLY ČAJE A KÁVY	27
3.1 KARDIOVASKULÁRNÍ PŮSOBENÍ ZELENÉHO ČAJE.....	27
3.2 POLYFENOLY KÁVY	28
4 ZÁKLADNÍ VYBAVENÍ LABORATOŘE TKÁŇOVÝCH KULTUR	29
4.1 PREVENCE	29
5 BUNĚČNÉ KULTURY	31

5.1	BUNĚČNÝ CYKLUS.....	31
5.2	RECEPTORY NA BUŇKÁCH	32
5.3	RŮST BUNĚK V TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH.....	33
5.4	ANALÝZA VIABILITY A APOPTÓZY	34
5.4.1	Testy viability.....	35
5.4.1.1	Počítání buněk.....	35
5.4.1.2	MTT test	35
5.4.1.3	Detekce funkčního metabolismu buněk.....	36
5.4.1.4	Přírůstek v množství DNA.....	36
5.5	BUNĚČNÉ LINIE.....	37
5.6	BUNĚČNÉ A TKÁŇOVÉ KULTURY.....	37
5.6.1	Adherentní buňky	37
5.6.2	Suspenzní buňky	38
5.6.3	Primokultury.....	38
5.6.4	Permanentní linie	38
6	KULTIVAČNÍ PODMÍNKY	39
6.1	POVRCH KULTIVAČNÍCH NÁDOB	39
6.2	SLOŽENÍ MÉDIA	39
6.3	SÉRA	40
6.4	TEPLOTA	41
6.5	PUFRAČNÍ SYSTÉMY	41
6.6	KYSLÍK.....	42
6.7	ANTIBIOTIKA	42
7	PRÁCE S KULTURAMI.....	43
7.1	ZAMRAŽOVÁNÍ A ZCHLAZOVÁNÍ BUNĚK	43
7.2	ROZMRAŽOVÁNÍ BUNĚK	44
7.3	PŘEPRAVA BUNĚK	44
7.4	MONITORING INFEKCE	44
II	PRAKTICKÁ ČÁST	45
8	METODIKA	46
8.1	PODMÍNKY EXTRAKCE	46
8.2	KULTIVACE BUNĚK.....	46
8.3	ANTIPROLIFERAČNÍ TEST	47
8.4	STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ	47
8.5	ANTIMIKROBIÁLNÍ TEST.....	49
8.5.1	Disková difúzní metoda	49
9	VÝSLEDKY	50

9.1	VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÉ KERATINOCYTY	52
9.1.1	Sedmikráska chudobka (<i>Bellis perennis</i>)	52
9.1.2	Kozí brada luční (<i>Tragopogon pratensis</i>)	53
9.1.3	Smetánka lékařská (<i>Taraxacum officinale</i>)	54
9.1.4	Čekanka obecná (<i>Cichorium intybus</i>)	55
9.2	VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÉ HEPATOCYTY	57
9.2.1	Sedmikráska chudobka (<i>Bellis perennis</i>)	59
9.2.2	Kozí brada luční (<i>Tragopogon pratensis</i>)	60
9.2.3	Smetánka lékařská (<i>Taraxacum officinale</i>)	61
9.2.4	Čekanka obecná (<i>Cichorium intybus</i>)	62
9.3	ANTIMIKROBIÁLNÍ EFEKT	63
9.4	DISKUZE	64
	ZÁVĚR	67
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	80
	SEZNAM GRAFŮ	81
	SEZNAM TABULEK	82
	SEZNAM OBRÁZKŮ	83

ÚVOD

Polyfenoly představují velkou skupinu látek vyskytujících se v rostlinné říši. Jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčními účinky v naší stravě. Celkový denní příjem polyfenolů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem vitamínů s antioxidačním účinkem. Přítomnost polyfenolů v rostlinných potravinách je do značné míry ovlivněna genetickými faktory, životními podmínkami a technologickým zpracováním. V řadě experimentálních studií bylo prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitamínů. Fenolické sloučeniny mají různé chemické a biochemické vlastnosti. Díky jejich pozitivnímu vlivu na organismus se používají v léčbě a prevenci rakoviny, neurodegenerativních poruch a mrtvice.

Tato práce se zabývá sledováním vlivu polyfenolů obsažených v květech u vybraných druhů bylin na proliferaci dvou druhů buněk. V teoretické části jsou polyfenoly rozděleny do skupin a jednotlivé polyfenoly přítomné v použitých květech jsou stručně popsány. Jsou zde také základní informace o buněčných kulturách a jak s buněčnými kulturami zacházet. V praktické části je práce zaměřena na vliv polyfenolů extrahovaných z vybraných druhů květů bylin na dva typy linií buněk a na jejich antimikrobiální efekt.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA POLYFENOLŮ

Velkou a početnou skupinu látek v rostlinné říši tvoří fenolické látky, nebo-li polyfenoly, které jsou obsaženy téměř ve všech rostlinách [HARBORNE, 1980]. Fenolické látky jsou skupiny chemických sloučenin a produkty sekundárního metabolismu rostlin přítomné v zelenině, ovoci, čaji a květech [HERTOG, 1998].

Obsah fenolických látek v jednotlivých rostlinných částech (např. listy, pecky, plody semena) se mohou významně lišit [BUCHANAN *et al.*, 2000]. Chrání rostliny před oxidačním stresem, UV zářením a patogeny [RECHNER *et al.*, 2002]. V lidském organismu vykazují fenolické sloučeniny velkou škálu biologických účinků a to v důsledku jejich antioxidačních vlastností [FRANKEL *et al.*, 1993]. V posledních desetiletích se stále více cení jejich nutriční hodnota, protože se při jejich příjmu snížilo riziko chronických onemocnění a obecně mají pozitivní vliv na zdraví [SCALBERT *et al.*, 2005]. Polyfenoly mají antikarcinogenní, antitrombotické, protizánětlivé, antiaterogenní, protivředové, imunomodulační, vazodilatační, antialergení, antimikrobiální a estrogenní účinky [VALLS *et al.*, 2009]. Tyto nedávno objevené účinky fenolických sloučenin byly využity na výrobu kosmetiky, léků, potravinových doplňků a funkčních potravin. Všechny tyto vlastnosti jsou silně závislé na fenolické chemické struktuře [AERTS *et al.*, 1999].

1.1 Struktura rostlinných polyfenolů

Polyfenolické sloučeniny jsou takové látky, které ve své molekule obsahují dvě a více hydroxylových skupin navázaných na aromatickém jádře. V současné době je známo více než 8000 druhů polyfenolů [BRAVO, 1998]. Struktura přírodních polyfenolů se pohybuje od jednoduchých molekul, jako jsou fenolové kyseliny, až po vysoce polymerní, jako jsou kondenzované taniny. Většina z hlavních tříd rostlinných polyfenolů jsou uvedeny v Tab. 1. [HARBORNE, 1980]. Ne všechny polyfenolické látky jsou přítomny v květech, které byly použity v této práci a proto v následujících kapitolách bude věnována pozornost pouze některým.

Tab. 1: Hlavní třídy fenolických látek v rostlinách [URQUIAGA; LEIGHTON, 2000]

Počet atomů uhlíků	Základní kostra	Třída	Příklady
6	C6	Jednoduché fenoly	Katechol
7	C6-C1	Fenolové kyseliny	Kyselina salicylová
8	C6-C2	Acetofenony	3-acetyl-6-methoxybenzaldehyd
9	C6-C3	Fenylpropanoidy	Myristicin
11	C6-C4	Naftochinony	Juglon
13	C6-C1-C	Xanthyony	Mangiferin
14	C6-C2-C6	Stilbeny	Resveratrol
15	C6-C3-C6	Flavonoidy	Kvercetin
18	(C6-C3) ₂	Lignany	Pinoresinol
30	(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoidy	Amentoflavon
n	(C6-C3) _n	Ligniny	
	(C6) _n	Katecholmelaniny	
	(C6-C3C6) _n	Flavolany	

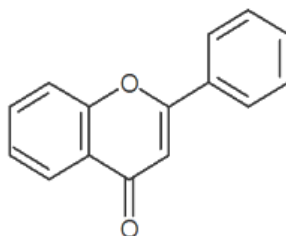
1.1.1 Flavonoidy

Do velké skupiny, která patří do skupiny fenolických látek se zařazují flavonoidy. Jsou to nejdůležitější rostlinné pigmenty, které tvoří žluté, červené nebo modré květinové zbarvení okvětních lístků. Mají za úkol přilákat opylovače [GALEOTTI *et al.*, 2008]. Jejich společnou strukturu tvoří difenylpropan (C6-C3-C6), který se skládá ze dvou aromatických kruhů spojených třemi uhlíky, které obvykle tvoří okysličený heterocyklón [FORKMANN; HELLER 1999].

Podle chemické struktury jsou flavonoidy rozděleny do 6 podskupin: flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, isoflavonoidy a antokyanidiny. V rostlinách se vyskytují převážně jako β -glykosidy. Navázaný sacharid bývá nejčastěji glukóza nebo rhamnosa, méně galaktosa, arabinosa, xylosa, glykuronová kyselina a další sacharidy [SCALBERT; WILLIAMSON, 2000]. Jejich molekula je více rozpustná ve vodě a méně reaktivní vůči volným radikálům. C6-C3 řetězec je výsledkem spojení pomocí biosyntetických drah zahrnujících prekurzory šikimátových a acetát-malonátových drah [CROZIER *et al.*, 2000].

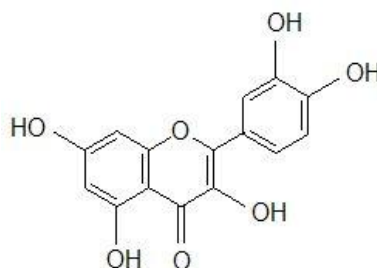
Některé flavonoidy mají inhibiční účinek proti organismům, které způsobují choroby rostlin např. *Fusarium oxysporum* [GALEOTTI *et al.*, 2008].

Obrázek 1: Strukturální vzorec flavonoidu [VALLS *et al.*, 2009]



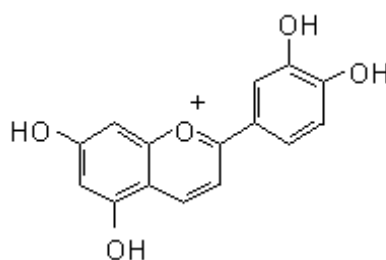
1.1.1.1 Flavonoly

Flavonoly jsou přítomny jako různorodé glykosidy ve značném množství v naší běžné stravě. Jsou syntetizovány z aminokyseliny fenylalaninu nebo tyrozinu [UEDA *et al.*, 1995]. Vyskytují se ve vnějších částech rostlinných tkání, kde se akumulují. Jejich syntéza je stimulována světlem [MANACH *et al.*, 2004]. Flavonoly lze nalézt prakticky ve všem ovoci a zelenině. Nejbohatším zdrojem jsou cibule, jablka, víno a čaj. Denní příjem flavonolů u dospělého člověka se odhaduje na 20 – 35 mg z nichž více než 65 % jsou kvercetin a glykosidy. Typickým flavonolem je kvercetin, kaempferol a myricetin. Mezi potraviny bohaté na kvercetin se řadí zelený a černý čaj, sladký jeřáb, rakytník řešetlakový atd. V čaji flavonoly významně přispívají k jeho trpké chuti. V těchto zdrojích se nachází jednak ve formě volné, tak vázané s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4'-O-glukosid, kvercetin-3-rhamnosid [DAVALOS *et al.*, 2006]. Flavonoly vykazují široké spektrum biologických aktivit. Předpokládá se, že glykosidy kvercetinu hrají roli při obraně rostlin na abiotické faktory [HOLLMAN *et al.*, 1995]. U kvercetinu bylo prokázáno, že zvyšuje citlivost rezistentních nádorů konečníku [WILLIAMSON *et al.*, 2005]. Kvercetin se považuje za antioxidant, může zabránit nejčastějším formám kardiovaskulárních onemocnění a přispívá k ochranným účinkům, které nabízí ovoce a zelenina [LYSENG-W; PERRY, 2003].

Obrázek 2: Strukturální vzorec kvercetinu [GUZEL *et al.*, 2011]

1.1.1.2 Antokyanidiny

Antokyanidiny jsou aglykonovou jednotkou antokyanů, kterých bylo dosud izolováno z rostlin celkem 539 [ANDERSEN *et al.*, 2006]. Vyskytují se ve všech tkáních vyšších rostlin. Lze je nalézt v listech, stoncích, kořenech, květech a plodech [ZHANG *et al.*, 1997]. Antokyaniny (z řeckého *Anthos* = květina a *kyan* – modrý) jsou rostlinná barviva. U květů způsobují červené, až modré zbarvení. Nacházejí se v mnoha potravinách, kde jsou zodpovědné za azurové až červené zbarvení několika druhů ovoce, jako jsou červené bobule (bobule hroznů, bezinky, brusinky, maliny, černý rybíz, moruše...). Všechny tyto plody jsou pravidelně konzumovány ve výživě, a následně byly také použity v potravinářském průmyslu k výrobě džusů a nealkoholických nápojů. Zástupci jsou např. pelargonidin, kyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin a malvidin [KONG *et al.*, 2003].

Obrázek 3: Strukturální vzorec kyanidinu [VALLS *et al.*, 2009]

1.1.1.3 Flavony

Flavony jsou žlutá rostlinná barviva. Mezi přírodní flavony se řadí apigenin a luteolin. Vyskytují se volně nebo jako estery. Denní příjem flavonů se pohybuje v rozmezí 20 – 50 mg denně [ČERMÁK, 2006]. Vyskytují se v bylinách a ve vysokých koncentracích v citrusových plodech. Flavony jsou přijímány ve formě potravinových doplňků a rostlinných výtažků a jejich příjem se neustále zvyšuje. V kombinaci s

antokyany vytvářejí barevné odstíny okvětních lístků od žluté až po červenou [LUŠTINEC; ŽÁRSKÝ, 2003].

1.1.1.4 Isoflavonoidy

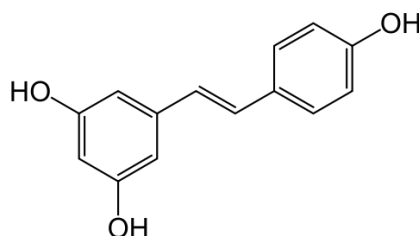
Zvláštní skupinu flavonoidů tvoří isoflavonoidy. Mezi isoflavonoidy patří isoflavony daidzein a genistein. Isoflavony jsou popsány jako fytoestrogenické sloučeniny, protože vykazují estrogení aktivitu. Základní strukturou je jádro flavonu, které se skládá ze dvou benzenových jader spojených s heterocyklickým kroužkem [ANDERSEN; MARKHAM, 2006].

Sojové boby jsou nejčastějším zdrojem isoflavonů. Jinými zdroji mohou být jetel nebo vojtěška. Do roku 2004 bylo popsáno celkem více než 1600 isoflavonoidů, sója je stále nejvíce studovaným zdrojem [OOMAH; HOSSEINIAN, 2008]. Z této skupiny je nejvýznamnější zástupce stilben zvaný resveratrol (3, 4',5 -trihydroxystilben).

Resveratrol byl zjištěn ve více než 70-ti druzích rostlin. Existuje ve dvou geometrických izomerech: *cis* – (Z) a *trans* – (E). *Trans* forma může podstoupit isomerii na *cis* formě, když je vystavena UV záření [PROKOP *et al.*, 2006].

Bylo prokázáno že resveratrol je účinný ve všech třech fázích procesu rakoviny: iniciace, propagace a progresse. Zvyšuje hladinu léčivých metabolických enzymů chinon reduktázy. Chinon reduktáza je enzym schopný metatabolicky detoxikovat karcinogeny a tím je odstraňuje z těla ven [BARTELLI *et al.*, 1998].

Obrázek 4: Strukturní vzorec resveratrolu [SAKKIADY *et al.*, 2007]



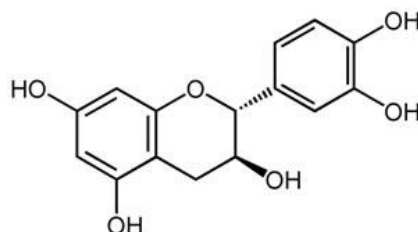
1.1.1.5 Flavanony

Jsou nazývány také jako citrusové flavonoidy. Jsou to látky typicky se vyskytující v pomerančích a grapefruitech. Mezi hlavní zástupce patří naringenin, hesperetin a jejich glykosidy. Obsah flavononů je v celém ovoci až pětkrát vyšší, než ve šťávě, protože se tyto látky u ovoce vyskytují nejvíce pod slupkou a v tkáních [MANACH *et al.*, 2004].

1.1.1.6 Katechiny

Jsou přírodní fenolové antioxidanty sekundárního metabolismu rostlin. Název katechiny pochází od slova „catech“, což je šťáva nebo extrakt z rostliny *Acacia catechu*. *Acacia catechu* je trnitý, opadavý strom, vyskytující se v Asii, Číně, Indii a v oblasti Indického oceánu [QUATTROCCHI, 2000]. Katechin má dva benzenové kruhy (tzv. A a B kruhy) a C kruh s hydroxylovou skupinou na 3. uhlíku. Na uhlíku 2 a 3 má dvě chirální centra v molekule. Proto má čtyři diastereoisomery. Dva z izomerů jsou v *trans* konfiguraci, a jsou nazývány katechiny a další dva v *cis* konfiguraci – epikatechiny. Nejběžnějším je isomer (+) katechin [HIGDON, 2003].

Obrázek 5: Strukturní vzorec katechinu [VELAYUTHAM; LIU, 2008]



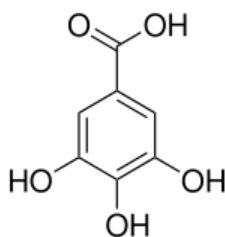
Katechiny jsou látky podobné svým složením flavonoidům. Jedním z nejvýznamnějších zdrojů katechinů je *Camelia sinensis*. Katechiny jsou zde hlavními polyfenolickými sloučeninami. Nálev ze zeleného čaje obsahuje kolem 1 g/l katechinů [KHAN; MUKHTAR; 2007]. Jeho dlouhodobé pití v tradičních oblastech pozitivně působí v prevenci onemocnění srdce a cév, vývoje žaludečních vředů a rakoviny tlustého střeva [MUKHTAR; AHMAD, 2008]. V černém čaji je jeho obsah redukován asi na polovinu, v důsledku oxidace na komplexnější polyfenoly během fermentace [ZHANG *et al.*, 2008]. Klinické experimentální studie prokázaly pozitivní vliv katechinů potlačující krevní destičky, tím že inhibují trombogenezi [RICE-EVANS *et al.*, 1997].

1.1.2 Fenolové kyseliny

Tyto kyseliny se nacházejí ve formě vázané tak ve formě esterifikované. Jsou to metabolity široce rozšířené v celé rostlinné říši. Tvoří přibližně jednu třetinu polyfenolů v lidské potravě. V naší stravě jsou fenolické kyseliny zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami ve formě esterů [LUŠTINEC; ŽÁRSKÝ 2003]. Nejčastěji je to kyselina kávová, ferulová nebo gallová. Nejběžnějším esterem kyseliny kávové je pak kyselina chlorogenová (5-caffeoylchinová kyselina), která je přítomna v řadě druhů ovoce a zeleniny a také v kávě. Jeden šálek kávy obsahuje 50 – 150 mg kyseliny chlorogenové. Konzumenti kávy tak mohou přijímat více fenolových kyselin než flavonoidů. Fenolové kyseliny se také nachází v bramborách [CLIFFORD; SCALBERT, 2000].

Kyselina ferulová je obvykle asociována s potravinovou vlákninou a je v ní esterovou vazbou vázána k hemicelulose tzn., že vláknina je využitelná. Jedním z hlavních zdrojů kyseliny ferulové jsou tak např. pšeničné otruby. Kyselina gallová se vyskytuje ve formě esterů, např. v galotaninech (mango), kde je navázána na glukosu. Významný zdroj kyseliny gallové představuje *Camelia sinensis*. Čajové lístky mohou obsahovat až 4,5 g/kg kyseliny gallové v čerstvé hmotnosti [KING; YOUNG, 1999]. Dále do této skupiny se zařazují kondenzované taniny (trísloviny). Ve fenolických kyselinách jsou esterifikovány polyhydroxysloučeninami, nejčastěji glukosou. Taniny obecně přispívají k astringentním vlastnostem ovoce [LEE *et al.*, 1990].

Obrázek 6: Strukturní vzorec kyseliny galové [VALLS *et al.*, 2009]



Nejnovější zájem o fenolové kyseliny pochází z jejich potenciální ochranné úlohy proti oxidačním onemocněním (ischemická choroba srdeční, cévní mozková příhoda a rakovina) [SLANINA; TÁBORSKÁ, 2004].

1.2 Biologické účinky polyfenolů

Polyfenoly vykazují široké spektrum biologických účinků [FRANKEL *et al.*, 1993]. Chrání DNA před oxidačním poškozením v souvislosti s rozvojem některých druhů forem rakoviny [HALLIWELL, 1999]. Především rakoviny plic trávicího traktu, rakoviny prsu u žen a rakoviny prostaty u mužů [LE MARCHAND *et al.*, 2000].

Výsledky epidemiologických a experimentálních studií *in vitro* u člověka a na zvířatech ukázaly, že polyfenoly obsažené ve víně, čaji, ovoci a zelenině působí příznivě na progresi i regresi aterosklerózy. Řada experimentů na nádorových buňkách prokázala antikarcinogenní účinky rostlinných polyfenolů. Svými antioxidačními účinky působí proti dalším procesům souvisejícím s tvorbou reaktivních forem kyslíku a peroxidací lipidů v krevní plazmě a membránách. Polyfenoly působí proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snižují riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice [DUTHIE *et al.*, 2003]. Také byla prokázána antimikrobiální vlastnost. Některé polyfenoly byly mutagenními v mikrobiálních testech a co-karcinogenů [CHUNG *et al.*, 1998]. Podle nejnovějších poznatků se polyfenoly mohou podílet i na prevenci osteoporózy, neurodegenerativních onemocnění a diabetu [SCALBERT *et al.*, 2005].

V podkapitolách bude věnována pozornost pouze některým polyfenolům, z důvodu jejich významné biologické účinnosti.

1.2.1 Flavonoidy

Flavonoidy mají antitrombotické, protizánětlivé, močopudné, protikřečové, hepatoprotektivní a hypocholesterolické účinky [GERRITSEN *et al.*, 1995]. Brání zahájení, propagaci a progresi nádorů popř. jiného mechanismu a je o ně velký zájem z hlediska jejich antioxidační aktivity vzhledem k potenciálu v oblasti podpory zdraví a prevence nemocí [CAZAROLLI *et al.*, 2008]. Vykazují antioxidační, antiaterogenní, antikarcinogenní a imunomodulační funkce. Některé z flavonoidů působí jako inhibitory topoisomerasy a induktory apoptosy. V této souvislosti je studován jejich antikarcinogenní účinek [HOUR *et al.*, 1999].

1.2.2 Kvercetin

Kvercetin je jedním z biologicky aktivních flavonoidů. Jeho preventivní a léčivé účinky jsou založeny především na faktu, že působí jako silný antioxidant, tzn., že působí proti zánětům dále proti růstu některých rakovinných buněk a kardiovaskulárnímu onemocnění. Dále působí proti trombóze, pomáhá bránit vzniku krevní sraženiny, brání poškození cév volnými kyslíkovými radikály a oxidovaným cholesterolem LDL a pomáhá udržovat cévy čisté a průchodné. Významný je jeho účinek na tlumení alergických reakcí včetně astmatu nebo po bodnutí hmyzem tím, že potlačuje uvolnění histaminu z buněk [ZEE *et al.*, 2010].

1.2.3 Resveratrol

Na základě vědeckých studií se ukázalo, že resveratrol má protektivní účinky na kardiovaskulární systém, ovlivňuje metabolismus lipidů, inhibuje oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) a agregaci trombocytů. Tato látka také vykazuje antikarcinogenní a protizánětlivé vlastnosti a má antioxidační, antimutagenní účinky [FLÉMOND, 2000].

1.2.4 Katechiny

Katechiny mají antiproliferační, protizánětlivé, antitrombogenní a hypolipidemické účinky a působí proti vysokému krevnímu tlaku. Katechiny vyskytující se v zeleném čaji inhibují vývoj karcinomu prsní žlázy u krys. Tyto látky mají významnou zhášecí aktivitu na singletový kyslíkový radikál a brání peroxidaci tuků, což je velmi významné u mikrosomálních membrán. Katechiny mají schopnost inhibovat tvorbu tromboxanu a snižovat hladinu cholesterolu v krvi [CRESPY; WILLIAMSON, 2004].

1.2.5 Antokyany

Antokyany vykazují antioxidační, antikarcinogenní imunitu stimulující antibakteriální, antivirové a antialergické vlastnosti a proto jejich potřeba může přispět k prevenci některých degenerativních onemocnění, jako jsou kardiovaskulární a zánětlivé onemocnění a také cukrovky [BONERZ *et al.*, 2006].

1.2.6 Antioxidační účinky polyfenolů

Antioxidační účinek polyfenolů je komplexní a lze jej přičíst několika mechanismům:

- Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu (např. xantinoxidasu, proteinikinasu C). Inhibují i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů (cyklooxygenasa, lipooxygenasa, mikrosomální monooxygenasa atd.) [ŠTÍPEK a kol., 2000]. Flavonoidy jsou známé především pro svou antioxidační aktivitu. Antioxidační schopnost flavonoidů *in vitro* je silnější než u vitamínu C a E [RICE-EVANS *et al.*, 2002].
- Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se účastní při tvorbě reaktivních kyslíkových forem např. při fentonově reakci [LUŠTINEC; ŽÁRSKÝ 2003].
- Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná. Snadnost oxidace závisí na redoxním potenciálu. Látky s nízkou hodnotou redox potenciálu jsou schopny redukovat některé volné radikály s oxidačními účinky, např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Při reakcích poskytují vodík a sami se přitom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxyllový radikál nebo neradikálovou chinoidní strukturu. Význam reakce spočívá v tom, že radikály jsou eliminovány dříve než reagují s dalšími buněčnými komponenty [GERRITSEN *et al.*, 1995].

2 VÝSKYT POLYFENOLŮ V JEDLÝCH KVĚTECH

Jedlé květy jsou dobrým zdrojem polyfenolů. Obsah polyfenolů v jedlých květech se pohybuje v rozmezích vyšších než 70 mg/g [SUGUWARA; IGARASHI, 2009].

2.1 Sedmikráska chudobka (*Bellis perennis*)

Bellis perennis je malá vytrvalá bylina z čeledi *Asteraceae* – hvězdnicovité. Vyskytuje se hojně na loukách po celé Evropě, Západní Asii, Severní a Jižní Americe a na Novém Zélandě [YOSHIKAWA *et al.*, 2008]. Květy a mladé listy se používají jako zelenina. V lidovém léčitelství se používá jako prostředek usnadňující vykašlávání a jako diuretikum – močopudný prostředek. *Bellis perennis* má protizánětlivé a hojivé účinky. Fenolové složky *Bellis perennis* obsahují flavonoidy, antokyany, třísloviny a fenolové kyseliny (např. kyselina kávová, ferulová, p-kumarová a salicylová). Z flavonoidů byly popsány: kvercetin, apigenin, kaempferol, isorhamnetin, apigenin-7-*O*- β -D-glukosid, apigenin-7-*O*- β -D-glukuronid, apigenin-7-*O*-(6''-*E*-caffeoil)- β -D-glukosid, apigenin-7-*O*- β -D-methylglukuronid, isorhamnetin-3-*O*- β -D-(6''-acetyl)-galaktosid a kaempferol-3-*O*- β -D-glukosid [NAZARUK; GUDEJ, 2001]. *Bellis perennis* dále obsahuje saponiny triterpenoidních polyacetylenů a eterické oleje. Obsah fenolických látek a flavonoidů v květech *Bellis perennis* se liší v malém rozsahu v průběhu roku [SIATKA; KAŠPÁRKOVÁ, 2010].

2.2 Smetánka lékařská (*Taraxacum officinale*)

Taraxacum officinale je vytrvalá bylina z čeledi *Asteraceae* - hvězdnicovité. Vyskytuje se na severní polokouli. Mladé listy jsou konzumovány čerstvé, jako salátová zelenina. Kořeny se používají jako náhražky kávy. Extrakty se využívají jako příchuťové komponenty do různých potravinářských výrobků, včetně alkoholických nápojů, nealkoholických nápojů, mražených mléčných dezertů, cukroví, pečiva, želatiny a pudinků [NEWALL *et al.*, 1996]. Dále se bylina zpracovává na farmaceutické přípravky, čaje, tinktury a tablety. Tyto bylinné léčivé přípravky se používají pro své choleretické, močopudné, antirevmatické, protizánětlivé, projímavé účinky a jejich stimulační vlastnosti se využívají pro léčbu onemocnění jater, žlučníku, zažívacích potíží, artritických a revmatických onemocnění [LEUNG; FOSTER 1996].

V listech *Taraxacum officinale* byly pomocí metody HPLC (kapalinové chromatografie) zjištěny různé flavonoidy glykosidů např. luteolin 7-*O*-glukosid, luteolin 7-*O*-rutinosid, isorhamnetin 3-*O*-glukosid a apigenin 7-*O*-glukosid. Antioxidační a cytotoxické vlastnosti výtažků z květů *Taraxacum officinale* se mohou částečně přičíst přítomnosti luteolinu a luteolinu 7-*O*-glukosidu [HU; KITTS, 2003]. Kvercetin glykosid nalezený v květech a v listech byl identifikován jako kvercetin 7-*O*-glukosid. V celé rostlině se vyskytuje nevíce fenolických sloučenin hydroxyderivátů kyseliny skořicové, zejména esterů kyseliny kávové, jako je kyselina chlorogenová a kávová. V tkáňových listech byly charakterizovány dva kumariny chirorin a aeskulin [WILLIAMS *et al.*, 1996].

2.3 Čekanka obecná (*Cichorium intybus*)

Cichorium intybus je bylina, která se vyskytuje v Evropě, Západní Asii, Egyptě, Severní Americe a Itálii. Je to vytrvalá bylina s jasně modrými květy, vzácně má květy bílé nebo růžové. Různé odrůdy se pěstují na listy salátu nebo kořeny, které se používají jako náhražka kávy. V molekule *Cichorium intybus* byly charakterizovány tyto polyfenoly: kyselina monokafeoyl vinná, kyselina kávová, kyselina chlorogenová, kvercetin-3-*O*-glukuronid, luteolin-7-*O*-glukuronid a kvercetin-3-*O*-glukosid. V nadzemních částech rostliny byla zjištěna přítomnost kyseliny vinné, chlorogenové, cyanidinu 3-*O*-glukosidu, delfinidinu 3-*O*-(6''- malonylu) glykosidů a kyanidinu 3-*O*-(6''- malonylu). Kvercetin-3-*O*-glukuronid a luteolin 7-*O*-glukuronid v nadzemních částech rostliny nejsou přítomny [MULINACCI *et al.*, 2001]. *Cichorium intybus* povzbuzuje chuť k jídlu, působí mírně projímavě, močopudně a žlučopudně, má vliv na látkovou výměnu, užívá se při žlučových kamenech, zánětech močových cest, při nechutenství a zácpě [WANG; CUI, 2011].

2.4 Bez černý (*Sambucus nigra*)

Sambucus nigra je rozšířený druh z čeledi *Caprifoliaceae* – zimolezovité, který roste na slunečných místech ve většině částí Evropy, Asie, Severní Afriky a USA. Jedná se o opadavý keř s bílými květy dosahující výšky až 6 metrů, s plody dozrávajících na konci léta. *Sambucus nigra* se používá nejen k okrasným účelům, ale jeho výtažky se používají k aromatizaci nápojů a potravin. Bobule se celosvětově využívají jako lék nebo jako zdroj potravinových doplňků a většinou se zpracovává na šťávy [CHRISTENSEN *et al.*, 2007]. Šťáva ze *Sambucus nigra* se vyznačuje vysokým obsahem antokyanů, které jsou důležitými

indikátory kvality ovoce, protože ovlivňují jeho vzhled a chuť. Antokyany jsou látkami, působící proti oxidačnímu stresu a snižují oxidační poškození lidského těla [DEL CARO; PIGA, 2008]. Hlavním antokyanem vyskytující se v plodech *Sambucum nigra* je kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, kyanidin 3,5-diglukosid, kyanidin 3-sambubiosid, kyanidin 3-glukosid a 3-kyanidin rutinosid. Kyanidin 3-sambubiosid je antokyanem, který tvoří více než polovinu všech antokyanů vyskytujících se v ovoci *Sambucus nigra*. Dále se v bobulích *Sambucus nigra* vyskytují skupiny flavonolů. Z této skupiny jsou zde obsaženy kvercetiny, a to především kvercetin 3-rutinosid a kvercetin 3-glykosid [VEBERIC *et al.*, 2009].

2.5 Jerlín vikvolistý (*Sophora viciifolia*)

Sophora viciifolia patří do čeledi *Fabaceae* (*Leguminosae*) – bobovité. V přírodě roste v podobě nízkého, hustého keře v nadmořské výšce 2000 – 3500 m. n. m., v pustinných oblastech Číny a je hlavně distribuován v provinciích Yunnan, Guizhou, Sichuan a Ninxia [GAO, 2006]. Květy jsou zbarvené do bělavě modré až tmavě modré barvy. *Sophora viciifolia* se používá jako zdravé jídlo, vařené s vejcem masem nebo kuřetem. Využívá se jako prostředek na odstranění pocení, vysokých horeček a otoků [WEN; MAO, 2006]. V květech *Sophora viciifolia* se vyskytuje devět flavonoidů: luteolin, kvercetin, vicenin-2, saponarin, 3', 5, 7-trihydroxy-4'-methoxyflavon-3-O- α -L- rhamnopyranosyl, (1-6)- β -D-glukopyranosid, sophorikosid, 8-O-methylherbacetin-3-O-sophoresid isosakuranin a tricetin-7-O- β -glukopyranosid. Flavonoidy izolované z květů *Sophora viciifolia* vykazují protizánětlivé i imunologické funkce a antioxidační aktivitu. Studie naznačují, že květ *Sophora viciifolia* může poskytnout cenné funkční složky a může být použit k prevenci nemocí spojených s různými oxidačními produkty lidského metabolismu [ZHIGANG *et al.*, 2011].

2.6 Šťovík kyselý (*Rumex acetosa*)

Rumex acetosa je vytrvalá rostlina distribuovaná po celém světě v oblastech s mírným klimatem. Nadzemní části této rostliny se používají v potravinářských technologiích, a mají fototerapeutické použití. Léčivé aplikace se vztahují k obsahu taninu v rostlině, což vede na adstringentní účinky, které jsou užitečné při léčbě průjmů a podráždění kůže.

Moderní fototerapeutické přípravky léků obsahující výtažky z *Rumex acetosa* se používají pro léčbu akutních chronických infekcí horních cest dýchacích. U nadzemních částí rostliny bylo zjištěno, že obsahují flavonoidy (rutin, hyperosid, kvercetin, isoorientin a jejich acetyl deriváty), kyselinu šťavelou, flavan-3-oly, katechiny, epikatechiny a fenolové kyseliny (kyselinu gallovou, protokatechinovou (PCA), ferulikovou a *P*-kumarovou) [BICKER *et al.*, 2009].

2.7 Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*)

Salvia officinalis patří mezi cca 900 druhů rostlin z čeledi *Lamiaceae* – hluchavkovité. Pěstuje se hojně na celém světě a používá se pro svoji chuť, jako lidové léčivo a pro kulinářské účely. Sušený kořen *Salvia officinalis* se používá pro léčbu ischemické choroby srdeční, žloutenky, chronického selhání ledvin a nespavosti. V posledních letech byla velká pozornost směřována na biologicky aktivní, vodou rozpustné složky odvaru sušeného kořene, který se používá v tradičním lékařství. V Číně vedly tyto studie k izolaci a identifikaci velkého množství metabolitů kyseliny kávové, z nichž mnohé mají různé biologické činnosti, včetně antioxidačních, antiagregačních, antikarcinogenních a antivirových účinků [LI, 1998]. *Salvia officinalis* je bohatým zdrojem polyfenolů, bylo v ní identifikováno více než 160 polyfenolů, z nichž některé jsou specifické pro jeho rod. Fenolové kyseliny tvoří podstatnou část ve vodě rozpustných složek odvaru *Salvia officinalis*. Kyselina kávová a její deriváty tvoří podstatnou část rodu *Salvia*. Kyselina kávová hraje ústřední roli v biochemii čeledi *Lamiaceae* a vyskytuje se převážně ve formě dimeru, jako rosmarinová kyselina. Kyselina kávová je stavebním kamenem různých rostlinných metabolitů, které se skládají z více jednoduchých monomerů [WANG *et al.*, 2000]. Její trimery a tetramery jsou zajímavé z terapeutického hlediska, neboť bylo prokázáno, že mají významnou biologickou aktivitu. V *Salvia officinalis* jsou široce zastoupeny flavonoidy. Většina flavonoidů jsou flavonoly apigeninu a luteolinu. Dále se zde vyskytuje kaempferol a kvercetin [ZHANG; LIU, 1996].

3 POLYFENOLY ČAJE A KÁVY

Zelený čaj se vaří z nekvašených sušených listů rostlin – *Camelia sinensis*. Typický čajový nápoj je připravený v poměru 1 g čajových lístků na 100 ml horké vody a nechá se 3 minuty vyluhovat [KRIS-ETHERTON; KEEN, 2002]. Stejně jako ostatní přírodní produkty, listy této rostliny obsahují řadu fytochemikálií, které se liší v koncentraci v období sklizně, stáří rostlin, podnebí, životního prostředí a podmínek zpracování [LIN *et al.*, 2003]. Převládající složky zeleného čaje představují polyfenoly, které tvoří v sušině až 35 %. Zahrnují flavonoly, flavanony a flavan-3-oly. Z toho 60 – 80 % je flavan-3-ol, známý jako katechin [COOPER *et al.*, 2005]. Hlavní katechiny zeleného čaje jsou (-)-epikatechin (ES), (-)-epikatechin-3-gallát (EKG), (-)-epigalokatechin (EGC) a (-)-epigalokatechin-3-gallát (EGCG). EGCG je nejvíce zastoupeným katechinem v zeleném čaji a představuje 50 – 80 % celkového obsahu katecheninu. Dále následuje EGC (9 – 12%), EKG (9 – 12 %) a ES (5 – 7%) [KHAN; MUKHTAR, 2007]. EGCG je považován za bioaktivní složku zeleného čaje. Zbývajícími pevnými látkami vyskytujícími se v zeleném čaji jsou kofein, teanin, teaflavin, tearubigin, kvercetin, kyselina gallová a chlorogenová. Obsah katechinů v zeleném čaji je ovlivněn několika faktory, jako je sušení, stupeň prokvášení, nebo příprava kofeinu [MUKHTAR; AHMAD, 2000].

3.1 Kardiovaskulární působení zeleného čaje

Některé studie ukazují, že zelený čaj může působit ochrannými účinky proti kardiovaskulárnímu onemocnění (KVO). Počet KVO stále roste po celém světě, nejvíce v americké populaci, kde s KVO žije až jedna čtvrtina populace. Několik epidemiologických studií uvádí pozitivní vztah mezi příjmem zeleného čaje ve snížení rizika KVO. V rocích (1995 – 2005), byl proveden 11-letý průzkum. U 40 000 japonců ve středním věku, kteří pili více než dva šálky zeleného čaje denně, se snížilo riziko KVO o 22 až 33 %, ve srovnání s těmi, kteří pili denně méně než půlku šálku zeleného čaje [KURYAMA *et al.*, 2006].

3.2 Polyfenoly kávy

Káva je hlavním zdrojem kyseliny chlorogenové. Zelená kávová zrna obsahují 6 – 10 % kyseliny chlorogenové v sušině. Existují zprávy ukazující na její antioxidační aktivitu *in vitro*. Obecným názvem chlorogenová kyselina se označují všechny přírodní estery chinové kyseliny [MOREIRA *et al.*, 2001]. Mezi hlavní chlorogenové kyseliny v zelených zrnkách kávy patří kaffeoylchinové, dikaffeoylchinové a feruloylchinové kyseliny. Tyto kyseliny jsou důležité pro tvorbu pigmentů, chuť a aroma nápojů z kávy [ANDRIOT *et al.*, 2004]. Káva obsahuje vysoký obsah fenolických kyselin především kyselinu kávovou, chlorogenovou, kumarovou a ferulovou, které významně přispívají k celkovému příjmu polyfenolů v lidské stravě. Bylo zjištěno, že fenolické antioxidanty přirozeně se vyskytující v kávě jsou ztraceny během procesu pražení. Tento proces je spojen s degradací kyseliny chlorogenové [OLTHOF *et al.*, 2001].

4 ZÁKLADNÍ VYBAVENÍ LABORATOŘE TKÁŇOVÝCH KULTUR

Práce s tkáňovými kulturami vyžaduje zvláštní vybavení – vhodně vybavenou laboratoř, vyškolené pracovníky, zvláštní spotřební materiál a chemikálie prosté některých běžných kontaminantů. To přináší i organizační a ekonomické nároky na provoz laboratoře. Jedním z hlavních požadavků je udržení sterility a zabránění kontaminacím. Je vhodné pracovat ve vyhrazené čisté laboratoři podléhající speciálnímu režimu [LUTZ *et al.*, 1992]. Speciální režim lze definovat laminárními boxy – biohazardy typu I, II, III. Laminární box – biohazard třídy II je určen pro aplikaci vyžadující laminární (vertikální) proudění vzduchu, pro ochranu produktu před částicovou a bakteriální kontaminací a současně požadující ochranu pracovníka a okolí před vlivem zpracovaného produktu. Je vybaven filtry s póry 0,3 μM (HEPA filtry) a box je denně sterilizován UV lampou. Biohazard třídy III vyžaduje vertikální proudění vzduchu a používá se pro práci s patogenním materiálem a nebezpečnými organismy. V laboratoři tkáňových kultur se většinou používají laminární boxy - Biohazard třídy II. Dále k základnímu vybavení patří inkubátor s řízenou atmosférou a s regulací teploty (zvýšený parciální tlak oxidu uhličitého, vysoká relativní vlhkost), inverzní mikroskop vybavený fázovým kontrastem (Nomarského – vnitřní struktura buněk, Hoffmanův – plastické znázornění povrchů), centrifuga (na odstředění buněk), vodní lázeň (nastavena na 37°C, slouží k ohřívání médií, rozmrazování zamražených aliqotů, reagensů a buněk), lednice a mrazáky. Vodní lázeň se mění každý týden a je vhodné do ní přidat thimerosal. Kontejner s tekutým dusíkem (- 196°C), nebo extrémně hluboko mrazicí box (- 150°C), autokláv (parní sterilizátor), pipetor (manuální nebo elektronický), automatické pipety. Je třeba disponovat řadou dalších přístrojů a pomůcek. Používá se sterilní jednorázový plast, kultivační nádoby s upraveným povrchem a chemikálie určené pro práci s buněčnými kulturami [FRESHNEY, 2010].

4.1 Prevence

Laboratoř tkáňových kultur je pokud možno oddělená od ostatních prostorů, nevětrá se okny, ale přes ventilační systém s filtrací. Pravidelně se provádí úklid a desinfekce povrchů (prostředky na bázi chlóru – savo, jódu – ajatin, 70 % EtOH...) Laboratoř je periodicky ozařována germicidní lampou (širokospektré UV). Pracovníci, kteří zde pracují, musí mít oblečení určené jen pro tuto laboratoř a před vlastní prací si desinfikují ruce příslušnými

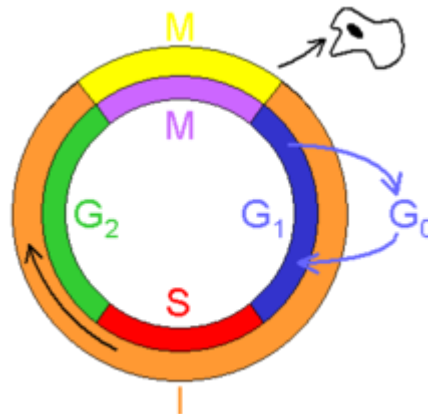
prostředky (min. 70 % etanolu). S kulturami se pracuje pokud možno pouze ve Flow-boxu [FRESHNEY, 2005].

5 BUNĚČNÉ KULTURY

Buněčné kultury dnes patří mezi nejpoužívanější biologické modely používané ve výzkumu. Buněčná kultivace je složitý proces, při kterém jsou buňky pěstovány za definovaných podmínek. Jednou z nejdůležitějších strategií pro poznání buněčného cyklu a mnoha dalších otázek buněčné biologie, je pěstování buněk mnohobuněčného organismu *in vitro*. Buněčné kultury mají velmi mnohostranné využití. Jejich kontinuálním sledováním je možno přímo pozorovat řadu buněčných procesů (růst, dělení, rozmnožování apod.). Je možno přímo sledovat působení vnějších faktorů fyzikálních i chemických látek. Vnější faktory mohou buněčný cyklus ovlivnit buď kvantitativně tj. ovlivní délku cyklu, nebo kvalitativně tj. buněčný cyklus zastaví nebo zahájí [NEČAS a kol., 2000].

5.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je uspořádaný sled událostí, při kterých buňka zdvojí svůj obsah a následně se rozdělí na dvě buňky dceřiné. Během buněčného cyklu musí být genom replikován pouze jedenkrát, organely a makromolekuly adekvátně zduplikovány a následně rozděleny (segregovány) do dvou dceřiných buněk. Při pohledu do mikroskopu jsou nejdramatičtějšími událostmi dělení jádra (mitóza) a dělení buňky na dvě (cytokyneze) [ALBERTS *et al.*, 2002]. Oba procesy spolu tvoří M-fázi buněčného cyklu. Doba mezi dvěma M fázemi se nazývá interfáze, během této fáze se buňka připravuje na buněčné dělení. Během celé inerfáze buňka přepisuje své geny, syntetizuje proteiny a zvětšuje svoji velikost. Skládá se ze tří fází: G1, S a G2 fáze. Během S-fáze buňka replikuje svoji DNA, což je základní předpoklad pro buněčné dělení, a syntetizuje specifické proteiny asociované s DNA. S-fáze se nachází v mezeře mezi dvěma fázemi, ve kterých buňka roste. Trvání S-fáze je u různých buněk různé, ale u dané buňky vysoce konstantní. V cyklu živých buněk zaujímá 30-50 %. G1-fáze je období mezi koncem M-fáze a začátkem S-fáze. V G1-fázi buňka zvětšuje svoji velikost a zdvojují se organely [CAMPBELL *et al.*, 2006]. G2-fáze je stádium buněčného cyklu mezi koncem S-fáze a začátkem M-fáze. V G2-fázi probíhá syntéza proteinů potřebných pro vstup do mitózy. Buňka v nepříznivých podmínkách nebo při obdržení příslušných inhibičních, extracelulárních signálů, může setrvat v G1-fázi nebo vstoupí do klidové G0-fáze. V této fázi buňky obvykle nerostou a v tomto stavu mohou zůstat několik dnů, týdnů až měsíců [ALBERTS *et al.*, 1998].

Obrázek 7: Buněčný cyklus [CAMPBELL *et al.*, 2006]

5.2 Receptory na buňkách

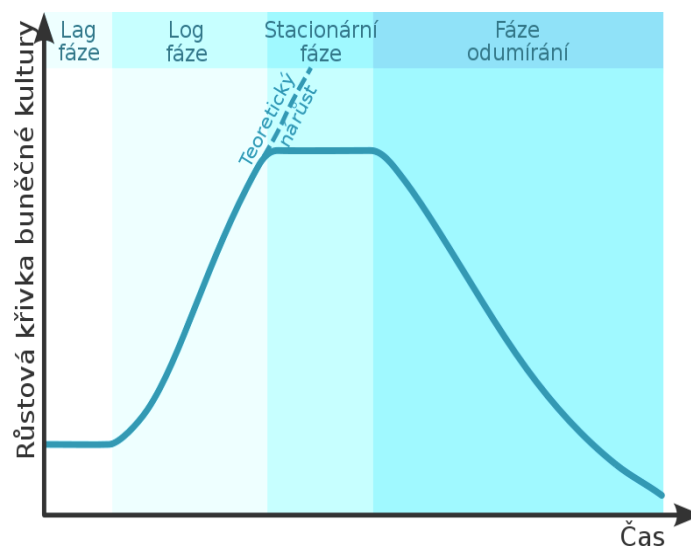
Na povrchu buněk je plejáda molekul, které se nazývají receptory. Většina povrchových receptorů patří do jedné ze tří velkých rodin: receptory spojené s iontovými kanály, receptory spojené s G – proteiny a receptory spojené s enzymy. Tyto tři rodiny se liší podstatou signálu, který vytvářejí uvnitř buňky, když se na ně naváže extracelulární signální molekula. U receptorů spojených s iontovými kanály je to tok iontů, vedoucí k elektrickým jevům [ALBERT *et al.*, 2002]. U receptorů spojených s G proteiny je to aktivovaná forma membránového proteinu, která se uvolní a difunduje v rovině plasmatické membrány, kde vyvolá kaskádu dalších pochodů. V případě receptorů spojených s enzymy se na cytoplazmatickém konci receptoru změní jeho enzymová aktivita a díky ní se tvoří řada signálů, včetně molekul, které jsou uvolňovány do cytosolu. Obrovské množství různých buněčných povrchových receptorů, které tělo vyžaduje pro své vlastní signalizační účely, se může stát také cílem mnoha cizích látek, které ovlivňují naše fyziologické pochody a cítění, od heroínu a nikotinu, až po tisíce prostředky a pálivou papriku. Tyto látky buď napodobují přirozený ligand receptoru, aby zaujaly normální místo pro jeho vazbu, nebo se vážou na receptor v jiném místě, a tak blokují nebo nadměrně stimulují přirozenou aktivitu receptoru. Takto působí mnoho drog a jedů a velká část farmaceutického průmyslu se věnuje hledání látek s přesně definovanými účinky vyvolanými vazbou ke specifickému receptoru na povrchu buněk [CAMPBELL *et al.*, 2006].

5.3 Růst buněk v tkáňových kulturách

Růst buněk může probíhat v médiu tak, že se buňky v kultuře nedělí – je třeba periodicky měnit kultivační médium (terminálně diferenciované a postmitotické buňky), nebo se buňky v kultuře dělí – proliferují, pak je třeba je pasážovat. Do druhé skupiny se zařazuje většina buněk primokultur i permanentních linií [STOKER, 1973].

Pasážování je periodické ředění buněk, pro uvolnění buněk z povrchu [WESTERMARK; WASTESON, 1975]. Z enzymů se používá trypsin, kolagenáza, ale také se dá použít inaktivace speciálními inhibitory, vyředěním a nebo nadbytkem proteinů (např. sérem). Přidávají se také látky podpurné – EDTA na vychytávání Ca_2 . Proliferaci buněk v kultuře charakterizuje růstová křivka s 4 fázemi.

Obrázek 8: Růstová křivka [FREHNEY, 2010]



Růstová křivka má následující fáze:

- Lag fáze – zde buňky nerostou, u primokultur jejich počet dokonce klesá.
- Logaritmická (růstová fáze) – zde počet buněk exponenciálně roste, buňky využívají pro svůj metabolismus všechny živiny.
- Stacionární – buňky zde dosahují tzv. saturační density, která je dána kontaktní inhibicí, u nádorových buněk většinou chybí – vytváří další vrstvu, nebo začnou růst suspenzně, dále ji charakterizuje vyčerpání živin, hromadění metabolitů a toxinů, méně vhodné pH, přítomnost inhibitorů růstu

- Fáze odumírání - konečná fáze, udržení kultury již není možné, protože zde došlo k vyčerpání živin, poklesu pH, hromadění metabolitů (např. CO₂) a toxinů, v této fázi je nutné převést buňky na nové médium [FRESHNEY, 2010].

Dále je buněčná proliferace charakterizována: Buněčnou denzitou (počet buněk na ml nebo cm²). Konfluencí (počet buněk na plochu u adherentních linií). Dobou mezi dvěma mitózami/ rozdělenými buňkami tzv. generační doba = délka buněčného cyklu. Časem potřebným ke zdvojnásobení buněk v populaci = population doubling time a Hayflicikovým limitem (v případě většiny primokultur to je počet možných dělení, buněčně specifické senescence = stárnutí buněk, quiescence = klid / spánek buněk [BUTLER, CHRISTIE, 1994].

5.4 Analýza viability a apoptózy

Viabilita je životaschopnost nebo-li schopnost přežití buněk. Apoptóza je programovaná buněčná smrt, sloužící k eliminaci nepotřebných či poškozených buněk, kdy se jedná o zánik jednotlivé buňky způsobený aktivací cysteinových proteáz kaspáz a následně pak pomocí jaderných endonukleáz dochází k poškození jaderné DNA a k zástavě všech biosyntetických pochodů v buňce. Analýza viability a apoptózy se provádí pomocí testů založených na 1) kompaktnosti zdravé buňky a jejím správném chování a 2) na testech založených na stanovení biochemických a molekulárně biologických parametrů. U prvně zmíněných testů se pozorují morfologické změny (apoptická tělíska, výběžky...), schopnost vylučovat barviva živými buňkami (aeosin, bromfenolová modř pro detekci ve VIS spektru, propidium iodid pro fluorescenci: mikroskopicky, FACS), enzymatická aktivita, nejčastěji esterázy [ALBERTS *et al.*, 1998]. U adherentních buněk lze hodnotit počet adherovaných a plovoucích (mrtvých / apoptických) buněk či změny ve struktuře cytoplazmatických membrán (anexin / fosfatidylserin). Mezi druhé testy se řadí: Fragmentace DNA (elektroforeticky = tzv. apop. žebříček DNA, in situ = Tunel test), aktivita specifických proteáz – kaspázy, detekce fragmentace substrátů kaspáz, hladiny pro anti-apoptické proteiny rodiny Bcl-2, a kompaktnost mitochondrií (změny v polarizaci mitochondriální membrány, vylití cytochromu c.) [FRESHNEY; FRESHNEY, 2002].

5.4.1 Testy viability

5.4.1.1 Počítání buněk

Pro přesné stanovení počtu buněk je možné použít počítání buněk v mikroskopu v cytometrické komůrce (např. Bürkerova nebo Türkerova komůrka, hemocytometr) anebo počítání v přístroji (Coulter counter).

Přesnost metody počítání buněk v mikroskopu v cytometrické komůrce je ovšem vyvážena její pracností a časovou náročností. Suspenze buněk se před počítáním mísí s roztokem methylenové či trypanové modři, který difunduje přes plazmatickou membránu do intracelulárního prostoru. Methylenovaná modř prostupuje pouze do mrtvých buněk s narušenou strukturou plazmatické membrány a následně se uvnitř buňky hromadí, tím lze odlišit živé buňky od mrtvých. Živé buňky s inaktní plazmatickou membránou zůstávají totiž nezbarvené, nebo jsou jen velmi slabě zbarvené, protože methylenovaná modř plazmatickou membránou neprochází.

Rychlejší metodou je průtoková cytometrie. Nevýhodou je, ale potřeba poměrně drahého přístroje, a je zde nutnost přístroj kalibrovat na každý buněčný typ. Stanovuje-li se počet buněk opakovaně za přesně definovaných podmínek, lze s výhodou použít rozptylu světla na buněčné suspenzi a měřit hustotu suspenze turbidimetricky. Další metodou je stanovení koncentrace některých buněčných součástí. Nejčastěji se měří množství celkových bílkovin ve vzorku, je ovšem nutné zabránit zkreslení bílkoviny séra, které se přidává do kultivačního média, nebo koncentrace DNA. Někdy se využívá také stanovení aktivity vhodného enzymu [HEINRICH *et al.*, 2009].

5.4.1.2 MTT test

MTT test – test cytotoxicity je založen na stanovení celkové metabolické aktivity buněk, ze které se extrapolují buněčné počty. Využívá se zde redukce derivátu tetrazoliového bromidu (MTT). Živé buňky zde mají schopnost produkovat koenzymy, které přeměňují chemickou sloučeninu na barevný produkt, který lze kvantifikovat pomocí fotometrie. MTT přidané k buňkám (obvykle na 4 hodiny), je metabolicky přeměněna na ve vodě nerozpustný formazan, ten se rozpustí a na elisareaderu měříme zbarvení při 550 – 600 nm. Výhodou této metody je, že ji lze provádět na kultivační destičce, tudíž není potřeba buňky

přenášet a lze ji použít pro všechny typy buněk a je levná. Nevýhodou je závislost absorbance na koncentraci je lineární jen v omezeném rozsahu [FRESHNEY, 2005]. Na stanovení enzymatické aktivity se používají testy využívající tetrazoliové soli např. (MTT, XTT, WST-1), které jsou redukovány na barevné formazany, které se dají stanovit spektrofotometricky (různé tetrazoliové soli jsou různě citlivé pro jednotlivé enzymatické (oxidačně redukční, NADP) systémy a i vhodné pro různé typy buněk) [ROEHM *et al.*, 1991].

5.4.1.3 Detekce funkčního metabolismu buněk

Jde o zjišťování přítomnosti produktu metabolismu, který má jiné vlastnosti než substrát, z něhož vzniká. Principem těchto testů je schopnost živé buňky metabolizovat substrát na derivát, který je možno následně detekovat či kvantifikovat např. měřením fluorescence. Na tomto principu je postaven také test životnosti buněk pomocí FDA (fluorescein diacetát). FDA je nepolární látka, která snadno prochází plazmatickou membránou. V živých buňkách je metabolizována na vysoce polární fluorescein, pro který je už membrána nepropustná, a proto dochází k jeho hromadění uvnitř buňky. Fluorescein se na rozdíl od FDA vyznačuje fluorescencí, kterou je možné detekovat. Fluorescence fluoresceinu je značně závislá na pH. Emisní vlnová délka záření pro fluorescein je 490/513 nm při pH 9 [FRESHNEY, 2005].

5.4.1.4 Přírůstek v množství DNA

- Inkorporace ^3H thymidinu

U inkorporace ^3H thymidinu se měří přírůstek radioaktivity celkový, nebo u jednotlivé buňky. U jednotlivých buněk se provádí inkubace s ^3H thymidinem, pokud je méně než hodinová, označí se pouze buňky v S fázi, fixací a ponořením do emulze. Jako výsledek získáme černá zrna na filmu. Nevýhodou je čas expozice (dny) a práce s radioaktivitou [AHMED *et al.*, 1994].

- Inkorporace BrdU (bromdeoxyuridin)

Množství BrdU se stanoví pomocí protilátky (lze využít na populaci i na jednotlivou buňku). Přidáním protilátky proti BrdU konjugované buď s fluoresceinem (detekce pomocí fluorescenční mikroskopie nebo flowcytometrie), nebo s alkalickou fosfatázou (detekce

pomocí světelné mikroskopie po přidání do substrátu). Výhodou je výsledek během pár hodin, lze barvit současně i na tkáňovou morfologii. Nevýhodou je, že obarvené vzorky nelze dlouho skladovat.

U jednotlivých buněk pokud je inkubace buněk s BrdU méně než hodinová, označí se pouze buňky v S fázi, fixací a denaturací DNA [GONZALEZ; TARLOFF, 2001].

5.5 Buněčné linie

Buněčné kultury dnes patří mezi nejpoužívanější biologické modely používané ve výzkumu. Kromě toho slouží jako zdroj materiálu v biotechnologických aplikacích včetně např. produkce monoklonálních protilátek. [KEDINGER *et al.*, 1987].

Jednotlivé buněčné linie je možné zakoupit ve specializovaných bankách, jako je například *American Tissue Culture Collection* (www.atcc.com). Příprava kmenů (populace) nebo klonů (z jednotlivé buňky) z nádorů začíná izolací nádorů. Po izolaci nádoru následuje jeho enzymatická disociace na buněčnou suspenzi, kultivace buněk ve vhodných podmínkách, selekce klonů a jejich charakterizace v průběhu kultivace. V průběhu kultivace musí linie vykazovat dostatečnou stabilitu, aby byla zachována reprodukovatelnost výsledků. Také se připravují z primokultur z živočišných tkání. Popis nově získané linie by měl obsahovat co nejvíce její charakteristik, původ (typ nádoru, věk pohlaví dárce, způsob získání, počet pasáží od jejího ustanovení) [FRESHNE, 2005].

5.6 Buněčné a tkáňové kultury

Podle způsobu kultivace se buňky buněčných kultur rozdělují na adherentní a suspenzní buňky. A podle původu a vlastnosti kultury (linie) se dělí na primokultury a permanentní linie [FRESHNEY, 2010].

5.6.1 Adherentní buňky

Adherentní buňky jsou buňky rostoucí přichycené k podkladu (sklo, plastik, kolagen). Adhezi zprostředkovávají integriny. K uvolnění se používá nejčastěji enzym trypsin/EDTA. Ve většině případů je u adherentních linií nutno počítat s jejich zvýšenými nároky na kvalitu podkladu, na kterém rostou. Většina buněčných typů vyžaduje hydrofobní povrch, nejčastěji se dnes používá speciálně ošetřený polystyren. Pro kultivace některých

linií se však vyžadují speciální podmínky, jako je např. ošetření 0,01 – 0,1% roztokem želatiny (prasečí nebo hovězí) v destilované vodě. Podle potřeby a typu buněk se používají i ostatní proteiny extracelululárních matrixů [KARMIOL, 2000].

5.6.2 Suspenzní buňky

Suspenzní buňky (linie) vznikají prostým ředěním. Jsou to zejména buňky krve a jejich deriváty. Suspenzní buňky se volně vznášejí v médiu. Jsou to buňky proliferující a lze je dlouhodobě kultivovat [FRESHNEY; FRESHNEY, 2002].

5.6.3 Primokultury

Primární kultury jsou první kultury izolovaných buněk a označují se jako primokultury. Zdrojem buněk pro založení kultury musí pochopitelně být laboratorní zvířata nebo člověk. Primokultury jsou izolované většinou ze zdravé tkáně [UNCHERN, 1999]. Poté co se buňky namnoží, se naředí a přenesou do nových kultivačních nádob. Tento způsob obvykle označujeme jako pasáž – tzv. pasážování. Tím vzniká sekundární kultura tzv. subkultura. Buňky se v sekundární kultuře pěstují tak dlouho až získáme dostatečné množství materiálu pro pokus [SASAKI *et al.*, 1994].

5.6.4 Permanentní linie

Permanentní linie jsou linie nejčastěji tvořeny z buněk izolovaných z nádorů, ale mohou být izolované i ze zdravé tkáně, případně imortalizované (většinou obsahují chyby v genomu- jsou nestabilní, ale jsou nesmrtelné) s následující adaptací na podmínky *in vitro*. Permanentní linie se svými vlastnostmi pochopitelně liší od normálních – zpravidla se lépe množí a obecně se snáze kultivují. Kultury normálních buněk mají omezenou životnost, po několika pasážích dochází k tzv. zestárnutí kultury – buňky změní svoje vlastnosti a přestanou se dělit. Nádorové buňky většinou stárnutí nepodléhají [ALBERTS *et al.*, 1998].

6 KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

Kultivační podmínky ovlivňují fyzikální, chemické a biologické faktory. Aby pěstované buňky za podmínek *in vitro* přežily, nebo dokonce proliferovaly, je třeba jim zajistit vhodné podmínky, které je třeba regulovat i za běžných laboratorních podmínek. Mezi nejdůležitější podmínky patří povrch kultivační nádoby, složení kultivačního média a další vlastnosti prostředí jako je hodnota pH, teplota, či složení atmosféry [LESKO, 1975].

6.1 Povrch kultivačních nádob

Pro pěstování buněčných kultur se používají polystyrenové nádoby, jejichž povrch je upraven tak aby byl hydrofilní [WESTERMARK; WASTESON, 1975]. Náročnějším kulturám hydrofilní polystyren k růstu nestačí, proto je nutné povrch potáhnout látkou, která adhezi buněk zlepšuje. Mohou to být peptidy složené z aminokyselin s polárním postraním řetězcem (nejčastěji polylysin) [CARRNEY *et al.*, 1981]. Adhezi usnadňuje kolagen (používá se kolagen I typu, nebo jeho hydrolyzát – želatina). Mezi další adhezivní látky můžeme zařadit fibronectin či laminin. Buňky krevního původu je naopak nutné pěstovat v suspenzi (jejich adheze k povrchu by vedla k transformaci do jiného buněčného typu) [GOTTWALD *et al.*, 2008]. V suspenzi se buňky udržují díky neustálému promíchávání kultury. Používají se kultivační nádoby, které jsou umístěny na míchačce, nebo se používají válcovité nádoby, které se otáčejí kolem vodorovné osy, popř. se buňky pěstují ve speciálních kultivačních tancích s míchadélkem [VON BRIESEN *et al.* 1990]. Jinou možností je potažení povrchu kultivační nádoby látkou, která adhezi buněk zabrání např. agarosa. Při produkci protilátek a jiných bílkovin, pomůže buňky udržet v suspenzi tzv. mikroenkapsulace – kdy speciálním postupem se jednotlivé buňky obalí tenkou vrstvičkou polymeru (např. alginátem), který umožní difúzi látek mezi buňkou a kultivačním médiem – zabrání přilnutí buňky k povrchu nádoby [FRAME; NORMAN, 2008].

6.2 Složení média

Kultivační médium musí mít vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti a musí obsahovat ve vhodné koncentraci látky, které buňky potřebují pro život a proliferaci. Jde o vodné roztoky obsahující mnoho, někdy i několik desítek složek [WAYMOUTH, 1970]. Mezi

nejvýznamnější látky obsažené v kultivačních médiích patří voda a v ní rozpuštěné anorganické soli, pufrы, glukosa, případně i jiné zdroje energie, vitamíny, bílkoviny, růstové faktory, některé peptidy, mastné kyseliny, lipidy a stopové prvky. Velké množství látek, jako jsou růstové faktory, stopové prvky, vitamíny apod., se můžou do média dodat přidavkem krevního séra.

Soli jsou nezbytným zdrojem iontů a hrají významnou úlohu v zajištění vhodného pH (optimum je 7,2 – 7,5) a osmotického tlaku (optimum je většinou 280 – 320 mmol/l). Nejzákladnější ionty obsažené v médiích jsou: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , HCO_3^- [YAMADA; GEIGER, 1997].

Většina buněk savců vyžaduje insulin (příjem glukózy), transferin (příjem železa), selen (nezbytný pro funkci oxidačně-redukčních enzymů) a další doplňky jako jsou lipidy (mastné kyseliny), steroidní látky, hormony, cytosiny, peptidy, proteiny extracelulární matrix, proteiny séra, nukleosidy...Mnohé z těchto látek jsou suplovány přidavkem séra 5 – 20 %), v některých případech i jinými zdroji málo charakterizovaných směsí proteinů a dalších látek. Významnými doplňky jsou ochranné látky jako 2- β -merkaptóetanol (snižuje oxidativní stres a může sloužit i jako zdroj síry) a antibiotika (ochrana proti mikroorganismům) případně selekční agens [NAEYART *et al.*, 2006].

6.3 Séra

Séra nejsou stejné kvality což je také dáno rozdílnými testy. Podle kvality séra se provádí různé testy: testy na přítomnosti endotoxinů, testy snášenlivosti konkrétních typů buněk, testy na přítomnosti virů apod. Séra bývají různého původu (USA, Austrálie...), různé šarže, normální a inaktivní séra (inaktivace séra je jeho vystavení teplotě při 56°C po dobu 30 až 45 minut). Séra se používají nejčastěji fetální (obsahuje nízkou hladinu nízkoafinitních imunoglobulinů), ale může se použít i jiné zdroje – lidské, koňské, kozi, myší, [HYVONEN *et al.*, 1988].

V některých speciálních případech je vhodné použít polotekutá až pevná séra. Takové medium se připraví přidavkem agaru, metylcelulósy a fibrinogenu. U agaru je třeba dávat pozor na přehřátí složek média během přípravy, teplota by neměla být vyšší jak 40°C. U fibrinogenu vzniká z fibrinu fibrinová síť. Je možné také použít i čistě syntetické polymery, např. metakryláty (hydrogely).

Sérum se uchovává při 4°C až dva měsíce a při -20°C až 3 roky [SPECTOR; GOLDMAN, 1998].

6.4 Teplota

Buňky se kultivují při optimální teplotě pro organismus, z kterého byly izolovány. Pro buněčné linie odvozené od člověka a běžných laboratorních zvířat (myš, krysa, pes...) je to většinou 37°C. Pro buněčné linie odvozené od poikilotermních živočichů (ryby, hmyz, háďátka – *Caenorhabditis*) se používá teplota od 10°C do 25°C [WYLLIE *et al.*, 1992].

6.5 Pufrací systémy

Optimální pH je pro většinu buněk je 7,2 – 7,4. Buňky ale mohou růst i při pH 6,5 – 6,8 a krátkodobě snesou pH přes 8. pH se upravuje 1M HCl a 1M NaOH. K orientační detekci pH média v kultuře slouží fenolová červec, která se přidává do médií. pH se v kultuře mění v důsledku metabolismu buněk, zejména produkcí laktátu a CO₂, proto je nutná pufrace [EISINGER *et al.*, 1979]. K pufraci se nejčastěji využívá Na₂CO₃. Při nízké buněčné denzitě je CO₂ málo na to, aby pufrací systém založený na Na₂CO₃ správně fungoval, proto se buňky pěstují v CO₂ atmosféře. Pak nedochází k nežádoucímu vyřetování CO₂ z kultivačních nádob do atmosféry inkubátoru. Pokud se využívá otevřená kultivace – atmosféra v kultivační nádobce komunikuje s atmosférou v inkubátoru. Při otevřeném systému kultivace se nejčastěji udržuje atmosféra s navýšeným obsahem CO₂, standardně 5 % CO₂ (regulovaný přísun ze zásobních bomb) a 95 % vody (regulovaný přísun, nebo častěji spontánním odparem ze zásobníku) [EAGLE, 1973]. Atmosférický CO₂ je závislý na teplotě a to brání tvorbě H₂CO₃, který oddělí závislost na reakci:



Při kultivaci v uzavřeném prostoru nedochází k prostupu plynů z kultivační nádoby do atmosféry do inkubátoru, používají se poloviční množství Na₂CO₃ a CO₂ v inkubátoru není třeba. K pufraci se mohou využívat i jiné látky např. organické pufrы HEPES [GOOD *et al.* 1966] (nepotřebuje CO₂ v atmosféře a lépe vyrovnává rychlé změny pH, je však drahý a ve vyšších koncentracích či při nesprávné přípravě je toxický), BES, a TES [UNCHERN, 1999].

6.6 Kyslík

Kyslík je druhou hlavní složkou plynné fáze. Buňky potřebují kyslík k dýchání *in vivo*, kultivované buňky jsou závislé především na glykolýze, která může být i anaerobní. Většina kultur spoléhá především na rozpuštěný O₂, který může být toxický vzhledem k nadmořské výšce hladiny volných radikálů. Správného kyslíkového napětí je vždy kompromisem mezi požadavkem splnění dýchání a cílem vyhnout se toxicitě [RADISIC *et al.* 2006]. Některé inkubátory umožňují kontrolu kyslíku stejně jako CO₂. Kultury se navzájem liší v jejich požadavku na kyslík, hlavní rozdíl je mezi orgány a buněčnými kulturami. Pro většinu buněčných kultur je vhodnější nižší tlak a atmosférický kyslík. Některé orgánové kultury (odvození od pozdního stádia embrya novorozenců nebo dospělých), vyžadují až 95 % O₂ v plynné fázi. Většina rozptýlených buněčných kultur preferují nižší kyslíkové napětí, a některé systémy (např. lidské nádorové buňky v klonogenním testu), a lidské embryonální plicní fibroblasty [PREISSMANN *et al.*, 1997]. McKeehan *et al.* [1976] uvádí, že s kyslíkem souvisí požadavek na selen v médiu. Selen je kofaktorem v syntéze glutathionu.

6.7 Antibiotika

Významným prevenčním agens v médiích jsou antibiotika. Pro své použití mají své kritéria, kterými jsou: nesmí inhibovat růst a ani ovlivňovat metabolismus buněk, musí ochraňovat kulturu po celou dobu experimentu, musí být netoxické a bezpečné pro uživatele, kompatibilní s ostatními složkami média a rozpustné v netoxických rozpouštědlech [LESKO, 1975]. Funkcí antibiotik v kultivačním médiu je ochrana proti mikroorganismům – nejčastěji se používá penicilin/ streptomycin nebo gentamycin, příležitostně tetracyklin. Jako nejběžnější selekční antibiotika pro savčí buňky se používají G418 / Neomycin, Hygromycin B a Puromycin a mezi speciální patří Mitomycin C [DAMIANAKI *et al.*, 2000].

7 PRÁCE S KULTURAMI

Čisté materiály se podle své odolnosti sterilizují autoklávováním při 120°C 20 až 30 minut. Sem se zařazují především solné roztoky, některé pufrы, agar, želatina apod. Sklo se sterilizuje suchým teplem při 180°C 3 až 4 hodiny a vzácně některé plasty při 120°C. Povrchy jako jsou plasty a sklo se sterilizují zářením gama vzácně i UV. Filtrováním se pak čistí vzduch (HEPA filtry s póry 0,3 μm) či roztoky (médiа a séra s póry 0,2 μm). Omytím 2 – 5% aldehydy, 70% EtOH, 2 – 5% fenoly, 5 – 10% peroxidy vodíku, lze sterilizovat nástroje, pracovní plochy, některé plasty a sklo. Plamenem lze sterilizovat kovy, sklo a parami alkylačních činidel, které se používají někdy s kombinací s autoklávováním (ethylén oxid). Speciální aplikacemi jako je dekontaminace filtrů flow-boxů a dekontaminace místností (formaldehydem) je vždy problémem pro obsluhu [AUSUBEL *et al.*, 2002].

7.1 Zamražování a zchlazování buněk

Zamražování buněk se provádí v kultivačním médiu se zvýšeným obsahem séra (20 – 100 %), nebo sérem s koncentrací 10 – 50 % ve kterém je přídavek DMSO (5 – 10%) anebo vzácně se sérem 10 – 50 % ve kterém je přídavek glycerolu (10 %). Buňky je třeba zchlazovat postupně na - 80°C. K trvalému uchování se poté přenesou do ultra-hlubokomrazicího boxu (- 185°C), nebo do tekutého dusíku (- 196°C). Pro zamražení je vhodné používat vysoké koncentrace buněk (>10⁷ buněk/ ml médiа). Aby se buňky nepoškodili mrazem, tak je chrání vhodné kryokonzervační látky (nejčastěji se používá DMSO – dimethylsulfoxid) [SAMBROK *et al.*, 1989].

Zchlazování se musí provádět postupně a pomalu. Provádí se v lázni s izopropylalkoholem (R. T), pak se přenáší do hlubokomrazicího boxu, ve kterém je teplota - 80 °C, zde teplota klesá rychlostí 1°C / 1 min. Nakonec se kultury zanořují do par tekutého dusíku. V termoizolačním materiálu (např. pěnový polystyren) se buňky dávají přímo do hlubokomrazicího boxu a po 1 – 3 dnech se uskladní k trvalému uchování [CELLIS *et al.*, 1994].

7.2 Rozmrazování buněk

Rozmrazování buněk se musí provádět rychle. Proto je třeba buňky rychle převést z hlubokého zamražení na kultivační teplotu, odstranit zamrazovací médium (centrifugací) a provést výsev k další kultivaci. Druhý den po vysetí je vhodné vyměnit kultivační médium za nové a odstranit tak zbytky buněk, které zamražení / rozmražení nepřežily [ALBERTS *et al.*, 1998].

7.3 Přeprava buněk

Buňky se přepravují v zamraženém stavu v tekutém dusíku (v termosce nebo lokální přepravou). Na velké vzdálenosti v isolačním boxu se suchým ledem (CO₂). Je možná také přeprava v živé kultuře, v kultivační nádobce s nadbytkem média (v závislosti na buněčném typu 1 – 3 dny). Tkáně (s výjimkou krve) se přepravují podchlazené (ne zmrzlé) ve výživných médiích, často s kryo-protektivy [SPECTOR; GOLDMAN, 1998].

7.4 Monitoring infekce

Je důležité provádět monitoring kvůli růstu nežádoucích mikroorganismů. Mohou to být chomáčky plísní, pučící buňky kvasinek, kulovité nebo vláknité řetízky bakterií. Pokud je kultura infikovaná dochází zpravidla k rychlému vyčerpání média (změna barvy z červené na žlutou – pokles pH). Buňky špatně rostou, nemají správný tvar, adherentní se pouští z podkladu (zkreslování výsledku experimentů). Proto se provádí mikroskopické barvení na celkovou DNA (zviditelnění mikroorganismů), zejména endoparazitů. Následuje stanovení specifických antigenů (imunocytochemie, western blot). Tato metoda umožňuje detekci specifických sekvencí jednotlivých mikroorganismů PCR metodou a kontrolní kultivací médií samotných nebo po přidavku specifických substrátů. Výsledky experimentů nejsou reprodukovatelné, jsou chaotické a buňky jsou citlivější ke stresu [YAMADA; GEIGER, 1997].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

8 METODIKA

Cílem práce bylo zjištění vlivu polyfenolů obsažených v květech čtyř druhů bylin na proliferaci eukaryotických buněk. V první fázi byla provedena extrakce polyfenolů z květů a upravena jejich koncentrace pro provedení následných testů. V druhé fázi pak byly buňky kultivovány za přítomnosti definované koncentrace polyfenolů v kultivačním médiu. Proliferace byla vyhodnocena pomocí spektroskopického testu MTT založeného na metabolické aktivitě buněk.

8.1 Podmínky extrakce

Polyfenolické látky byly extrahovány z květů čtyř druhů bylin: sedmikráska chudobky (*Bellis perennis*), smetanky lékařské (*Taraxacum officinale*), kozí brady luční (*Tragopogon pratensis*) a čekanky obecné (*Cichorium intybus*). Květy byly bezprostředně po řezu zmrazeny na teplotu - 40 °C a při této teplotě byly dále uchovány. Extrakce byla provedena podle práce Hakimuddin *et al.* [2008] s modifikacemi. Zmražené květy bylin byly homogenizovány v 90% metanolu (2 ml/g) a následně extrahovány při teplotě 4°C po dobu 30 minut. Extrakty se po extrakci odstředili pomocí centrifugy při 1990 otáčkách za minutu po dobu deseti minut. Odstředění bylo použito k oddělení supernatantu obsahujícího vyextrahované látky. Sediment se dále použil k nové extrakci. Tento proces byl opakován třikrát. Pro zakoncentrování extraktů na cílovou koncentraci 1000 µg/0,1ml byl methanolvý extrakt odpařen ve vakuové digitální odparce při 40°C. Extrakty byly dále uchovávány při teplotě - 20°C.

8.2 Kultivace buněk

Antiproliferační test byl proveden pomocí dvou buněčných linií. První linií byly lidské keratinocyty (HaCaT; Human immortalized non-tumorigenic keratinocyte), které poskytla firma Cell Lines Service (Catalog No. 300493) [BOUKAMP *et al.*, 1988]. Jako kultivační médium bylo použito (Dulbecco's Modified Eagle Medium se zvýšeným obsahem glukózy s přídavkem 10% fetálního hovězího séra a obsahem antibiotik Penicillin/ Streptomycin, 100 U/ml (100 µg/ml; PAA Laboratorie GmbH, Rakousko). Druhou buněčnou linií byly lidské hepatocyty (HepG2; Human hepatocellular carcinoma cell line ATCC, HB-8065). HepG2 byly kultivovány v Eagle's Minimum Essential médium s přídavkem 10% fetálního

hovězího séra, 2 mM L-glutaminu a 50 µg/ml gentamycinu (PAA Laboratorie GmbH, Rakousko).

8.3 Antiproliferační test

Vzorky byly dezinfikovány vystavením UV záření (258 nm, UV-C Long Life 30 W/G30TB, Phillips, Holandsko). Extrakty byly naředěny v kultivačním médiu na finální koncentrace: 50, 25, 10, 5 a 1 µg/ml. Tyto roztoky byly použity do 24 hodin od naředění. Buňky byly předkultivovány v 96-ti jamkových testovacích destičkách při výchozí koncentraci 1×10^5 buněk/ml média, v jedné jamce tak bylo při zahájení testu 1×10^4 buněk. Buňky byly překultivovány 24 hodin v případě HaCaT a 48 hodin v případě HepG2 z důvodu různě rychlého růstu buněk těchto linií. Jako kontrola byla použita kultivace buněk bez přídavku extraktů. Pro posouzení antiproliferační aktivity byl použit MTT test (Invitrogen Corporation, USA). Vyhodnocení bylo provedeno v případě HaCaT po třech a šesti dnech kultivace, v případě HepG2 po čtyřech a osmi dnech. Inkubace probíhala při 37°C v 5% atmosféře CO₂. MTT test je založen na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan. Formazan jsou modré krystaly hvězdicovitého tvaru. Tato reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu, v našem případě byl použit dimethylsulfoxid, a zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky – absorbance byla měřena při vlnové délce 540 nm pomocí Sunrise microplate absorbance reader (Tecan, Švýcarsko). Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk. Životaschopnost buněk byla vyjádřena jako absolutní hodnota absorbance jednotlivých koncentrací extraktů, popřípadě absorbance buněk kultivované v čistém médiu bez extraktů. Všechny testy byly provedeny čtyřikrát. Pro zobrazení buněk a získání mikrosnímků pro fotodokumentaci byl použit invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem (Olympus, CKX41). Statistické průkaznosti rozdílů mezi pozorovanými absorbancemi byla zjištěna T-testem.

8.4 Stanovení obsahu polyfenolů

Stanovení obsahu polyfenolů nebylo předmětem předkládané práce, nicméně jsou důležité pro vysvětlení zjištěných výsledků a proto jsou zde uvedeny. Celkové polyfenoly byly stanoveny na principu spektrofotometrického měření. Standartní roztok taninu byl

připraven z 50 mg taninu rozpuštěného ve 100 ml vody. Ze standardního roztoku taninu bylo odpipetováno do šesti 50 ml odměrných baněk o objemu 0,2, 0,3, 0,4 a 0,5 ml. Do sedmé 50 ml odměrné baňky se odpipetovalo 1 ml čirého extraktu a zředil se podle potřeby s destilovanou vodou. Do každé baňky bylo přidáno 20 ml destilované vody a 1 ml Folin – Ciocalteu činidla. Po třech minutách bylo přidáno 5 ml 20% roztoku Na₂CO₃. Obsah se promíchal a doplnil destilovanou vodou po rysku. Po 30 minutách se změnila intenzita zbarvení při 700 nm proti slepému pokusu [SAMBROOK *et al.*, 1989].

V květech bylin sedmikrásky chodobky (*Bellis perennis*), kozí brady luční (*Tragapogon pratensis*), smetánky obecné (*Taraxacum officinale*) a čekanky obecné (*Cichorium intybus*) bylo detekováno sedm různých polyfenolů (kyselina gallová, kyselina vanilová, kyselina kávová, kyselina eruková, rutin, resveratrol a kyselina sinapová). Obsah polyfenolů v extraktech a čerstvých květech jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Obsah jednotlivých polyfenolů v květech

Polyfenoly	<i>Bellis perennis</i>		<i>Tragapogon pratensis</i>		<i>Taraxacum officinale</i>		<i>Cichorium intybus</i>	
	Extrakt (µg/ml)	Čerstvý květ (µg/g)	Extrakt (µg/ml)	Čerstvý květ (µg/g)	Extrakt (µg/ml)	Čerstvý květ (µg/g)	Extrakt (µg/ml)	Čerstvý květ (µg/g)
Kyselina gallová	0,46	1,61	66,15	226,16	17,65	65,98	1,06	3,66
Kyselina vanilová	102,17	351,39	/	/	3,31	12,39	525,57	/
Kyselina kávová	14,23	48,95	13,68	46,78	/	/	/	1808,32
Kyselina ferulová	2,41	8,31	9,7	33,19	/	/	1,35	4,65
Rutin	0,8	2,77	4,39	15,01	0,74	2,78	/	/
Resveratrol	15,07	51,84	0,68	2,34	10,99	41,09	2,73	9,42
Kyselina sinapová	/	/	5,28	18,05	23,72	88,66	0,49	1,7

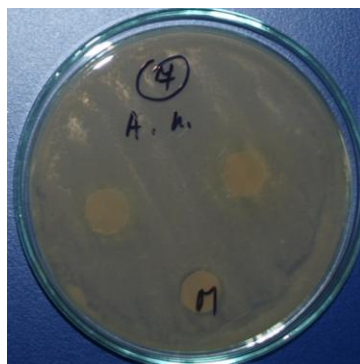
8.5 Antimikrobiální test

Antimikrobiální test se provádí pomocí diskové difúzní metody. U které se měří velikost inhibiční zóny. Cílem této metody je zjistit zda použité množství extraktu polyfenolů (v našem případě bylo použito 15 μ l) ze vzorků květů bylin má pozitivní nebo negativní vliv na antimikrobiální efekt mikroorganismů.

8.5.1 Disková difúzní metoda

Antimikrobiální efekt polyfenolů extrahovaných z květů bylin na mikroorganismy byl proveden pomocí diskové difúzní metody. K tomuto byly použity totožné extrakty z květů, jako v předchozím testu. K inokulaci byly použity mikroorganismy: *E. coli* (CCM 4517), *S. aureus* (CCM 4516), *C. albicans* (CCM 8215) a *A. niger* (CCM 8222). Mikroorganismy byly naočkovány pomocí sterilní kličky do 12 ml fyziologického roztoku. Tímto způsobem se připravila suspenze mikroorganismů. Pomocí sterilního vatového tamponu na špejli se suspenze mikroorganismů rozetřele po povrchu Mueller-Hintova agaru. Následně se kultura při pokojové teplotě na povrchu půdy nechala zaschnout po dobu 5 – 10 minut. Pak se na povrch Mueller-Hintonova agaru položily pomocí sterilní pinzety dvě sterilní kolečka filtračního papíru o velikosti 10 mm. Na tyto kolečka bylo nanášeno pomocí mikropipety 15 μ l vzorku extraktu z květu použitých bylin. Jako slepý pokus byl na třetí kolečko filtračního papíru místo extraktu nanášen methanol (15 μ l). Takto připravené petriho misky se nechaly několik minut zaschnout při pokojové teplotě. Na obrázku 9. je uveden příklad z testu extraktu květu *C. intybus* za použití plísně *A. niger*. Dále se nechaly inkubovat při teplotě 35 °C po dobu 24 hodin pro bakterie (*E. coli*, *S. aureus*) a pro plísň a kvasinky (*A. niger*, *C. albicans*) při teplotě 25°C po dobu 3 – 5 dnů. Po uplynutí doby inkubace byla změřena velikost průměru inhibiční.

Obrázek 9: Petriho miska extraktu květu z *C. intybus* za použití plísně *A. niger*



9 VÝSLEDKY

Antiproliferační vliv různých koncentrací polyfenolických sloučenin extrahovaných z jednotlivých květů na buňky linie HaCaT pomocí MTT testu popisuje Tab. 3. Vyjadřuje průkazné rozdíly mezi průměry absorbance extraktů a kontroly. U kontroly byla pomocí MTT testu naměřena průměrná hodnota absorbance 0,54 se směrodatnou odchylkou 0,09. Jak je vidět z Tab. 3. buňky linie HaCaT inkubované v přítomnosti výtažků z květů mají nižší proliferaci ve srovnání s kontrolou. Výjimkou je koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ u *T. officinale*, která od kontroly s průměrnou hodnotou $0,54 \pm 0,09$ stoupla na průměrnou hodnotu absorbance $0,62 \pm 0,04$. U koncentrací 50, 25, 10, 5 a 1 $\mu\text{g/ml}$ u květu *B. perennis* u kterých byly pomocí MTT testu naměřeny průměrné hodnoty absorbance 0,22, 0,20, 0,20, 0,30, 0,48, které se pohybovaly pod průměrnou hodnotou absorbance kontroly 0,54 se statisticky významně liší. Hodnoty absorbance u extraktu *T. pratensis* s hodnotami absorbance 0,20, 0,39, 0,39, 0,48 a 0,42 se také statisticky významně liší od absorbance kontroly. Koncentrace 50, 25, 10, 5 a 1 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnými hodnotami absorbance 0,26, 0,44, 0,45 0,62, a 0,38 se směrodatnými odchylkami 0,03, 0,08, 0,05, 0,04 a 0,06 u květu *T. officinale*, tak jako účinky koncentrace extraktů u předchozích květů se statisticky významně liší oproti kontrole. Poslední bylinou, která byla použita byl květ z *C. intybus*. U tohoto květu s průměrnými hodnotami absorbance 0,20, 0,37, 0,42, 0,48 0,32 a směrodatnými odchylkami 0,03, 0,02, 0,05, 0,07 a 0,01 bylo dosaženo také statisticky významných rozdílů. Vyjimkou u květu *C. intybus* je koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou absorbance 0,48 se směrodatnou odchylkou 0,07, kde nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou a průměrnou hodnotou absorbance vzorku.

Tab. 3: Antiproliferační vliv různých koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v jednotlivých květech na buňky linie HaCaT pomocí MTT testu (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka)

<i>Bellis perennis</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,2245 \pm 0,0293**
<i>Bellis perennis</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,2046 \pm 0,0209**
<i>Bellis perennis</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,1986 \pm 0,0123**
<i>Bellis perennis</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,3024 \pm 0,0422**
<i>Bellis perennis</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,4801 \pm 0,0682**
<i>Tragopogon pratensis</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,2013 \pm 0,0227**
<i>Tragopogon pratensis</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,3854 \pm 0,0321**
<i>Tragopogon pratensis</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,3859 \pm 0,0809**
<i>Tragopogon pratensis</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,4762 \pm 0,0369**
<i>Tragopogon pratensis</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,4223 \pm 0,0722**
<i>Taraxacum officinale</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,2673 \pm 0,0252**
<i>Taraxacum officinale</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,4363 \pm 0,0754**
<i>Taraxacum officinale</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,4473 \pm 0,0467**
<i>Taraxacum officinale</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,6229 \pm 0,0401**
<i>Taraxacum officinale</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,3805 \pm 0,0571**
<i>Cichorium intybus</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,2012 \pm 0,0323**
<i>Cichorium intybus</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,3707 \pm 0,0243**
<i>Cichorium intybus</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,4193 \pm 0,0519**
<i>Cichorium intybus</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,4840 \pm 0,0725
<i>Cichorium intybus</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,3191 \pm 0,0102**
Kontrola	0,5351 \pm 0,0874*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech jsou statisticky průkazné $P < 0,05$ (*, **)

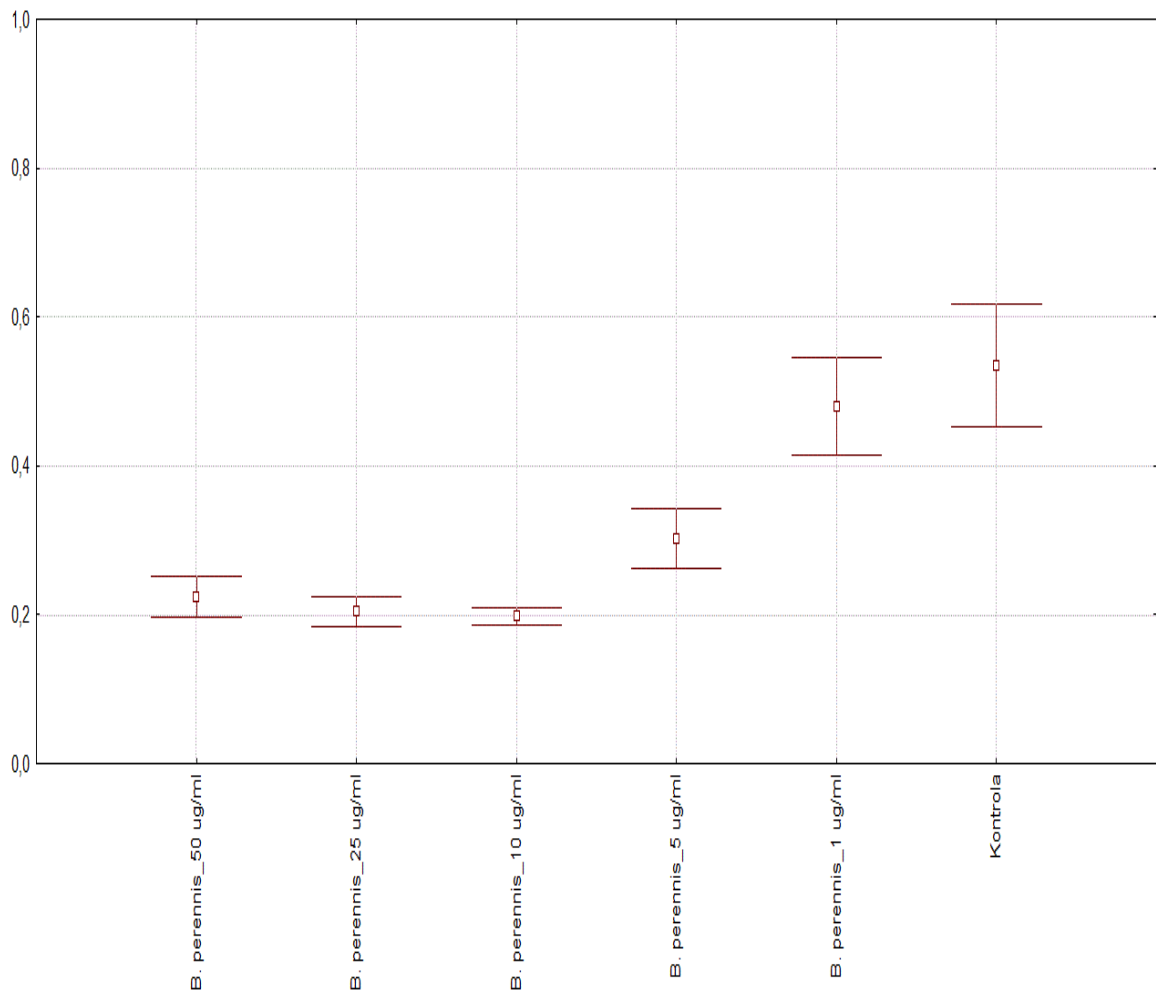
9.1 Vliv polyfenolů na lidské keratinocyty

Z každého vzorku květu jsou uvedeny v grafu záznamy dle koncentrace extraktu, který byl použit. Polyfenolické látky byly použity v koncentracích 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml a 1 µg/ml. Grafy 1. – 4. popisují vliv polyfenolů z extraktů daných druhů květů na buňky linie HaCaT. Grafy ukazují na průměrné hodnoty absorbance vyjadřující počet buněk v porovnání s kontrolním měřením. Míra absorbance vyjadřuje zároveň míru proliferace. V grafech je kontrolní měření, které je znázorněno vždy jako poslední.

9.1.1 Sedmikráska chudobka (*Bellis perennis*)

V grafu 1. jsou zaznamenány výsledky působení vlivu polyfenolů extrahovaných z květů *B. perennis* na buňky linie HaCaT. V grafu je zaznamenána také kontrola, která je znázorněna jako poslední. Kontrola dosahuje průměrné hodnoty absorbance 0,54 a směrodatné odchylky 0,09. Jak je vidět tak při koncentraci 50 µg/ml klesla průměrná hodnota absorbance v porovnání s kontrolou z 0,54 na 0,22 se směrodatnou odchylkou 0,03. Druhá koncentrace 25 µg/ml měla od koncentrace 50 µg/ml hodnotu absorbance jen o 0,02 nižší (0,20) se směrodatnou odchylkou 0,02. Při koncentraci 10 µg/ml klesla průměrná hodnota od kontroly 0,54 až na 0,20 se směrodatnou odchylkou 0,01. Vyhodnotili se totéž, ale procentuálně, tak zde byl zaznamenán pokles proliferace o 65 %. Při této koncentraci je viditelně největší rozdíl v proliferaci a to ze všech měřených koncentrací u buněk linie HaCaT. Koncentrace 5 µg/ml s absorbancí $0,30 \pm 0,04$ a koncentrace 1 µg/ml s absorbancí $0,50 \pm 0,07$ ovlivnili antiproliferační účinek pozitivně ale ne natolik jako koncentrace vyšší než 5 µg/ml.

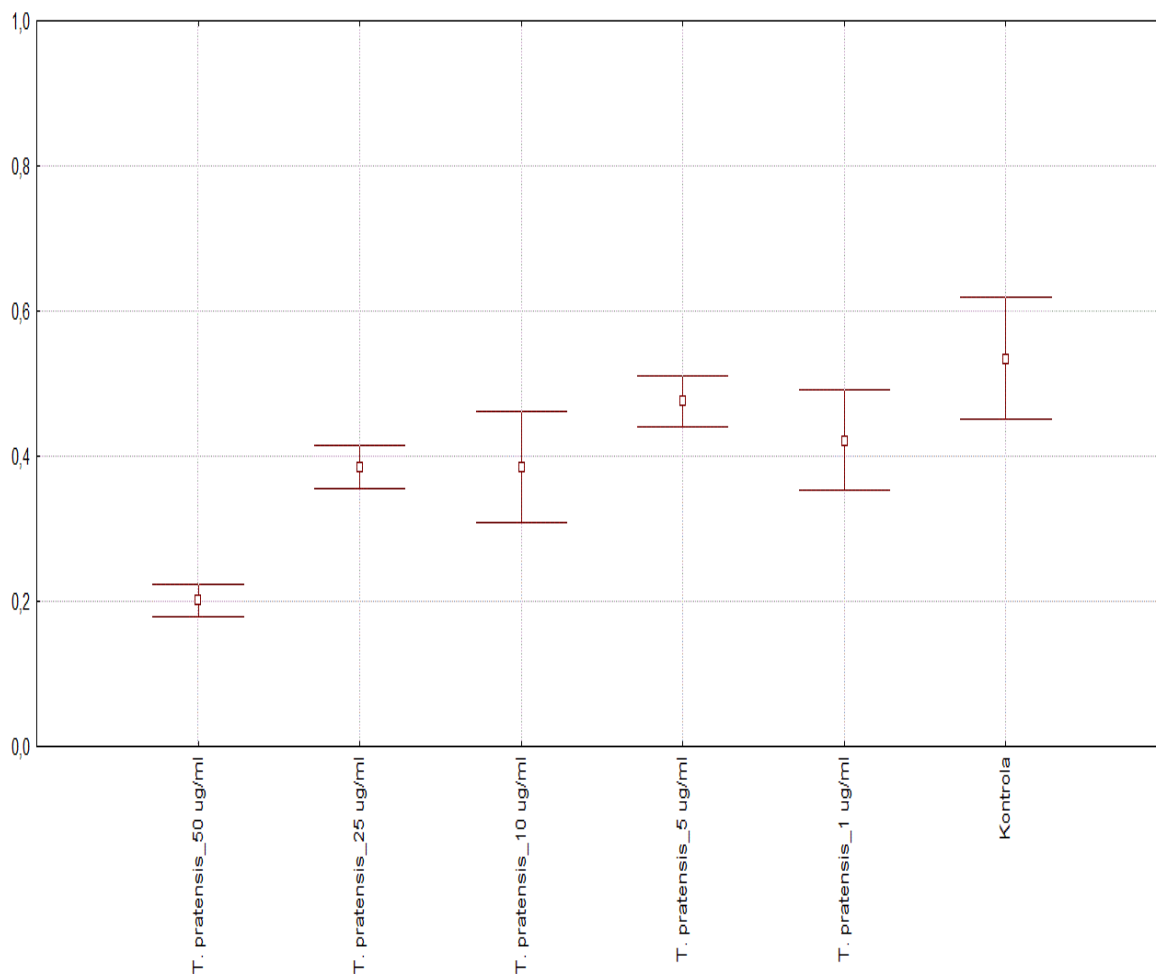
Graf 1: Antiproliferační efekt extraktu *B. perennis* na buňky linie HaCaT (průměr ± směrodatná odchylka)



9.1.2 Kozí brada luční (*Tragopogon pratensis*)

Graf 2. popisuje výsledky měření extraktů z květů *T. pratensis* na buňky linie HaCaT. Kontrolní měření bylo stejné, jako u předchozího květu *B. perennis*. Antiproliferační účinek se projevil už při nejnižší koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou absorbance $0,42 \pm 0,07$. Přidáním 5 μg polyfenolů na 1ml média klesla průměrná absorbance oproti kontrole z $0,54 \pm 0,09$ na $0,48 \pm 0,04$. Při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ došlo ke snížení průměrné hodnoty absorbance na 0,39. U koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ se průměrná hodnota absorbance rovnala koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ (0,39). Nejvyššího antiproliferačního účinku dosáhla nejvyšší koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$, která snížila průměrnou hodnotu absorbance na 0,20 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,02$. U této koncentrace byl zaznamenán pokles od kontrolního měření o 63 %.

Graf 2: Antiproliferační efekt extraktu *T. pratensis* na buňky line HaCaT (průměr ± směrodatná odchylka)

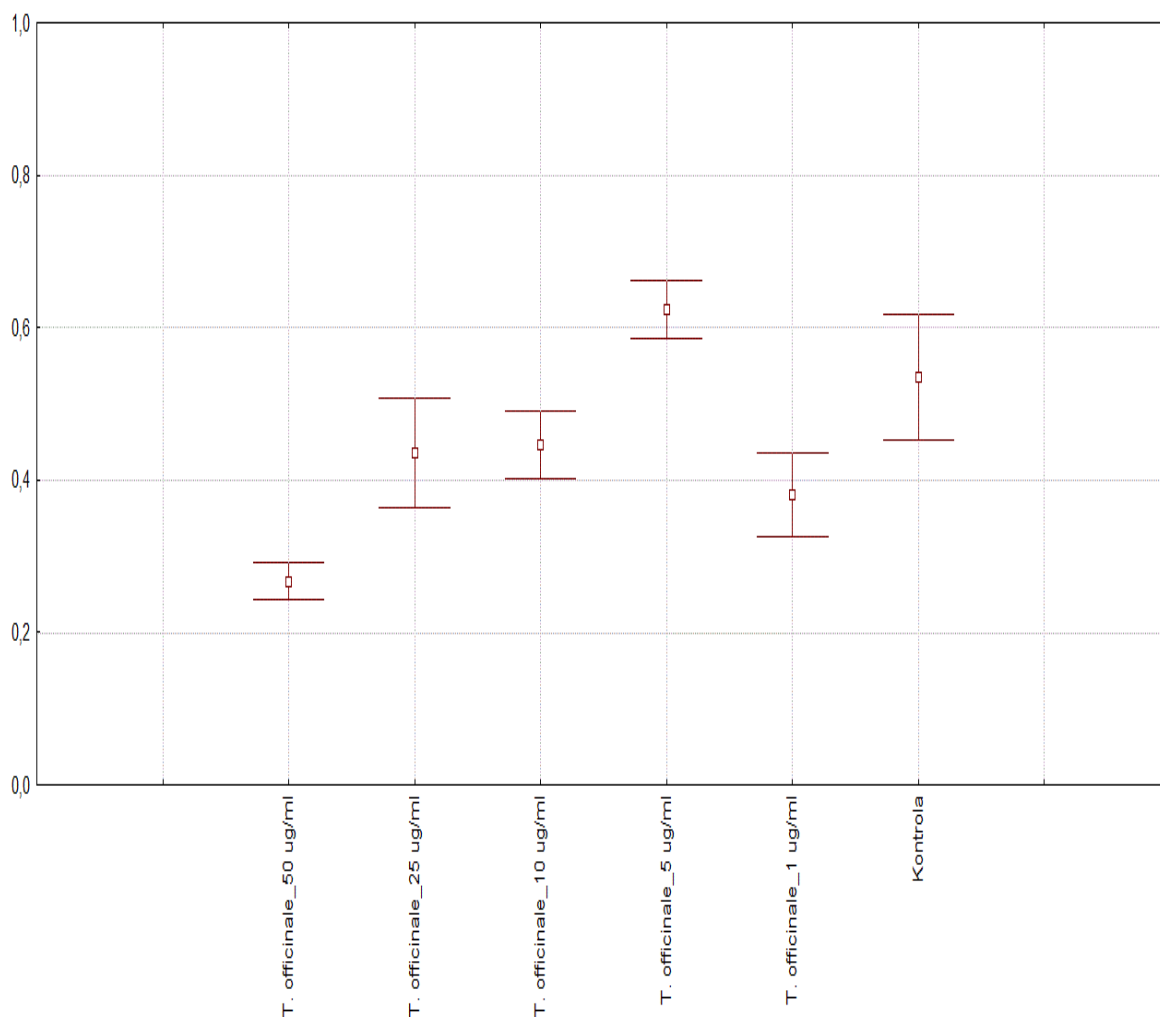


9.1.3 Smetánka lékařská (*Taraxacum officinale*)

Graf 3. poukazuje na vliv polyfenolů z extraktů květu *T. officinale*. Nejvyšší koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ snížila absorbanci od kontrolního měření z $0,54 \pm 0,09$ nejvíce a to na $0,27 \pm 0,02$. Tato koncentrace statisticky významně ovlivnila proliferaci oproti kontrole. Koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou 0,44 se směrodatnou odchylkou 0,08 vykazovala pozitivní antiproliferační účinek, ale ne natolik jako koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$. Stejně tak koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou 0,45 a směrodatnou odchylkou 0,05 ovlivnila proliferaci oproti kontrole. U druhé nejnižší koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ došlo místo k poklesu hodnoty absorbance od kontroly 0,54 k vzestupu až na hodnotu 0,63 se směrodatnou odchylkou 0,04. Tato koncentrace dokonce zvýšila proliferační aktivitu.

Koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou 0,38 a směrodatnou odchylkou 0,06 měla také pozitivní účinek a hodnoty proliferace statisticky významně ovlivnila.

Graf 3: Antiproliferační efekt extraktu *T. officinale* na buňky linie HaCaT (průměr \pm směrodatná odchylka)

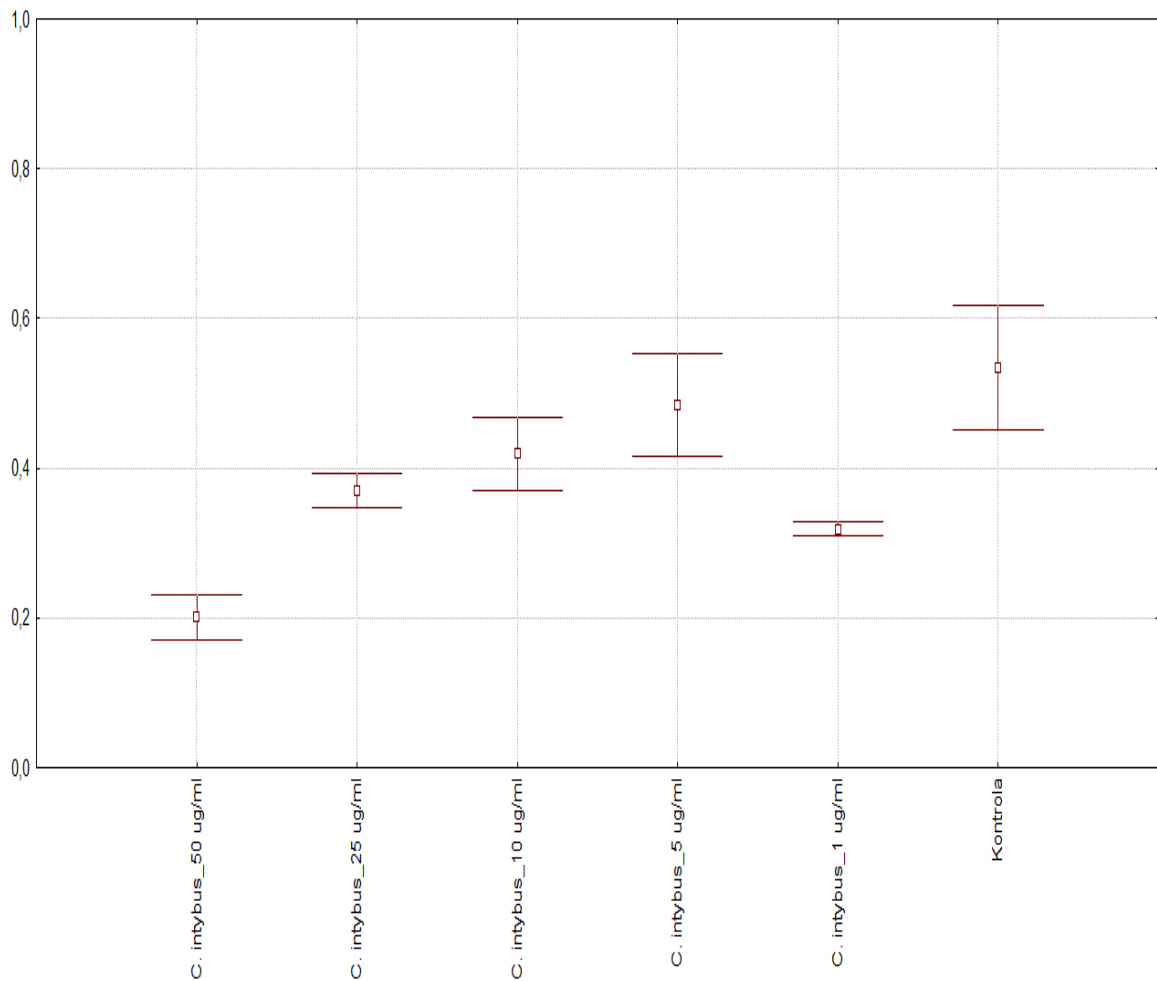


9.1.4 Čekanka obecná (*Cichorium intybus*)

Poslední vybranou bylinou byl použit květ z *C. intybus* (graf 4). Koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou absorbance 0,20 a směrodatnou odchylkou 0,03 měla nejvyšší antiproliferační účinek. U této koncentrace byl zaznamenán nejvyšší pokles hodnoty absorbance od kontroly z $0,54 \pm 0,08$ na $0,20 \pm 0,03$. Procentuálně se hodnota absorbance snížila od kontroly o 63 %. Stejně tak koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ s hodnotou absorbance $0,37 \pm 0,03$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou absorbance $0,42 \pm 0,05$ účinek proliferace ovlivnily statisticky významně. U koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ s hodnotou absorbance byl zaznamenán jen

mírný pokles průměrné hodnoty absorbance od kontroly z $0,54 \pm 0,09$ na $0,48 \pm 0,07$. Hodnota absorbance 0,48 je hodnotou nejvyšší ze všech hodnot absorbancí u buněk linií HaCaT. Procentuálně došlo k poklesu proliferace jen o 12 %. Nejnižší koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou absorbance 0,32 dosáhla směrodatné odchylky $\pm 0,01$. Takže tato koncentrace také ovlivnila antiproliferační účinek.

Graf 4: Antiproliferační efekt extraktu *C. intybus* na buňky linie HaCaT (průměr \pm směrodatná odchylka)



9.2 Vliv polyfenolů na lidské hepatocyty

Antiproliferační vliv různých koncentrací polyfenolických sloučenin extrahovaných z jednotlivých květů na buňky linie HepG2 pomocí MTT testu popisuje Tab. 4. vyjadřuje průkazné rozdíly mezi průměry absorbance extraktů a kontroly. U kontroly byla pomocí MTT testu naměřena průměrná hodnota absorbance 0,74 se směrodatnou odchylkou 0,19. Koncentrace 50, 25, 10, 5 a 1 $\mu\text{g/ml}$ u *B. perennis* u kterých byly pomocí MTT testu naměřeny průměrné hodnoty absorbance 0,17, 0,16, 0,66, 0,89 a 0,88 se statisticky významně liší. Výjimku tvoří koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ u které neexistuje statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou a průměrnou hodnotou absorbance vzorku. U použitého květu z *T. pratensis* u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ s hodnotami absorbance $0,60 \pm 0,11$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ s hodnotou absorbance $0,50 \pm 0,07$ se hodnoty absorbance významně liší od absorbance kontroly. Jinak koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ s hodnotami absorbance 0,71, 0,64, 0,87 a směrodatnými odchylkami 0,13, 0,05 a 0,25 nedosáhly statisticky významných rozdílů oproti kontrole.

Koncentrace 50, 25, 10, 5 a 1 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnými hodnotami absorbance 1,75, 0,91, 1,30, 0,95, 0,79 a směrodatnými odchylkami 0,15, 0,19, 0,22, 0,21, 0,16 u květu *T. officinale* se statisticky významně liší. Vyjimku tvoří jen koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$, která statistickou významnost neovlivnila. Poslední bylinou, která byla použita byl květ z *C. intybus*. U tohoto květu u koncentrací 50 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou absorbance $0,60 \pm 0,13$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnou hodnotou $0,61 \pm 0,06$ se hodnoty absorbance statisticky významně liší od absorbance kontroly. U zbývajících koncentrací (25 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$) s průměrnými hodnotami absorbance 0,75, 0,74, 0,78 a směrodatnými odchylkami 0,12, 0,10, 0,17 nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou a průměrnou hodnotou absorbance vzorku.

V následujících grafech (5. – 8.) byly posuzovány stejné druhy květů jako u buněk linií HaCaT, pouze byly použity hepatocyty (HepG2). Koncentrace polyfenolických látek v extraktu byly použity stejné, jako u buněk linie HaCaT 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tab. 4: Antiproliferační vliv různých koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v jednotlivých květech na buňky linie HepG2 pomocí MTT testu (průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka)

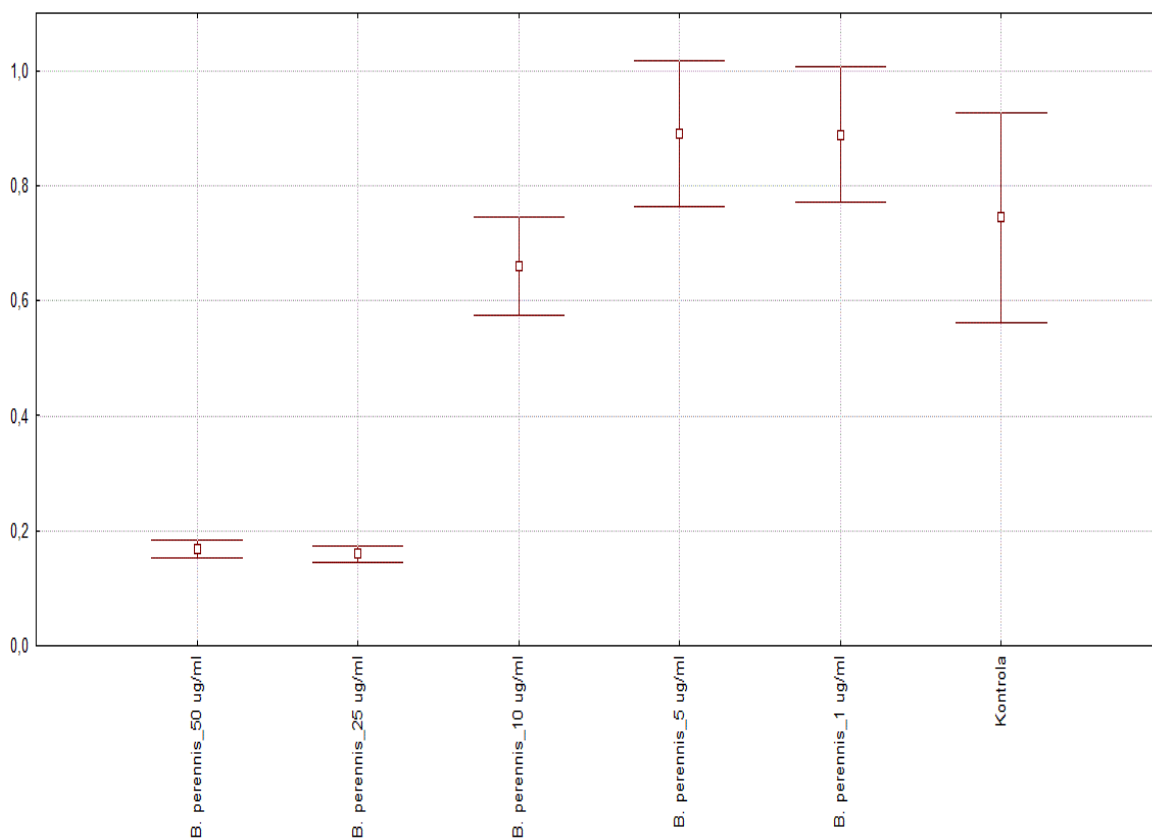
<i>Bellis perennis</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,1684 \pm 0,0157**
<i>Bellis perennis</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,1595 \pm 0,0139**
<i>Bellis perennis</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,6603 \pm 0,0900
<i>Bellis perennis</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,8897 \pm 0,1339**
<i>Bellis perennis</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,8888 \pm 0,1233**
<i>Tragopogon pratensis</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,5955 \pm 0,1132**
<i>Tragopogon pratensis</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,7103 \pm 0,1259
<i>Tragopogon pratensis</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,4963 \pm 0,0668**
<i>Tragopogon pratensis</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,6445 \pm 0,0484
<i>Tragopogon pratensis</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,8716 \pm 0,2497
<i>Taraxacum officinale</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	1,7482 \pm 0,1545**
<i>Taraxacum officinale</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,9147 \pm 0,1939**
<i>Taraxacum officinale</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	1,3009 \pm 0,2168**
<i>Taraxacum officinale</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,9511 \pm 0,2117**
<i>Taraxacum officinale</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,7866 \pm 0,1557
<i>Cichorium intybus</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,5898 \pm 0,1297**
<i>Cichorium intybus</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,7453 \pm 0,1229
<i>Cichorium intybus</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,6119 \pm 0,0590**
<i>Cichorium intybus</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,7447 \pm 0,1060
<i>Cichorium intybus</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,7763 \pm 0,1728
Kontrola	0,7443 \pm 0,1920*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech jsou statisticky průkazné $P < 0,05$ (*, **)

9.2.1 Sedmikráska chudobka (*Bellis perennis*)

Výsledky antiproliferačního účinku *B. perennis* na HepG2 uvádí graf 5. U kontrolního měření byla naměřena hodnota absorbance $0,74 \pm 0,19$. Nejvyššího antiproliferačního účinku u tohoto květu bylo dosaženo u koncentrací 50 a 25 $\mu\text{g/ml}$, u kterých byl zaznamenán největší pokles průměrné hodnoty absorbance oproti kontrole z 0,74 až na 0,17 a 0,16 se stejnými směrodatnými odchylkami 0,01. U těchto dvou koncentrací byl zaznamenán nejvyšší pokles v proliferaci. Vyhodnotí-li se totéž procentuálně, byl zde zaznamenán pokles proliferace u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ o 77 % a při koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ až 80 %. Koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ proliferaci ovlivnila méně než předchozí koncentrace, protože u ní došlo k poklesu od hodnoty absorbance od kontroly z $0,74 \pm 0,19$ jen na $0,66 \pm 0,09$. Koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ proliferaci statisticky významně neovlivnily, protože zde byl místo poklesu zaznamenán nárůst průměrné hodnoty absorbance od kontroly hodnoty absorbance. U koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ vrostla průměrná hodnota absorbance od kontroly z 0,75 na $0,89 \pm 0,13$ a u koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ z 0,75 na $0,88 \pm 0,12$. Tyto koncentrace proliferační aktivitu dokonce zvýšily.

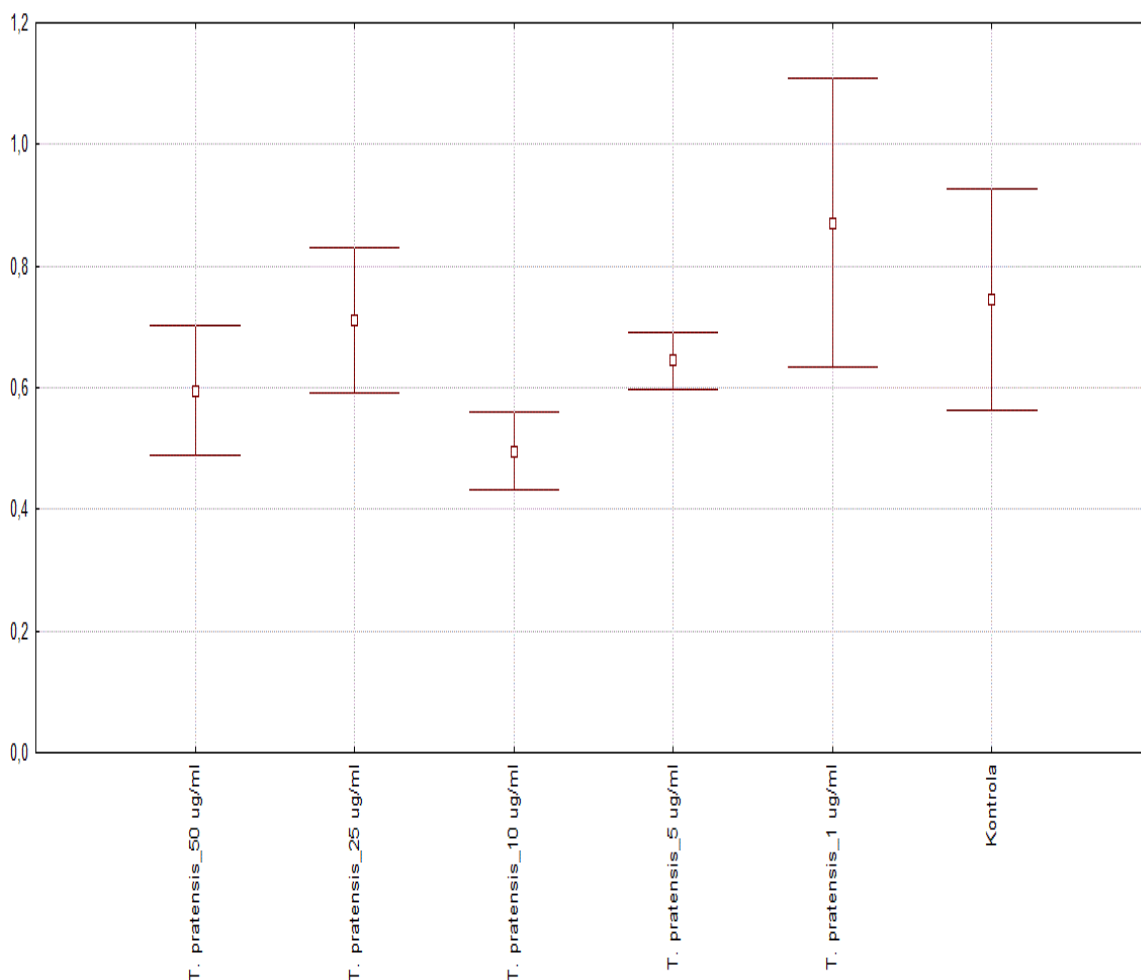
Graf 5: Antiproliferační efekt extraktu *B. perennis* na buňky linie HepG2 (průměr \pm směrodatná odchylka)



9.2.2 Kozí brada luční (*Tragopogon pratensis*)

Extrakt z *T. pratensis* (graf 6.) přidáním polyfenolů o nejnižší koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ neovlivnil proliferaci buněk linie HepG2, protože u této koncentrace průměrná hodnota absorbance vzrostla od kontrolního měření z 0,74 na 0,87 se směrodatnou odchylkou 0,25. Antiproliferační účinek se projevil při koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$, kde byl zaznamenán pokles hodnoty absorbance od kontroly z $0,74 \pm 0,19$ na $0,64 \pm 0,05$. U koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ byl zaznamenán nejvyšší rozdíl od kontrolního měření s průměrnou hodnotou absorbance $0,50 \pm 0,06$. Tudiž tato koncentrace významně ovlivnila proliferaci oproti kontrole. Koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$ s průměrnými hodnotami absorbance 0,71 a 0,60 a směrodatnými odchylkami 0,13 a 0,11 účinek proliferace statisticky významně ovlivnili.

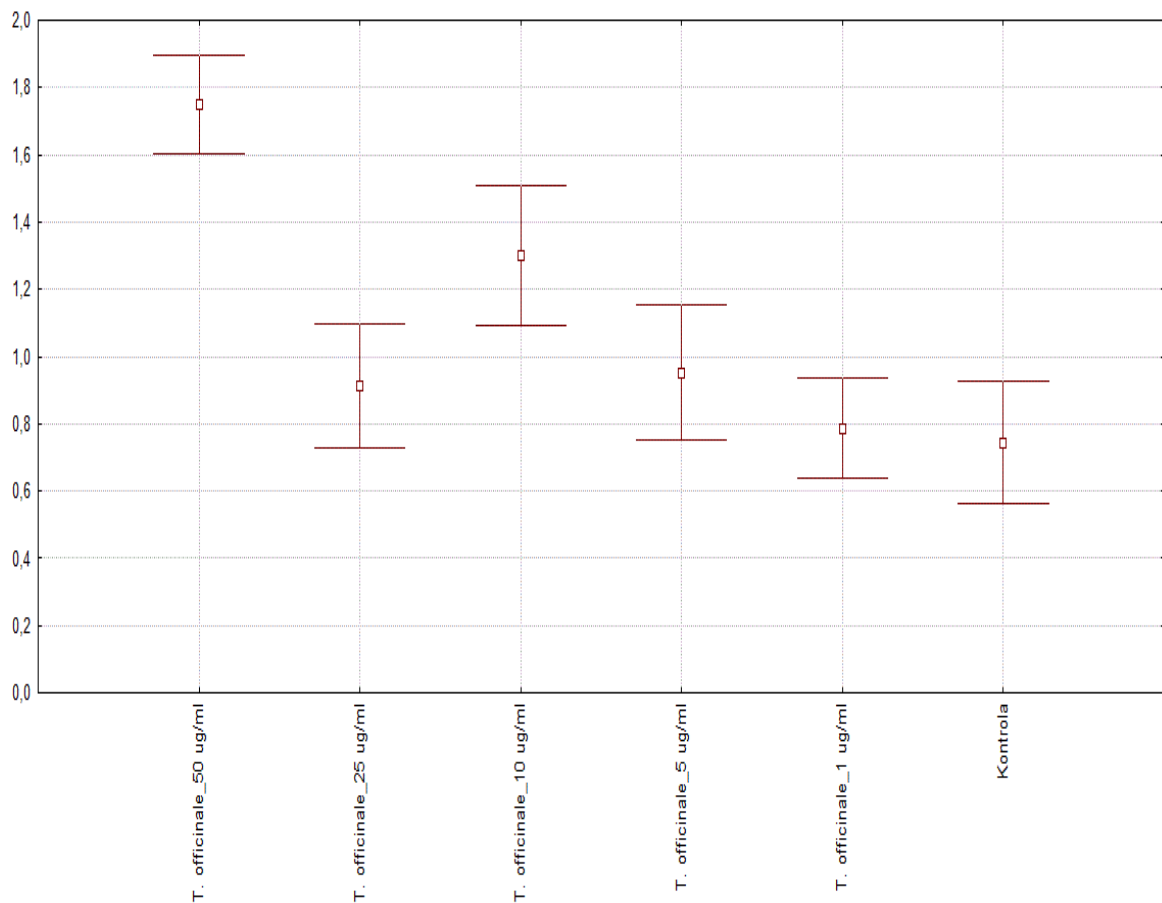
Graf 6: Antiproliferační efekt extraktu *T. pratensis* na buňky linie HepG2 (průměr \pm směrodatná odchylka)



9.2.3 Smetánka lékařská (*Taraxacum officinale*)

Měření proliferace s přidanými polyfenoly z *T. officinale* (graf 7.) přinesla tyto výsledky: Se zvyšující se koncentrací polyfenolů se očekávalo, že bude platit nepřímá úměra jako u ostatních extraktů a proliferace se bude se zvyšující koncentrací polyfenolů snižovat. V tomto případě se buňky chovaly přesně opačně a s rostoucí koncentrací polyfenolů, hodnoty absorbance také rostly. Přidáním polyfenolů o nejvyšší koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ polyfenolů byla zaznamenána velmi vysoká průměrná hodnota absorbance. U této koncentrace hodnota absorbance vzrostla od kontroly z 0,74 až na 1,74 se směrodatnou odchylkou 0,15. Tato hodnota absorbance je hodnotou nejvyšší ze všech průměrných hodnot absorbance u linie buněk HepG2. Koncentrace nižší než 50 $\mu\text{g/ml}$ nevykazují antiproliferační účinek na buňky linie HepG2. U koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ došlo k vzestupu hodnoty absorbance od kontroly na $0,91 \pm 0,19$, u koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ vzrostla hodnota absorbance na $1,30 \pm 0,22$ u koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ hodnota absorbance vzrostla na $0,95 \pm 0,21$ a u nejnižší koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ vzrostla průměrná hodnota absorbance na $0,78 \pm 0,15$.

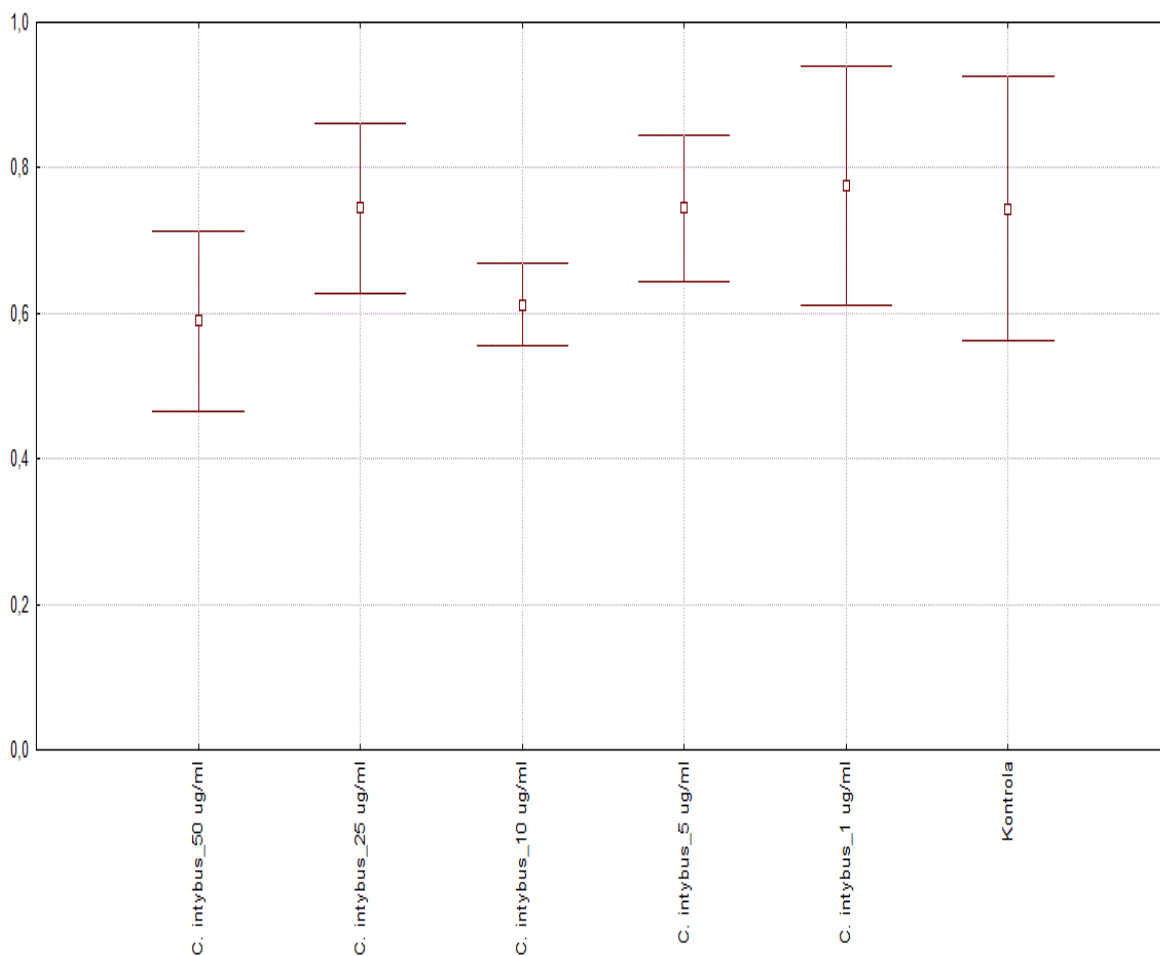
Graf 7: Antiproliferační efekt extraktu *T. officinale* na buňky linie HepG2 (průměr \pm směrodatná odchylka)



9.2.4 Čekanka obecná (*Cichorium intybus*)

Posledním vybraným květem byl *C. intybus* (graf 8). Koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ dosáhla antiproliferačního účinku, protože její hodnota absorbance klesla od kontroly z $0,74 \pm 0,19$ na $0,58 \pm 0,1$. U koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ byla zaznamenána hodnota absorbance $0,75 \pm 0,12$, což je jen o 0,01 vyšší než průměr absorbance kontroly $0,74 \pm 0,19$. Tudiž tato koncentrace významně proliferaci neovlivnila. U koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ došlo k poklesu hodnoty absorbance od kontroly z 0,74 se směrodatnou odchylkou 0,19 na 0,61 se směrodatnou odchylkou 0,06. Procentuálně došlo k poklesu průměrné hodnoty absorbance jen o 18 %. U koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ byla zaznamenána průměrná hodnota absorbance 0,74 stejná jako u kontroly 0,74, se směrodatnou odchylkou 0,10. U nejnižší koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ došlo taktéž k vzrůstu hodnoty absorbance od kontroly z 0,74 na 0,77.

Graf 8: Antiproliferační efekt extraktu *C. intybus* na buňky linie HepG2 (průměr \pm směrodatná odchylka)



9.3 Antimikrobiální efekt

Antimikrobiální efekt je dán průměrem šířky inhibiční zóny. Inhibiční zóna byla vyhodnocena průměrem ze dvou petriho misek. U všech použitých extraktů (*T. officinale*, *B. perennis*, *T. pratensis* a *C. intybus*) měla velikost 0 mm viz. Tab. 5. Takže použité množství 15 µg/ml polyfenolů extraktu z květů použitých bylin nevykazovala antimikrobiální efekt.

Tab. 5: Desková difúzní metoda (průměr disku / šířka inhibiční zóny)

Vzorek		Průměr* / šířka inhibiční zóny (mm)											
		<i>E. coli</i> (CCM 4517)			<i>S. aureus</i> (CCM 4516)			<i>C. albicans</i> (CCM 8215)			<i>A.niger</i> (CCM 822)		
		1.	2.	Ø	1.	2.	Ø	1.	2.	Ø	1.	2.	Ø
<i>T. officinale</i>	miska 1	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	miska 2	10/0	10/0		10/0	0/0		10/0	10/0		10/0	0/0	
<i>B. perennis</i>	miska 1	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	miska 2	10/0	10/0		10/0	0/0		10/0	10/0		10/0	0/0	
	miska 2	10/0	10/0		10/0	0/0		10/0	10/0		10/0	0/0	
<i>T. pratensis</i>	miska 1	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	miska 2	10/0	10/0		10/0	0/0		10/0	10/0		10/0	0/0	
<i>C. intybus</i>	miska 1	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
	miska 2	10/0	10/0		10/0	0/0		10/0	10/0		10/0	0/0	

*- tj. Ø disku + 2x zóna

9.4 Diskuze

V této diplomové práci byl sledován vliv polyfenolů extrahovaných z květů sedmikrásky chodobky (*Bellis perennis*), kozí brady luční (*Tragapogon pratensis*), smetánky obecné (*Taraxacum officinale*) a čekanky obecné (*Cichorium intybus*) na buňky dvou buněčných linií. Z každého vzorku bylo naředěno pět koncentrací polyfenolů (50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml a 1 µg/ml) a tyto koncentrace se nechaly následně působit na lidské keratinocyty (HaCaT) a hepatocyty (HepG2). Z výsledků je zřejmé, že antiproliferační efekt se liší v závislosti na bylině z níž květy pocházely a na použité koncentraci celkových polyfenolů v kultivačním médiu.

V této práci dosáhly nejvyššího antiproliferačního účinku na buňky obou buněčných linií extrakty z květu byliny *B. perennis* u kterého u nejvyšší koncentrace přidaných polyfenolů došlo k poklesu proliferace buněk linie HaCaT o 63 % a u buněk linie HepG2 až o 79 %. Autoři Kuceková a kolektiv (2011) zkoumali antiproliferační účinek bylin (*A. schoenoprasum*, *T. pratensis* a *R. acetosa*) na buňky linie HaCaT. Přišli na to, že fenolické sloučeniny obsažené v těchto květech výrazně snižují proliferaci buněk. Výsledky této studie dosáhly hodnoty snížení proliferace až o 80 %. K obdobnému závěru dospěli také Murugan *et al.* (2010), kteří použili buňky linií HepG2 a Way *et al.* (2009) na buňkách linie MCF-7. Nejvyšší celkový obsah polyfenolů měl extrakt květu byliny *C. intybus*, který se na antiproliferačním účinku v působení na buňky linie HaCaT dělí o druhé místo s extraktem květu byliny *T. pratensis*. Je tedy zřejmé, že více než celkový obsah polyfenolů v květech má větší vliv jednotlivých zastoupení dílčích polyfenolů ve směsi. Tento fakt se může přičíst kyselině kávové, která v čerstvém květu byliny *C. intybus* zaujímá nejvyšší obsah (1808, 32 µg/g) [HEIMLER *et al.*, 2009]. Ve studii Jaganathan and Mandal (2009) prokázali, že kyselina kávová v kombinaci s dalšími antioxidanty že potlačuje nádor tlustého střeva u potkanů. Chung *et al.* (2004) dokázal, že perorální podávání kyseliny kávové a fenyl kyseliny kávové (CAPE) snížila vznik jatrných metastáz. Natarajan *et al.* (1996) prokázal, že CAPE má antimitogenní, antikarcinogenní, protizánětlivé a imunomodulační vlastnosti a zároveň chrání kožní buňky proti UV záření. Conforti *et al.* (2008) zjistili, že květ z bylin z *C. intybus* obsahuje nejvyšší obsah polyfenolických látek tak jako bylo zjištěno v této práci a má pozitivní účinek na melanom. Významné množství polyfenolů bylo stanoveno i v květu *T. pratensis*. Čerstvý květ byliny *T. pratensis* obsahuje 226,16 µg/g kyseliny gallové. Podle Proteos *et al.* (2008) obsah

kyseliny gallové je například 15 $\mu\text{g/g}$ sušiny vzorku v eukalyptu a 26 $\mu\text{g/g}$ v sušině vzorku čaje vyskytujícího se v horách. Kyselina gallová je volným radikálem s významnými účinky na buněčnou proliferaci a indukuje apoptózu v řadě nádorových buněčných linií a vykazuje selektivní toxicitu proti nádorovým buňkám [SOHI *et al.*, 2003]. Nejnižší antiproliferační efekt na buňky linie HaCaT vykázal extrakt květu byliny *T. officinale* s nejmenším obsahem polyfenolů. Celkově se antiproliferační efekt na buňky linií HepG2 lišil od buněk linií HaCaT. Bylo zjištěno, že nejvyšší celkové množství polyfenolů nemusí mít vždy nejvýraznější účinek na proliferaci buněk. Příkladem je extrakt květu byliny *T. officinale*. Zde nejvyšší koncentrace polyfenolů významně neovlivnila antiproliferační efekt, způsobila místo poklesu proliferace zvýšení až na nejvyšší hodnotu absorbance u buněk linií HepG2. Tento výsledek naznačuje, že proliferace může být ovlivněna i jinými extrahovanými účinnými látkami, které nebyly v extraktech stanovovány. Zajímavými koncentracemi u buněk linií HepG2 jsou nízké koncentrace u květu byliny *B. perennis*, které antiproliferační aktivitu taktéž zvýšily. U extraktu květu byliny *C. intybus* se antiproliferační efekt na buňky linie HepG2 pohyboval v rozmezí jen 18 – 20 % a u extraktu květu *T. pratensis* v rozmezí 21 – 34 %. Zjištěnou antiproliferační aktivitu polyfenolů lze vysvětlit odlišností cílových metabolických a molekulárních buněčných drah kontrolujících buněčnou proliferaci, diferenciaci a buněčnou smrt [LIN, 2002]. Podle Yeh a Yen (2006) kyselina gallová, která je přítomna ve všech extraktech zvyšuje hladinu fosforylovaného JNK (c-Jin N-koncová kináza) a P38 a téměř úplně blokuje inhibici dráhy P38 MAPK (mitogen activated protein kinase). Kyselina ferulová obsažená ve všech květech kromě květu *T. officinale* inhibuje aktivaci ERK (signál regulové kinázy). Resveratrol, který se vyskytuje také ve všech květech aktivuje, JNK a P38 MAPK. Resveratrol má ochranný účinek v lidských buňkách karcinomu jater HepG2, které vyvolávají většinu běžných funkcí jater [SOLEAS *et al.*, 1997]. Kyselina sinapová nalezena ve všech květech použitých bylin kromě květu byliny *B. perennis* se podílí na MAPK dráze [FILOMENI *et al.*, 2006]. V nedávné studii specifických polyfenolů frakce z brusinek se ukázalo, že dokáže indukovat apoptózu v několika lidských buněčných liniích karcinomu prsu a brzdí progresi buněčného cyklu [FERGUSON *et al.*, 2004]. Ve studiích týkajících se polyfenolů extrahovaných ať z čajů, nebo z jiných rostlinných materiálů, se výsledky účinku polyfenolů shodují. Většina autorů však dodává, že experimenty byly provedeny s kulturami v podmínkách *in vitro*, které nemusí plně odpovídat výsledkům, jež by se získaly při *in vivo* testech. Ve studiích Hydeyuki *et al.* (2000) našli že epigallokatechin

gallát (EGCG), hlavní polyfenol vyskytující se v zeleném čaji a některé oligomery vyskytující se v léčivých rostlinách vykazují silnou cytotoxickou aktivitu proti lidským ústním nádorovým buněčným liniím (HSG, HSC-2). EGCG vykazuje zanedbatelnou nebo slabou toxicitu na normální buňky (HGF). Ve studiích Kumar *et al.* (2006) zkoumali antiproliferační aktivitu triterpenoidných extraktů z květů stromu *A. indica* na buněčné linie U937, HL-60, THP1 a B16. Jejich výsledky poukazují na to že antiproliferační efekt tohoto květu predikuje možnost využití v protinádorové terapii. Studie Srivastava *et al.* (2006) hodnotily protinádorové vlastnosti z extraktu květu z *M. chamomilla* proti různým lidským nádorovým buněčným liniím. Tyto extrakty způsobily minimální inhibiční reakce v růstu na normální buňky, zatímco významně snížily životaschopnost buněk. Působení extraktu květu z byliny *M. chamomilla* vede k diferencíální apoptóze v nádorových buňkách.

Z těchto závěrů vyplývá, že potenciální využití přírodních polyfenolických látek obsažených v květech použitých bylin a to jak pro léčbu tak prevenci nádorových onemocnění. Výsledky naznačují, že antiproliferační efekt není závislý výhradně jen na celkovém obsahu fenolických látek nebo složení, ale může být ovlivněna jinými extrahovanými látkami, které nebyly stanovovány. Výsledky potvrzují, že i nízká koncentrace polyfenolů může potlačit proliferaci nádorových buněk významnou měrou.

ZÁVĚR

V diplomové práci bylo cílem popsat vliv polyfenolů extrahovaných z květů čtyř druhů bylin (*B. perennis*, *T. officinale*, *T. pratensis* a *C. intybus*) na buněčnou proliferaci a porovnat výsledky s jinými výzkumy. Antiproliferační efekt extraktů na eukaryotické buňky byl vyhodnocen pomocí MTT testu na dvou buněčných liniích (HaCaT a HepG2). Tato práce se také zabývala stanovením antimikrobiálních vlastností těchto extraktů, které však neměly žádný antimikrobiální efekt na použité mikroorganismy (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* a *A. niger*).

Účinnost polyfenolů na buňky lze hodnotit ze dvou pohledů. Prvním kritériem je koncentrace a druhým je typ buněk, které byly k testu použity. Z pohledu vlivu použité koncentrace na buňky linie HaCaT vyšel jako nejúčinnější květ byliny *B. perennis*, které působil významně již v malých koncentracích. Na druhém místě se umístil květ byliny *T. pratensis* a *C. intybus*, které statisticky významně ovlivnily proliferaci u všech koncentrací. A na posledním místě se umístil květ byliny *T. officinale*, který proliferaci ovlivnil ve všech koncentracích kromě koncentrace 5 µg/ml. Z pohledu vlivu použité koncentrace na buňky linie HepG2 vyšel jako nejúčinnější květ byliny *B. perennis*, které působil významně jenom ve vyšších koncentracích. Na druhém místě se umístil květ byliny *T. pratensis*, jehož výsledky byly statisticky významné v polovině měření a květ bylin *C. intybus*, který statisticky významně ovlivnil proliferaci jen u koncentrace 10 µg/ml a 50 µg/ml. A výjimku tvoří květ byliny *T. officinale*, který proliferační aktivitu buněk HepG2 neovlivnil v žádné koncentraci. V celkovém hodnocení antiproliferační účinnosti na buňky linií z vybraných květů bylin, účinkovaly nejvíce polyfenoly extrahované z květu byliny *B. perennis*.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AERTS, ROB J., BARRY, TOM. N., WARREN, C. McNabb. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of pranthocyanidins on forages. *Agriculture. Ecosystems and Environment* 75 (1999) 1-12.
- AHMED, S. A., GOGAL, R. M., ALSH, J. E. A nex rapid and simple non-radioactive assai to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to ³H thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods* (1994) Pages 211-224.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. WALTER, P. Molecular biology of the cell (4th edition). *Garland Science* (2002) pp. 983-1062 ISBN-10: 0-8153-3218-1.
- ALBERTS, N., BRAY D., JOHNSON, A., LEWIS, J. Základy buněčné biologie, úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem. *Esp. Pub.* (1998) 740 s. ISBN: 978-0-8152-2045-6.
- ANDERSEN, O. M., MARKHAM, KR. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications. *CRC Press* (2006) p. 471-552.
- ANDRIOT I., Le QUERE J. L. & GUICHARD E. Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: Impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chemistry* (2004) 85 (2): 89–294.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R., SEIDMAN D. D., SMITH J. A., STRUHL, K. Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sonc Inc. (2002) 728 s. Pp. 102-109.
- BERTELLI AA., GOZZINI A., STRADI R., STELLA S., BERTELLI A. Stability glycon piceid are stable polyphenols". *J Med Food* (1998) 9 (1).
- BICKER, J., PETEREIT, F., HENSEL, A. Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa L.* *Fitoterapia* 80 (2009) 483–495.
- BONERZ, D., WÜRTH K., & DIETRICH, H. Analytical characterization and the impact of ageing in anthocyanin composition and degradation in juices from five sour cherry cultivars. *European Food Research and Technology* (2006) 224, 355–364.

- BOUKAMP, P., PETRUSSEVSKA, R., BREITKREUTZ, D., HOURNUNG, J., MARKHAM, A. Normal keratinization in spontaneously immortalized aneuploid keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* (1988) 106, 761-771.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* (1998) 56: 317-333.
- BUCHANAN, B. B. GRUISSEM, W., JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *Am. Soc. of Pl. Physiol.*, Rockville (2000) 852 s. ISBN: 978-0-943088-37-2.
- BUTLER, M., & CHRISTIE, A. Adaptation of mammalian cells to non-ammonogenic media. *Cytotechnology* (1994) 15: 87-94.
- CAMPBELL, Neil A., REECE, JANE B. Biologie, první vydání, *Computer press* 2276 publikace (2006) 1132 s. ISBN: 80-1178-4.
- CANSTANAS, E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human cancer cells. *J. Cell. Biochem.* (2000) 78, 439-441.
- CARRNEY, D. N., BUNN, P. A., GAZDAR, A. F., PAGAN J. A., MINNA, J. D. Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1981) 78:3185-3189.
- CAZAROLLI, H., ZANATTA, L., ALBERTON, E. H.H., FIGUEIREDO, M. S. R. B., FOLADOR P., DAMAZIO, R.G., PIZOLATTI, M. G., SILAV, F. R.M. B. Flavonoids: Prospective drug candidates. *Mini Rev. Med. Chem.* (2008) 8: 1429-1440.
- CELLIS, J. E.; RASMUSSEN, H. H.; OLSEN, E., MADSEN, P.; LEFFERS, H., HONORÉ, B.; DEJGAARD, K.; GROMOV, P.; VORUM, H., VASSELEV, A.; BASKIN, Y.; LIU, X.; CELIS, A. The human keratinocyte two-dimensional gel protein database: Towards an integrated approach to the study of cell proliferation, differentiation and skin diseases. *Electrophoresis* (1994) 15: 1349-1458.
- CLIFFORD, M. N., J. SCALBERT, A. Ellagitannins – nature occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.* (2000) 80: 1118-1125.
- COOPER, R., MORRÉ, DJ., MORRÉ, D. M. Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of non-cancer health benefits. *J Altern Complement Med.* (2005) 11: 521-8.

- CRESPY, V., WILLIAMSON, G. A review of the health effects of green tea catechins in vivo animal models, The American Society for Nutritional Sciences *J. Nutr.* (2004) 134: 3431S-3440S.
- CROZIER, A., BURNS, J., AZIZ, A. A., STEWART, E. J., RABIASZ, H. S., JENKINS G. I., EDWARDS CA., LEAN MEJ. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages measurements and bioavailability. *Biological Research* (2000) 33 (2): 79-88.
- ČERMÁK, K R., WOLFFRAM, S. The potential of monogonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms". *Curr. Drug Metab.* (2006) 7 (7): 729–44.
- DAMIANAKI, A., BAKOGEOROU, E., KAMPA, M., NOTAS, G., HATYOGLUOU, A., PANAGIOTOU, S., GEMERYI, C., KOUROUMALIS, E., MARTIN, P. M. CANSTANAS, E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human cancer cells. *J. Cell. Biochem.* (2000) 78, 439-441.
- DAVALOS A., CASTILLA P., GOMEZ-CORDOVES C., BARTOLOME B. Quercetin is bioavailable from a single ingestion of grape juice. *Int. Food Sci. Nutr.* (2006) 57, 391-398.
- DEL CARO., & PIGA, A. Polyphenol composition of peel and pulp of two Italian fresh fig fruits cultivars (*Ficus carica* L.). *European Food Research and Technology* (2008) 226, 715–719.
- DUTHIE, G. G., GARDNER P. T., KYLE J.A. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.* (2003) 62 (3) s. 599-603.
- EAGLE, H. The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. *J. Cell Physiol.* (1973) 82:1–8.
- EDWARDS, CA., LEAN, MEJ. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages measurements and bioavailability. *Biological Research* (2000) 33 (2): 79-88.
- EISINGER, M.; LEE, J. S.; HEFTON, J. M.; DARZYKIEWICT, A.; CHIAO J. W.; DAHERVEN E. Human epidermal cell cultures: Growth and differentiation in the absence of dermal components or medium supplements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76: 5340.

- FERGUSON, P. J., KUROWSKA, E., FREEDMAN, D. J., CHAMBERS, A. F., KOROPATNICK, D. J. A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *J. Nutr.* (2004) 134:1529-35.
- FILOMENI, G., GRAZIANI, I., ROTILIO, G., CROLO, M. R. *trans*-Resveratrol induces apoptosis in human breast cancer cells MCF-7 by the activation of MAP kinases pathways. *Genes Nutr.* (2007) 2, 295-305.
- FLÉMOND, L. Biological effects of resveratrol, *Life Sciences* (2000) Pages 663-673.
- FORKMANN, G., HELLER, W. Biosynthesis of flavonoids. In: *Comprehensive Natural Product Chemistry*. Amsterdam elsevier (1999) pp. 713-748.
- FRAME, M., NORMAN, J. A tal (in) of cell spreading. *Nat. Cell Biol.* (2008) 10: 1017–1019.
- FRANKEL, EN., KANNER, J., GERMAN, JB., PARKS, E., KINSELA, JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* (1993) 341: 454-7.
- FRESHNEY, I. Cell line prohnance, Cytotechnology Printed in the Netherlands. *Academic Publishers* (2002) 39: 55–67.
- FRESHNEY, R. I., & FRESHNEY M. G. Culture of epithelial cells. Second Edition, Hoboken, nj. Wiles-liss, Inc. *Copyright* (2002) Chapters 6, 10, 11, 12, 13 ISBN: 978-0-471-22120-1.
- FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells, a manual of basic technique and specialized applications, sixth *edition*, *Copyright* (2010) ISBN 978-0-470-52812-9.
- FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells, a manual of basic technique 5th edition, Hoboken NJ, *John Wiley & Sons* (2005) ISBN: 978-0-471-45329-1.
- GAO, K. P. *Zhongguo shiliao bencao*. Beijing, China: *Chemical Industry Press*. (2006) p. 400.
- GALEOTTI, F., BARILE, E., CURIR, P., DOLCI, M., LANZOTTI, V. Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochemistry* (2008) Letters 1: 44.

- GERRITSEN, M. E., CARLEZ W. W., RANGES G. E., SHEN C. P., PHAN S.A, LIGON G. F. PERRY C. A. Flavonoids inhibit cytosine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* (1995) 147: 278-292.
- GONZALEZ, R. J., TARLOFF, J. B. Evolution of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in Vitro* (2001) Pages 257-259.
- GOOD, N. E.; WINGET G. D.; WINTER W., CONNOLLY T. N.; IZAWA, S.; SINGH E. M., M. Hydrogen ion buffers and biological research. *Biochemistry* (1966) 5: 467-477.
- GOTTWALD, E., LAHNI, B., THIELE D., GIESLBERCHT S., WELLE, A., WEIBEZAHNN, K. F. Chip-based three-dimensional cell culture in perfused micro-bioreactors. *J. Vis. Exp.* (2008) 15: 564.
- GUZEL, Z., NIZAMOVA, A., BUDNIKOV, H. Novel Coulometric Approach to evaluation of total free polyphenols on tea and coffee beverages in presence of milk proteins, Springer science. *Food analytical methods* (2011) 4: 334-340.
- GRABIAS, B., DOMBROWICZ, E., KALEMBA, D., SWIATEK, L. Phenolic acids in Flores Bellidis and Herba Tropaeoli. *Herba Pol.* (1995) 41, 111-114.
- GUDEJ J., NAZARUK J. Flavonol glycosides from the flowers of *Bellis perennis*. *Fitoterapia* (2001) 72, 839-840.
- HAKIMUDDIN, F., TIWARI, K., PALIYATH, G., MECKLIG, K. Grape and wine polyphenols down – regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor – negative MDA-MB231 tumors in nu/nu mouse xenografts. *Nutrition Research* (2008) 702-713.
- HALLIWELL, B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: The biomarker concept. *Nutr Rev* (1999) 57:104-113.
- HARBORNE, JB. Plant phenolics. Encyclopedia of Plant Physiology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York *Plant Products* (1980) Pp: 329-395.
- HEIMLER, D., ISOLANI L., VIGNOLINI, P., ROMANI, A. Polyphenols content and antioxidant activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chemistry* 114 (2009) 765-770.

- HEINRICH, A., BALSZUWEIT, F., THIERMANN, H. Rapid simultaneous determinativ of apoptosis, necrosis, and viability in sutur mustares exposed HaCaT cell cultures, *Toxicology Letters* 191 (2009) 260–267.
- HERTOG, M. G. L. Flavonols in Wine and Tea and Preventetion of Coronary Heart Disease. In: 18th International Conference on Polyphenols, *Popolyphenols 96-Colloques Del NRA*. (1998) 87: 117-131.
- HIGDON, J. V. Tea catechins an polyphenol: Heath effects, metabolit, and antioxidant function, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2003), 43(1):89-143.
- HOLLMAN, P. C., VRIES, de J. H., LEEUWEN, VAN S.D. , MENGELERS , M. J., KATAN ,M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* (1995) 62, 1276–1282.
- HOUR, TC., LIANG, YC., CHU, IS., LIN, JK. Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-) epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffiene. *Food Chem Toxicol* (1999) 37:569-579.
- HU C., KITTS DD. Antioxidant, prooxidant, and cytotoxic activities of solvent dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.* (2003); 51: 301.
- HYVONEN, T., ALAKUIJALA, L., ANDERSON, L., KHOMUTOV, A. R., KHOMUTOV, R. M., ELERONTA, T. O. 1-Amino-oxy-3-aminopropane reversibly prevents the proliferation of cultured baby hamster kidney cells by intefering with polyamine systesis. *J. Biol. Chem.* (1988) 263: 1138-1144.
- CHUNG, KT., WONG, TY., WEI, CI., HUANG, YW., LIN, Y. Tannins and human helath a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* (1998) 38: 421-464.
- CHRISTENSEN, L. P., KNAACK, K., & FRETTE, X. C. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids. *European Food Research and Technology* (2007) 227(1), 293–305.
- KARMIOL, S. Development of serum-free media in masters, *Animal cell Cultue*, 3rd Ed. *Oxford University Press* (2000), 75 s. p. 335-363.
- KEDINGER, M., HAFFEN, K., ASSMAN, P. S. Intestinal tissue and cell cultures, *Cellulaire et Physiopathologie Digestive. Differentiation* (1987) 36: 71-85.

- KHAN N., MUKHTAR H. Tea polyphenols for health promotion. Review. *Life Sci.* (2007) 81(7): 519-33.
- KING, A., YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet Assoc.* (1999), roč. 99, č. 2, s. 213-218.
- KONG, J. M., CHIA, L. S., GOH, N. K., CHIA, T. F., BROUILARD, R. Analysis and biological actives of anthocyanins, *Phytochemistry* (2003), Nov; 64(5): 923-33.
- KRIS-ETHERTON, PM., KEEN, CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol.* (2002) 13: 41.
- KURIAMA, S., SHIMAZU, T., OHMORI, K., KIKUCHI, N. NAKAYA, N., NISHINO Y, TSUBONO Y, TSUJI I. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all cause in japan: *JAMA* (2006) 296(10):1255-65.
- LE MARCHAND, L., MURPHY, S. P, HANKIN J., WILKENS, LR., KOLONEL, LN. J. Intake of flavonoids and lung cancer. *Natl Cancer Inst.* (2000) 92 (2) 2: 154-60.
- LEE, S. H., TANAKA, T., NONAKA, G. I., NISHIOKA I. Tannins and related compounds. XCV. Isolation and characterization of helioscopinins and helioscopins, four new hydrolyzable tannins from *Euphorbia helioscopia* L. (1). *Chem. Pharm. Bull.* (1990) 38, 1518–1523.
- LESKO, J. Práce s tkanivovými kulturami, Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied Bratislava, (1975) 212 s., ISBN: 973-90-3988-032-2.
- LEUNG, AY., FOSTER, S. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, *Drugs and Cosmetics* (2nd edn.) (1996) 205–207s. ISBN: 04-1471-283.
- LI, L.-N. Biologically active components from traditional Chinese medicines. *Pure and Applied Chemistry* (1998) 70, 547–554.
- LIN, YS., TSAI, YJ., TSAY, JS., LIN, JK. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *Agric Food Chem* (2003) 51: 1864–73.
- LIN, J. K. Cancer Chemoprevention by Tea Polyphenols through Modulating Signal Transduction Pathways. *Arch. Pharm. Res.* (2002), 25, 561-571.
- LUTZ, M. P, GAEDICKE, G., & HARTMANN, W. Largescale cell separation by centrifugal elutriation. *Anal. Biochem.* (1992) 200:376–380.

- LUŠTINEC, J., ŽÁRSKÝ, V. Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Praha. *Nakl. Karolinum* (2003) 262 s. ISBN: 80-246-0563-5.
- LYSENG-W, K. A., PERRY, C. M. Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs* (2003) 63, 71–100.
- MANACH C., SCALBERT A., MORAND CH., REMESY CH., JIMENEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* (2004) roč. 79, č. 5, s. 727-747.
- MCCUE, P., SHETTY, K. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for Enhancement a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2004) 44:361-7.
- MOREIRA, R. F. A., TRUGO, L. C., De Maria, MATOS, A. G. B. SANTOS, S. M. & LEITE, J. M. C. Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition. *Archivos. Latinoamericanos de Nutricion* (2001) 51, 95–99.
- MUKHTAR, H., AHMAD, N. Tea polyphenols. Preventiv of cancer and optimizing health, *Am. J. Clin. Nutr.* (2000) 71, 1698S-702S.
- MULINACCI N., INNOCENTI S., GALLORI S., ROMANI A., La Marca G., VINCIERI F. F. Optimization of the chromatographic determinativ of polyphenols in the aerial part of *Cichorium Intybus* L., *Chemistry and material science* (2001) Numbers 7-8, 455- 461.
- NAEYART, J. M., GORDON, M., P. R., PARK, H. Z., & GILCHREST, N. A. Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br. J. Dermatol* (2006) 125: 297–303.
- NAZARUK J., GUDEJ J. Qualitative and quantitative chromatographic investigation of flavonoids in *Bellis perennis* L. *Acta Pol. Pharm.* (2001) 58, 401-404.
- NEČAS O., SVOBODA A., ČERVINKA M., KOLÁŘ Z. Obecná biologie pro lékařské fakulty, nakladatelství H & H (2000) 554 s. ISBN 80-86022-46-3.
- NEWALL, C. A., ANDERSON L. A., PHILIPSON J. D. Herbal Medicines. *The Pharmaceutical Press* (1996) 96–97.
- OLTHOF, M. R., HOLLMAN, P. C. H., & KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition*, (2001) 131, 66–71.

- OOMAH, B. D., HOSSEINIAN, F. S. Phytoestrogens. In: methods of analysis for functional foods and nutraceuticals, second edition. *CRC Press* (2008) pp. 1-65.
- PREISSMANN, A., WIESMANN, R., BUCHHOLZ, R., WERNER, R. G., NOE, W. Investigations on oxygen limitations of adherent cells growing on macroporous microcarriers. *Cytotechnology* (1997) 24: 121–134.
- PROKOP, J., ABRMAN, P., SELIGSON, A. L., SOVÁK, M. Resveratrol and its glykon Picek are stable polyphenols. *J Med Food* (2006) 9 (1): 11-4.
- QUATTROCCHI, U. CRC World Dictionary of Plant Names. 1 A-C. *CRC Press*. p. 6. (2000) 2896 s. ISBN 978-0-8493-2675-2.
- RADISIC, M., PARK, H., CHEN, F., SALAZAR-LAZZARO, J. E., WANG, Y., DENNIS, R., LANGER, R., FREED, L. E. VUNJAK, N. G. Biomimetic approach to cardiac tissue engineering: Oxygen carriers and channeled scaffolds. *Tissue Eng.* (2006) 12: 2077–2091.
- RECHNER, A. R., KUHNLE G., BREMNER P., HUDBARD, G. P., MOORE K. P, RICE-EVANS C. A. The metabolite fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol. and Med.*, (2002) 33: 220-235.
- RICE-EVANS, CA, MILLER, NJ., PAGANDA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend in Plant Science* (1997) 2: 12-159.
- ROEHM, N. W., RODGES, G. H., HATFIELD, S. M., GLASEBROOK, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* (1991) 142, 257–265.
- SASAKI, M., HONDA, T., YAMADA, H. WAKE, N., BARRET JC. Evidence for multiple pathways to cellular senescence. (1994) *Cancer Res* 54: 6090–6093.
- SAKKIADI, A. V., CONSTANTINOS A., HAROUTOUNIAN, G. S. A Standard Addition Method to Assay the Concentration of Biologically Interesting Polyphenols in Grape Berries by Reversed-Phase HPLC, *Molecules* (2007) 12, 2259-2269.
- SAMBROOK. J., FRITHS, E. F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2 nd. Ed. Col. Spr. Har. Lab., New York (1989), 1832 s.
- SCALBERT A., JOHNSON IT., SALTMARSH M. Polyphenols: antioxidants and blond. *Am J Clin Nutr.* (2005) 215S-217S.

- SCALBERT, A., JOHNSON, I. T, SALTMARSH, M. Dietary polyphenols and Health: Proceedings of the 1st international conference on polyphenols and health *American Journal of Clinical Nutrition* 81 (2005) (1), 215S-7S.
- SCALBERT, A., WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *American Journal of Clinical Nutrition* (2000) 2073 S-85S.
- SIATKA, T., KAŠPÁRKOVÁ. S. Seasonal in Total Phenolis and Flavonoid Contents and DPPH Scavenging Activity of *Bellis perennis* L. Flowers , *Molecules* (2010) 15 (12), 9450-9461.
- SLANINA J., TÁBORSKÁ E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy* 98: (2004) 239-245.
- SOHI, K. K., MITTAL, N., HUNDAL, M. K., KHANDUJA, K. L. Gallic acid, an antioxidant, exhibits anti apoptotic potential in normal human lymphocytes: a Bcl-2 independent mechanism. *J.Nutr.Sci. Vitaminol* (2003) 49, 221-227.
- SOLEAS, G. J. DIAMANDIS, E. P, GOLDBERH, D.M. Resveratrol: a molekule whose time has come?and gone? *Clin. Biochem* (1997) 30, 91-113.
- SPECTOR, D. L., GOLDMAN, R. D. Cell. Basic methods in mikroskopy: Protocols and concepts from Cells: A laboratory manual. Volumes 1, 2, 3, New York, sv. 2., *Laboratory Press* (1998), 197s .
- STOKER, M. g. P. Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. *Nature* (1973) 246:200–203.
- SUGUWARA T., IGARASHI K., Cultivar Variation in Flavonoid Components and Radical Scavenging Activity of Polyphenol Fractions Among Edible Chrysanthemum Flowers , *Food Science & Technology*, (2009) 56: 600-604.
- ŠTÍPEK, S., BOROVSANÁ, J. ČEJKOVÁ, J., HOMOLKA, J., KLENER, P., LUKÁŠ, M., ŠPIČÁK, J., TESAŘ, V., ZEMAN, M., ZÍMA, T., ŽÁK, A. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. 1. vyd. Praha: Grada Publishing (2000) 320 s. ISBN 80-7169-704-4.
- UEDA, K., KIM, KM, BEPU, T., HORINOUCI, S. Overexpression of a gene cluster encoding a chalcone synthase-like protein confers redbrown pigment production in *Streptomyces griseus*. (1995) 48: 638-646.

- UNCHERN, S. Basis techniques on animal cell culture, Bangkok, Drug Delivery System Workshop . *Laboratory Practice on Caco-2 Cell Culture* (1999) 5: 19-20.
- URQUIAGA, I., LEIGHTON, F. Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biol. Res.* v. 33 n. 2 Santiago (2000) ISSN 0716-9760.
- VALLS, J., MILLIAN, S., MARTI, P. M., BORRAS, E. AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. (2009) *Journal of chromatography A*, 126: 7143-7172.
- VAN AMALSVOORT, JMM., VAN HET HOF, KH., MATHOT, JNJJ, MULDER, TP, WIERSMA A., TIJBURG LB. Plasma concentrations of individual tea catechins after a single oral dose in humans. *Xenobiotica* (2001) 31: 891–901.
- VEBERIC, R., JAKOPIC, J., STAMPAR, F., SCHMITZER, V. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry* 114 (2009) 511–515.
- VELAYUTHAM, P. A. B., A., LIU, D. Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. *Current Medicinal Chemistry* (2008) 15, 1840-1850.
- VON BRIESEN, H., ANDREESSEN, R., BRUGGER W , MEICHSNER, C., BECKER, K., DUBSAMEN-WAIGMANN, H. Infection of monocytes/ macrophages by HIV *in vitro*. *Res Virol.* (1990) 141: 225–231.
- WANG, M., KIKUZAKI, H., ZHU, N., SANG, S., NAKATANI, N., HO, C.-T. Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000) 48: 235–238.
- WANG, Q., CUI J. Perspectives and utilization technologies of chicory (*Cichorium intybus* L.): A review. *Academic journals* 11, 1966-1977 (2011).
- WAYMOUTH, C. Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells, *in vivo*. (1970) 6: 109-127.
- WEN, M. & MAO, X. J. Research progress on chemical composition, antiinflammatory and antiallergic activity of *Sophora viciifolia*. *Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica* (2006) 27, 63–64.
- WESTERMARK, B., WASTESON, A. The response of cultured human normal glial cells to growth factors. *Adv. Metab. Disord.* (1975) 6: 109-127.

- WILLIAMS, CH. A., GOLDSTONE, F., GREENHAM J. Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*, *phytochemistry*, volume 42, Issue 1. (1996) Pages 121-127.
- WILLIAMSON, G., BARRON D., SHIMOI K., TERAJO J. *In vitro* biological properties of flavonoid conjugates found *in vivo*. *Free Radical Research*, (2005) 39(5): 457-469.
- WYLLIE, F. S. BOND, J. A. DAWSON, T., WHITE, D., DAVIES. R., WYNFORD-THOMAS, D. A phenotypically and karyotypically stable human thyroid epithelial line conditionally immortalized by SV40 large T. antigen. (1992) *Cancer Res.* 52: 2938–2945.
- YAMADA, K., M. GEIGER, B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1997) 9:76–85.
- YOSHIKAWA, M., NISHADA, E., NAKAMURA, S., MATHUSADA, H., MURAOKA, O., MORIKAWA, T. Medicinal flowers. XXI. Structures of perennisaponins A, B, C, D, E, and F, acylated oleananetype triterpene oligoglycosides, from the flowers of *Bellis perennis*. *Chem. Pharm. Bull.* (2008) 56, 559-568.
- ZEE, F. T., HAMASAKI, R. T., NAKAMOTO, O. S.T., KEITH, L.M., HUMMER, K. E., REED B.M., KAWABATA A. Producing potted ornamental ohelo, *Vaccinium reticulatum* (Smith) (2010).
- ZHANG, B., LIU, L. Advances in the study of pharmacological actions of water soluble constituents of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*). *Journal of Clinical Pharmacology* (1996) 35: 221–226.
- ZHANG, W., SEK, I M., FURUSAKI, S. Effect of temperature and its shift on growth and anthocyanin production in suspension cultures of strawberry cells. *Plant Sci.* 127 (1997) 207–214.
- ZHANG, L. T., RYU, G. M., KWON, B. M., SUK, K. Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: inhibition of microglial neurotoxicity". *Eur. J. Pharmacol.* (2008) 588 (1): 106–13.
- ZHIGANG, TAI, LE CAI, LIN , DAI, LIUHONG, DONG, MINGFENG, WANG, YABIN, YANG, QIUE ,CAI, ZHONGTAO, DING. Antioxidant activity and chemical constituents of edible flower of *Sophora viciifolia*. *Food Chemistry* (2011) 126, 1648–1654.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid
XTT	2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)
WST-1	Water soluble Tetrazolium
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
BrdU	Bromodeoxyuridine
FDA	Fluorescindiacetát
ATCC	American Type Culture Collection
HaCaT	Lidské keratinocity
HepG2	Hepatocyty
UV	Ultrafialové záření
DNA	Deoxyribonucleic acid
VIS	Viditelná část spektra
FACS	Facial Action Coding System – kódovací systém
Bcl-2	B-Cell lymphoma (buněčný kmen)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetis acid – kyselina ethylendiamintetraoctová
pH	Chemická veličina pro určení kyselosti
HEPES	4-(2 hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
BES	(pufrační látka)
TES	(pufrační látka)
R. T.	Room temperature – teplota místnosti
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EtOH	Ethanol
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PCR	Polymerázová řetězová reakce

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Antiproliferační efekt extraktu <i>B. perennis</i> na buňky linie HaCaT	53
Graf 2: Antiproliferační efekt extraktu <i>T. pratensis</i> na buňky line HaCaT	54
Graf 3: Antiproliferační efekt extraktu <i>T. officinale</i> na buňky linie HaCaT	55
Graf 4: Antiproliferační efekt extraktu <i>C. intybus</i> na buňky linie HaCaT.....	56
Graf 5: Antiproliferační efekt extraktu <i>B. perennis</i> na buňky linie HepG2.....	59
Graf 6: Antiproliferační efekt extraktu <i>T. pratensis</i> na buňky linie HepG2	60
Graf 7: Antiproliferační efekt extraktu <i>T. officinale</i> na buňky linie HepG2	61
Graf 8: Antiproliferační efekt extraktu <i>C. intybus</i> na buňky linie HepG2.....	62

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Hlavní třídy fenolických látek v rostlinách.....	14
Tab. 2: Obsah jednotlivých polyfenolů v květech	48
Tab. 3: Antiproliferační vliv různých koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v jednotlivých květech na buňky linie HaCaT pomocí MTT testu	51
Tab. 4: Antiproliferační vliv různých koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v jednotlivých květech na buňky linie HepG2 pomocí MTT testu	58
Tab. 5: Desková difúzní metoda (průměr disku / šířka inhibiční zóny)	63

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec flavonoidu.....	15
Obrázek 2: Strukturní vzorec kvercetinu	16
Obrázek 3: Strukturní vzorec kyanidinu	16
Obrázek 4: Strukturní vzorec resveratrolu	17
Obrázek 5: Strukturní vzorec katechinu	18
Obrázek 6: Strukturní vzorec kyseliny galové	19
Obrázek 7: Buněčný cyklus	32
Obrázek 8: Růstová křivka	33
Obrázek 9: Petriho miska extraktu květu z <i>C. intybus</i> za použití plísně <i>A. niger</i>	49