

Polyfenoly vína a jejich vliv na buněčnou smrt

Bc. Martina Majkusová

Diplomová práce



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. Martina MAJKUSOVÁ**

Osobní číslo: **T10414**

Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Polyfenoly ve víně a jejich vliv na buněčnou smrt**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika jednotlivých vín s ohledem na obsah účinných látek v nich.
2. Buněčná smrt.
3. Seznámit se s kultivací buněk.

II. Praktická část

1. Metodika buněčné kultivace.
2. Vliv polyfenolů na buněčnou smrt.

Rozsah diplomové práce: **tištěná/elektronická**
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. 2005. Molecular Biologie of the Cell 4th ed. Garland Science, 2002
- [3] ISNUSTAD, D.P. Genetika, Nakladatelství Masarikovy 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

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské 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/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou 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/bakalářskou 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/bakalářské 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/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské 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

.....

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 nevdělečně 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 těž 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 vzdělávacímu 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 výdělků jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložil, 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

Blahodárné účinky střídme konzumace vína souvisejí s obsahem a složením polyfenolických látek. Jejich antioxidační a protinádorové účinky byly mnohokrát prokázány v různých studiích. Cílem diplomové práce bylo sledovat vlivy polyfenolů extrahovaných z révy vinné na proliferaci a aktivitu nádorových a imortalizovaných buněk. Antiproliferační efekt byl hodnocen *in vitro* za použití různých koncentrací polyfenolických extraktů (1, 5, 10, 25 a 50 µg/ml). Studovány byly tři odrůdy révy vinné (Burgunda modrá, Frankovka a Moravský muškát) a tři typy buněčných linií (HaCaT, HepG2, NIH/3T3). Proliferace buněčných linií byla vyhodnocena pomocí MTT testu a detekce apoptózy byla provedena za použití průtokové cytometrie.

Klíčová slova: Proliferace, polyfenolické látky, buněčná linie, antioxidant.

ABSTRACT

Beneficial effects of moderate wine consumption are related to the content and composition of polyphenolic substances. Their antioxidant and anticancer effects have been demonstrated in various studies for many times. The aim of this thesis was to determine the effects of polyphenols extracted from the grapes on the proliferative activity of tumor and immortalized cells. Antiproliferative effect was evaluated *in vitro* using different concentrations of polyphenolic extracts (1, 5, 10, 25 a 50 µg/ml). The three grapes varieties (Blue Burgundy, Lemberger and Moravian Muscat) and three types of cell lines (HaCaT, HepG2, NIH/3T3) were studied. The cell proliferation was evaluated using the MTT assay and detection of apoptosis was performed using flow cytometry.

Keywords: proliferation, polyphenolic substances, cell lines, antioxidant.

Děkuji svému vedoucímu práce Ing. Petru Humpolíčkovi Ph.D., za cenné rady, připomínky a trpělivost při vedení práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině, za velkou podporu po celou dobu studia. Děkuji univerzitě za poskytnutý materiál k práci, a Ing. Zdeňce Kucekové za odbornou pomoc nejen v laboratoři.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA POLYFENOLŮ	12
1.1 JEDNODUCHÉ FENOLY	12
1.2 FENOLOVÉ KYSELINY	13
1.3 FLAVONOIDY.....	14
1.3.1 Chalkony	16
1.3.2 Flavony.....	16
1.3.3 Flavonoly.....	16
1.3.4 Anthokyany	17
1.3.5 Taniny	17
1.3.6 Isoflavonoidy.....	18
1.3.7 Stilbeny	19
1.3.7.1 Resveratrol	19
1.4 POLYFENOLY VE VÍNĚ	20
2 POLYFENOLY JAKO ANTIOXIDANTY	23
2.1 ANTIKARCINOGENNÍ ÚČINKY	24
2.2 PROTIZÁNĚTLIVÉ ÚČINKY.....	25
2.3 OVLIVNĚNÍ BUNĚČNÉHO STÁRNUTÍ	25
2.4 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY	25
2.5 OCHRANA PŘED SRDEČNÍMI CHOROBAMI	26
2.5.1 Vliv polyfenolů na tukové buňky.....	27
3 BUNĚČNÁ SMRT	28
3.1 NEKRÓZA	28
3.2 APOPTÓZA.....	28
4 NEGATIVNÍ ÚČINKY POLYFENOLŮ	31
5 BUNĚČNÉ KULTURY	33
5.1 BUNĚČNÁ KULTURA JAKO ZDROJ BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU	33
5.2 ZDROJE BUNĚK PRO KULTIVACI.....	33
5.3 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	35
5.4 KULTIVAČNÍ PODMÍNKY	35
5.4.1 Vybavení potřebné pro kultivaci buněk <i>in vitro</i>	35
5.5 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	36
5.6 SÉRUM.....	37
5.6.1 Bezsérová média	37
5.7 ANORGANICKÉ SOLI A PUFRUJÍCÍ SLOŽKY	38
5.8 ZDROJE ENERGIE	38
5.9 DALŠÍ SLOŽKY MÉDIÍ.....	39
5.10 ANTIBIOTIKA.....	39
5.11 RŮST BUNĚČNÉ KULTURY.....	39
5.11.1 Subkultura	40

5.11.2	Stárnutí kultury.....	41
5.12	ZMRAZOVÁNÍ KULTIVOVANÝCH BUNĚK	41
5.12.1	Přeprava buněk.....	42
5.13	DEZINFEKCE A STERILIZACE.....	42
5.14	KONTAMINACE BUNĚČNÉ KULTURY	42
II	PRAKTICKÁ ČÁST	44
6	METODIKA	45
6.1	MATERIÁL.....	45
6.1.1	Příprava extraktů	45
6.2	KULTIVACE BUŇEK	45
6.3	ANTIPROLIFERAČNÍ TEST.....	46
6.4	METODIKA CYTOMETRIE	47
7	VÝSLEDKY	48
7.1	VLIV EXTRAKTŮ ZE SLUPEK MUŠKÁTU MORAVSKÉHO	48
7.1	VLIV EXTRAKTŮ Z BOBULÍ MUŠKÁTU MORAVSKÉHO	51
7.2	VLIV EXTRAKTŮ Z BOBULÍ BURGUNDY MODRÉ.....	55
7.3	VLIV EXTRAKTŮ ZE SLUPEK BURGUNDY MODRÉ.....	58
7.4	VLIV EXTRAKTŮ Z BOBULÍ POZDŇÍHO SBĚRU BURGUNDY MODRÉ.....	62
7.5	VLIV EXTRAKTŮ ZE SLUPEK FRANKOVKY	65
7.6	VLIV EXTRAKTŮ Z BOBULÍ POZDŇÍHO SBĚRU FRANKOVKY	69
7.7	DISKUZE.....	73
8	ZÁVĚR.....	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	87
	SEZNAM OBRÁZKŮ	89
	SEZNAM TABULEK.....	90
	SEZNAM GRAFŮ	92
	SEZNAM PŘÍLOH.....	94

ÚVOD

Polyfenoly jsou velmi bohatou skupinou rostlinných fenolických látek, které se řadí mezi sekundární metabolity produkované rozmanitými druhy rostlin. Nepodílejí se přímo na primárních metabolických procesech, jako jsou fotosyntéza nebo respirace, ale přesto hrají v životě rostlin četné důležité role. Pomáhají rostlinám reagovat na změny podmínek životního prostředí či na ataky patogenů.

Studium působení těchto přírodních produktů nabízí i mnohá praktická využití. Díky pozorování přirozených obranných mechanismů rostlin proti infekci či predátorům a následnému použití polyfenolů v praxi, by se dalo zredukovat užívání drahých a potenciálně toxických pesticidů. Poznatky z oblasti genového inženýrství se dají využít ve farmacii, parfumerii a při výrobě materiálů pro komerční využití.

Polyfenoly mají význam i pro člověka např. při prevenci rakoviny, což je choroba, která se stále více stává důvodem úmrtí mnoha lidí. Tyto látky byly prokázány v mnoha běžných potravinách a nápojích, mezi které patří i víno. Tato diplomová práce popisuje základní rozdělení polyfenolů, jejich antioxidační a antikarcinogenní účinky. Praktická část práce je zaměřena na stanovení účinnosti polyfenolických sloučenin extrahovaných z různých odrud révy vinné na buněčné linie.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA POLYFENOLŮ

Polyfenoly jsou skupinou chemických látek obsažených v rostlinách. Charakterizuje je přítomnost více než jedné fenolové jednotky. Polyfenoly lze rozdělit do několika tříd podle počtu fenolu, které obsahují, a konstrukčních prvků, které váží tyto fenoly navzájem [STEVENSON A HURST, 2007]. Hlavními skupinami polyfenolů jsou flavonoidy, fenolové kyseliny, stilbeny a lignany [D'ARCHIVIO *et al.*, 2007].

Největší skupinou polyfenolů jsou flavonoidy, které zahrnují několik tisíc sloučenin, včetně flavonolů, flavonů, katechinů, flavanonů, anthokyaninů a izoflavonů [LOTITO a FREI, 2006].

Rostlinné fenoly jsou obecně charakterizovány jako aromatické sekundární metabolity, které mají (nebo původně měly) jeden nebo více hydroxylů vázaných přímo na aromatickou (fenylovou) část molekuly, tudíž hydroxylů s charakteristickými kyselými vlastnostmi. Tato jejich vlastnost byla a dosud je využívána pro jejich detekci, izolaci i chemickou transformaci. Je také zdrojem chemické reaktivity a často i biologických aktivit rostlinných fenolů. Polyhydroxylované fenoly (nyní už běžně nazývané polyfenoly), jsou navíc zdrojem četných oxidoredukčních reakcí a základem pro tvorbu oligomerů, polymerů či derivátů s jinými molekulami. [HOIKKALA *et al.*, 2004].

V poslední době je těmto látkám věnována značná pozornost ze strany odborníků na výživu a zdraví člověka. Vykazují antioxidační vlastnosti, mají antibakteriální účinky a mohou ovlivňovat autoimunitní systém živočišných organismů [DOSTÁL a KAPLAN, 2003]. Výzkum rostlinných fenolů stojí v popředí zájmu řady vědních oborů jako je medicína, farmakologie, molekulární biologie, biochemie, mikrobiologie a fyziologie [LACHMAN *et al.*, 2000].

1.1 Jednoduché fenoly

Jednoduché fenoly ve struktuře obsahují cyklické C₆ řetězce [SUJAK *et al.*, 2006] a základní skelet molekuly bývá často substituován methylovými skupinami. Tato skupina polyfenolických látek není v rostlinné říši příliš zastoupená a řadíme do ní například hydrochinon. Jeho molekula obsahuje dvě hydroxylové skupiny vázané na benzenové jádro v pozici

para (na protilehlých koncích). Nejčastěji se vyskytují mono- a di-fenoly, menší část obsahových látek tvoří trifenoly. Tyto látky se často vyskytují ve formě glykosidů, nebo methyletherů [PARR a BOLWEL, 2000].

Alkylfenoly jsou charakteristické pro lišejníky, fenolické monoterpeny (nejběžnější je thymol) pro čeleď Lamiaceae (Hluchavkovité) [HERTOG, 1998].

1.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny jsou deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové. Mezi hlavní hydroxybenzoové kyseliny patří gallová kyselina a její dimer (hexahydroxy difenová); je základem hydrolyzovatelných tříslovin. Mezi hydroxyskořicové kyseliny patří kyseliny p-kumarová, kávová, ferulová a sinapová. Kyselina kávová, ferulová a galová se nejčastěji nacházejí v rostlinách ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Nejrozšířenější je kyselina kávová, její ester kyselina chlorogenová se vyskytuje ve vysokém množství v kávě (50–150 mg v šálku kávy). Dále se nachází mimo jiné v bramborách a v mnoha dalších druzích zeleniny a ovoce. Kyselina ferulová je nejčastěji součástí vlákniny, kde je esterovou vazbou vázána na hemicelulosa. Kyselina gallová se vyskytuje rovněž ve formě esterů, např. v gallotaninech je navázána na glukosu [CLIFFORD, 2000].

Tab. 1. Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách [SCHOONHOVEN, 1998].

Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek
C_6	6	jednoduché fenoly, benzochinony
C_6-C_1	7	fenolické kyseliny / aldehydy
C_6-C_2	8	acetofenony, benzofurany
C_6-C_3	9	fenylpropanoidy, benzopyrany (kumariny)
C_6-C_4	10	naftochinony
C_6-C_5	11	ageratochromeny
$(C_6)_2$	12	dibenzofurany, dibenzochinony, bifenyly
$C_6-C_1 -C_6$	13	dibenzopyrany, benzofenony, xantony
$C_6-C_2 -C_6$	14	stilbeny, antrachinony, fenanthreny
$C_6-C_3 -C_6$	15	flavonoidy, izoflavony, chalkony
$C_6-C_4 -C_6$	16	norlignany (difenylbutadieny)
$C_6-C_5 -C_6$	17	norlignany (conioidy)
$(C_6-C_3)_2$	18	lignany, neolignany
$(C_6-C_3 -C_6)_2$	30	biflavonoidy
$(C_6-C_3 -C_6)_n$	n	kondenzované taniny
$(C_6-C_3)_n$	n	ligniny
$(C_6)_n$	n	katecholmelaniny

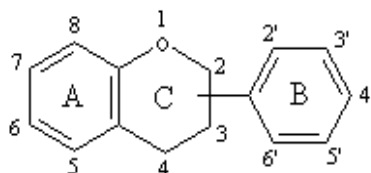
1.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou chemické sloučeniny patřící do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů. V současné době je známo více než 4000 zástupců flavonoidních látek a stále se objevují nové. Základem struktury je flavan (Obr. 1) skládající se ze dvou benzenových jader (A, B) spojených pyranem (C). Hydroxylové a keto- skupiny substituované na tuto základní strukturu odlišují jednotlivé skupiny flavonoidů. Přírodní flavonoidy mají nejčastěji podobu O-glykosidů, jejich molekula je tedy tvořena cukernou částí a částí necukernou (aglykonem). [BROWN *et al.*, 2001].

Na celkovém podílu polyfenolů se flavonoidy podílí asi ze dvou třetin, fenolové kyseliny přibližně jednou třetinou a ostatní polyfenoly (např. lignany a stilbeny) tvoří minoritní podíl [MORAVCOVÁ, 2002; ŠMIDRKAL, 2001].

Flavonoidy hrají důležitou roli v obranném mechanismu rostlin, ochrany proti hmyzu a mechanickému poškození. Jejich obsah je v poškozených částech rostlin vyšší než ve zdravých [ČOPÍKOVÁ, 1999].

Obr. 1. Flavan [BROWN *et al.*, 2001].



Podle stupně oxidace C řetězce se rozeznávají základní struktury flavonoidů: (Obr. 2)

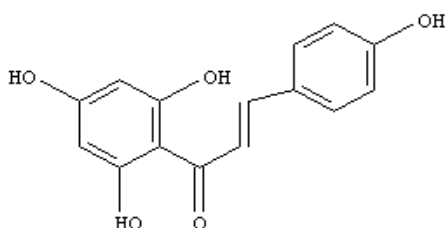
(pozn.: Rozdělení flavonoidů se liší podle autorů, protože stilbeny podle některých patří mezi flavonoidy, podle některých ne.)

- **Chalkony** - jablka, hrušky, rajčata
- **Flavony** se nacházejí v bylinách.
- **Flavonoly** – příkladem flavonolů je kvercetin, přítomný ve vinných hroznech, víně, v cibuli, čokoládě. Dále se s flavonoly můžeme setkat u hluchavky bílé (*Lamium album*) nebo přesličky rolní (*Equisetum arvense*).
- **Flavanony** byly prokázány hlavně v ovoci, jako jsou grapefruity a pomeranče.
- **Anthokyany** jsou součástí četných rostlinných pigmentů přítomných v listech, květech a plodech.

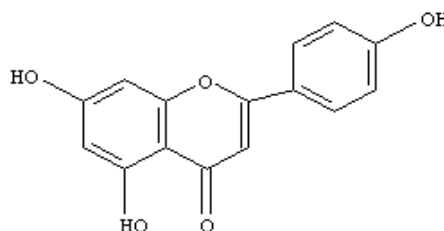
- **Taniny** se nacházejí v čaji, oříškách, vyskytují se i v čokoládě. Mají velmi pozitivní vliv na kardiovaskulární systém.
- **Isoflavonoidy** jsou přítomné hlavně v luštěninách. Příkladem je medicarpin – hlavní fytoalexin, produkovaný vojtěškou setou (*Medicago sativa*) jako reakce na infekci patogenními houbami.
- **Stilbeny**, úzce příbuzné s flavonoidy, byly prokázány v révě (*Vitis vinifera*), borovici (*Pinus sylvestris*) a podzemnici olejné (*Arachis hypogaea*) [ČOPÍKOVÁ, 1999].
- **Flavanoly** – zelený čaj, čokoláda

Obr. 2 Chemické struktury některých skupin flavonoidů [BUER a MUDAY, 2004].

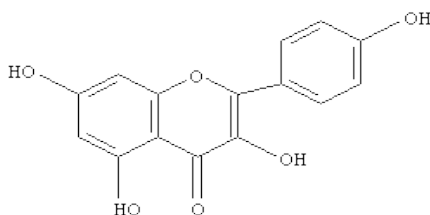
a) chalkony



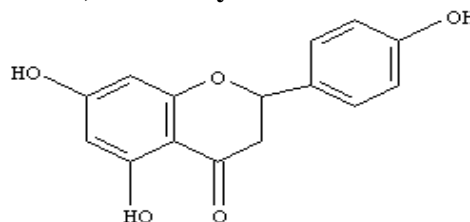
b) flavony



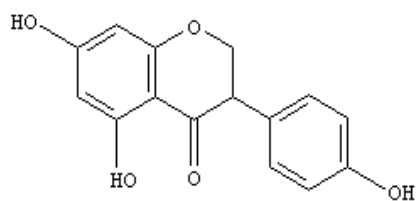
c) flavonoly



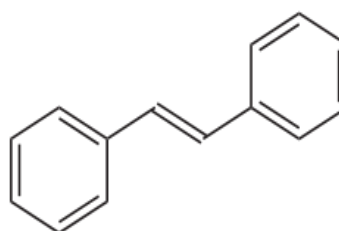
d) flavonony

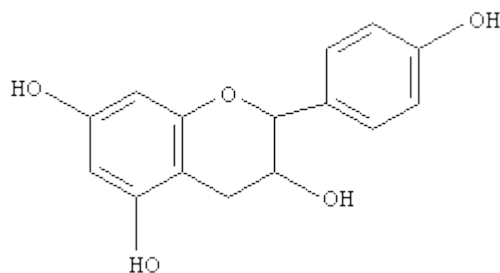


e) isoflavonoidy



f) stilbeny



f) anthokyany**1.3.1 Chalkony**

Chalkon je triviální název 1,3-difenyprop-2-en-1-onu. Některé deriváty chalkonu lze nalézt v přírodě, kde hrají roli prekurzorů všech flavonoidů v metabolismu rostlin. V podstatě jde o otevřené deriváty flavonů. Při biologickém testování přírodních i syntetických chalkonů bylo u různých derivátů zjištěno široké spektrum účinků. Lze uvést např. působení antibakteriální, antivirové, insekticidní, cytotoxické a antitumorózní, chemoprotektivní, protizánětlivé, estrogenní a další. [DIMMOCK *et al.*, 1999 a OPLETALOVÁ *et al.*, 2001].

1.3.2 Flavony

Flavony jsou žlutá rostlinná barviva ze skupiny flavonoidů vyskytující se volně (jako glykosidy), nebo jako estery [CERMAK a WOLFFRAM, 2006]. V kombinaci s anthokyany vytvářejí barevné odstíny okvětních lístků rostlin ve spektru od žluté po červenou. Zástupci jsou např. luteolin přítomný v přesličce, nebo apigenin v celeru či kadeřavé petrželi [LUŠTINEC a TÁRSKÝ, 2003].

1.3.3 Flavonoly

Flavonoly jsou přítomné přibližně v 80 % vyšších rostlin. V případě, že je jejich biosyntéza stimulována světlem, nacházejí se ve venkovních obalových pletivech. Zbarvení flavonolů (včetně glykosidů) se pohybuje od slonovinové až po žlutou. Nejznámějším zástupcem je kvercetin [HARBONE, 1994]. V ovoci se tento flavonoid vyskytuje vázaný na různé sacharidy a často vytváří paletu pěti až deseti různých glykosidů. Kvercetin působí také jako inhibitor oxidace LDL (low density lipoprotein) *in vitro*, při imunologických odpovědích různého typu a spolu s ostatními flavonoidy je účinný proti širokému spektru civilizačních onemocnění [MIDDLETON *et al.*, 2000].

1.3.4 Anthokyany

Anthokyany jsou ve vodě rozpustné pigmenty ve vakuolách některých buněk. Patří ke flavonoidům, které se v rostlinách vyskytují ve formě glykosidů, jejich aglykonová (necukerná) část se označuje jako anthokyanidin. Barva se mění v závislosti na pH. Kyselé roztoky antokyanů bývají červené, neutrální fialové a zásadité modré. Anthokyany mají značné rozšíření v přírodě. Zbarvují např. modře květy pomněnek, červeně květy máků či růží, dále jsou obsaženy v mnohých plodech (ptačí zob, černý rybíz aj.), v listech (červené zelí) apod. [KOSIERADZKA *et al.*, 2004].

Antokyany jsou přítomny buď jako neacylované glykosidy, nebo glykosidy acylované převážně p-kumarovou kyselinou. Byl nalezen vzájemný pozitivní vztah mezi antioxidační aktivitou a obsahem celkových polyfenolů a antokyanů se závěrem, že především tyto látky hrají podstatnou roli v antioxidační kapacitě rostlin. [EICHHORN *et al.*, 2005].

1.3.5 Taniny

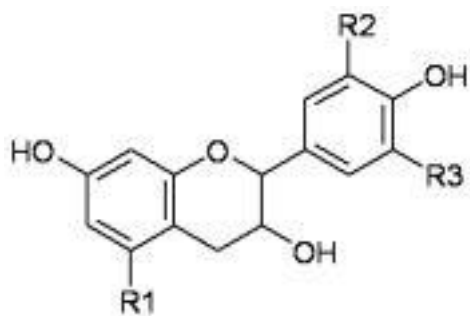
Taniny neboli třísloviny jsou rostlinné polyfenoly trpké, svíravé či hořké chuti, které sráží proteiny. Z chemického hlediska jsou to velké polyfenolické sloučeniny, které obsahují hydroxylové a karboxylové skupiny vázající se na proteiny a jiné makromolekuly. [SMITH, 1992]. Taniny dělíme na hydrolyzované a kondenzované. Hydrolyzovatelné taniny se skládají z cukru, na který je navázáno esterifikací několik monomerních skupin kyseliny gallové. Mohou být esterifikované jenom některé skupiny, nebo všechny, jako v případě taninů v duběnkách. Taniny hydrolyzují působením slabých kyselin, slabých bází nebo tepla. Kondenzované taniny jsou polymery flavonových jednotek.

Využití:

- Činění kůží
- Přípravky k léčbě průjmů, hemoroidů, látky zastavující krvácení
- Analytická chemie (detekce železa) a výroba duběnkového inkoustu
- Antiparazitární účinek (působí proti střevním hlísticím)

Třísloviny se nacházejí například v čaji (katechiny a flavonoidy), vínu – především v červeném, dále v ovoci (granátové jablko, brusinka, borůvka, jahoda, trnka) nebo také v duběnkách či kůře a listech stromů [SMITH, 1992].

Obr. 3 Tanin [KADAM et al., 1990].



1.3.6 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy patří mezi rostlinné fytoalexiny, což jsou sekundární metabolity rostlin, které se začínou tvořit samovolně, nebo ve zvýšené míře jako odpověď na stres (mechanické poškození, UV záření, ozon) nebo po napadení rostliny nepatogenními nebo avirulentními bakteriemi, viry či houbami. Některé fytoalexiny mají antibakteriální nebo antifungální činnost, jiné jsou pro danou infekci nečinné, nejsou tedy ekvivalentní protilátkám, které vyšší organismy tvoří po infekci [BARLASS *et al.*, 1987].

Jejich typickými producenty jsou rostliny z čeledi bobovitých, ale byly nalezeny i v mnoha dalších, dvouděložných i jednoděložných rostlinách [HARBONE, 2000]. V rostlině se isoflavonoidy vyskytují ve formě volných aglykonů, méně často ve formě glykosidů jako konjugáty s glukosou, rhamnosou či apiosou. 7-O-glykosidy jsou nejběžnější zásobní formou isoflavonoidů [REYNAUD *et al.*, 2005]. V tělních tekutinách jsou pak přítomny isoflavonoidy jako volné aglykony nebo jejich mono- a disulfáty, mono- a diglukosiduronáty nebo sulfoglukosiduronáty [DAKORA a PHILLIPS, 1996].

Poprvé vyvolaly isoflavonoidy zájem vědců ve 40. letech, kdy se ukázaly být zodpovědné za poruchy porodnosti ovcí při spásání velkého množství jetele a jejich estrogení aktivita se stala předmětem dalšího zkoumání [BENNETS *et al.*, 1996]. Prokázalo se, že účinek těchto látek nespočívá pouze v interakci s estrogeními receptory, ale také v inhibici některých důležitých enzymů, především tyrosin proteinkináz a topoisomeráz, zapojených v procesech buněčného růstu a proliferace [ADLERCREUTZ, 1997]. Publikované epidemiologické studie dokazují, že tyto jejich schopnosti se projevují snížením rizika osteoporózy, kardiovaskulárních chorob a některých nádorových onemocnění [YAMAMOTO *et al.*, 2003]. V posledních letech je prováděn intenzivní výzkum, týkající se zvláště karcin-

nomu prsu a prostaty. Početné studie na zvířatech i na tkáňových kulturách ukazují, že isoflavonoidy inhibují růst určitých nádorových linií a indukují jejich apoptózu. Nejvýznamější aktivita byla pozorována u genisteinu [MIZUNUMA *et al.*, 2002, RICE *et al.*, 2002], který se nachází v řadě rostlin (fazole, sojové boby). Na lidské buňky působí podobnými účinky jako hormon estrogen [COWARD *et al.*, 1993].

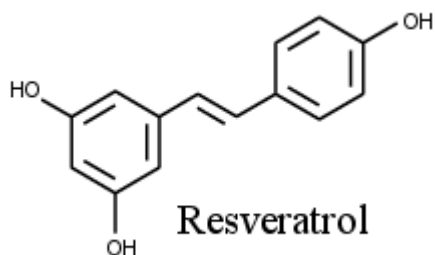
1.3.7 Stilbeny

Stilbeny, jsou produkovány fenyylpropanoid-acetátovou cestou. Nejznámějším stilbenem je resveratrol. Vyskytuje se cis nebo trans izomer, z nichž pouze trans má estrogení účinky. [CORNWELL *et al.*, 2004].

1.3.7.1 Resveratrol

Resveratrol je svou strukturou 3,4,5-trihydroxystilben. Komplexnější poznatky o resveratrolu byly získány v osmdesátých letech minulého století, kdy přístrojové vybavení (zejména HPLC) umožnilo sledování jeho výskytu a koncentrace ve vinné révě (*Vitis vinifera L. (Vitaceae)*) [CANGCAKE *et al.*, 1996]. Následně byly zkoumány biologické vlastnosti resveratrolu a v řadě studií bylo prokázáno, že resveratrol jakožto polyfenol přírodního původu je biologicky aktivní, má výrazné antioxidační vlastnosti a pohlcuje volné radikály, řadí se mezi fytoalexiny. Obecně platí, že rostlinné polyfenoly jako sloučeniny s antioxidačními vlastnostmi inhibují zhoubné nádorové bujení [JEANDET *et al.*, 1995].

Fyziologická funkce resveratrolu v rostlinách není stále zcela jasná. Tvorba fytoalexinů (trans-resveratrolu a ϵ -viniferinu) je jedním z mechanismů rezistence buňky. Při napadení hroznu révy vinné plísní lze pozorovat, jak rostlina vytváří resveratrolovou bariéru okolo napadeného místa [SOLEAS *et al.*, 1997]. Předpokládá se, že zdrojem trans-resveratrolu ve víně (jako nápoji) jsou polyfenolické sloučeniny (konstitutivní stilbeny, tedy viniferiny) extrahované ze slupek bobulí, zbytků třepin a stonků, ze kterých vzniká trans-resveratrol během dalších procesů [JEANDET *et al.*, 1995].

Obr. 4. Resveratrol [ALÉN-RUIZ *et al.*, 2009].

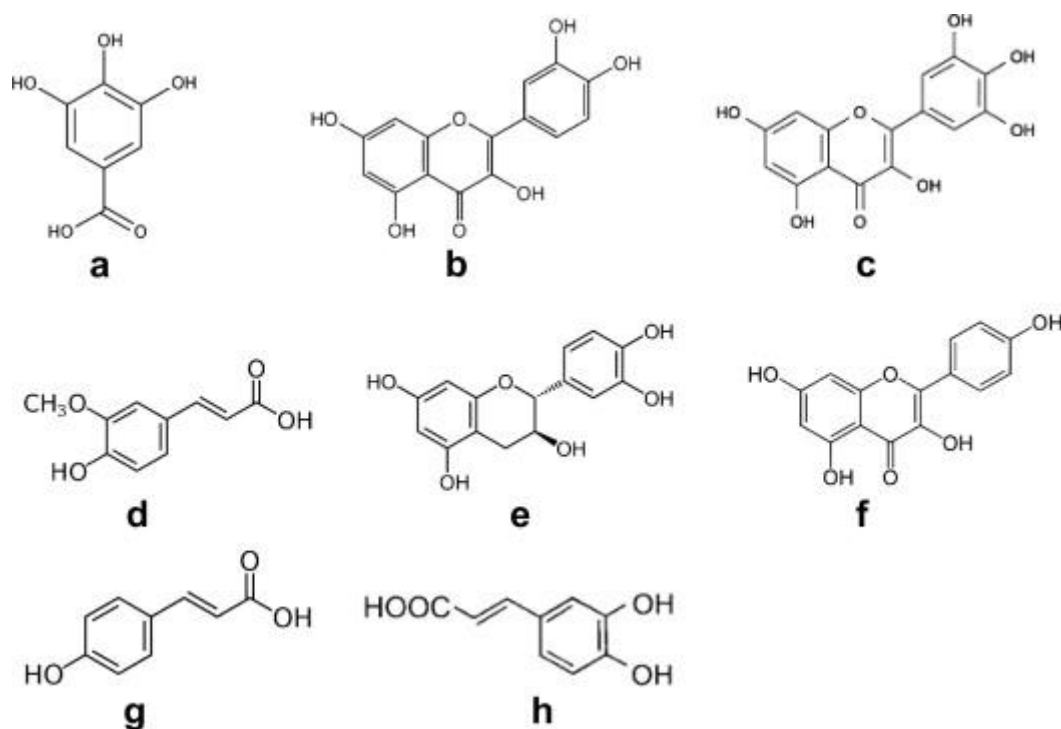
1.4 Polyfenoly ve víně

Fenolické látky mají velký význam ve vinařství a vinohradnictví a zralost fenolů je velmi zásadní pro kvalitní výrobu červených vín. Nalezneme je v třápině, v dužině, ve slupce bobulí a v semenech. Tyto látky jsou ve víně zodpovědné za barvu, antioxidační vlastnosti a za tříslovitý chuťový projev. U modrých odrůd se pohybuje kolem 30-40 % všech fenolických látek ve slupce a 60-70 % fenolických látek v semenech a obsah je 3 až 10krát větší než u bílého vína. Jsou zde zahrnovány třísloviny a barviva [KRAUS *et al.*, 2008].

Tak jako u ostatních rostlin jsou i polyfenoly vína produkovány při běžném růstu a v odezvě na stresové podmínky (infekce, poranění, UV záření, zvýšená salinita půdy a přítomnost některých kovů v prostředí). Polyfenoly jsou v rostlinách na úrovni pletiv, celulárních a subcelulárních jednotek nerovnoměrně rozmístěny. Zatím co nerozpustné polyfenoly (převážně ligniny) jsou součástí buněčných stěn a tvoří mechanickou oporu rostlinné hmoty, rozpustné fenolové látky jsou začleněny ve vakuolách a speciálních plastidech [BECKMAN, 2000; HARBONE, 1994].

Fenolické látky z červených vín se tvoří metabolismem kvasinek během fermentace vlákniny, slupky, a semen hroznů [MACHEIX, 1990]. Nedávná studie odhalila, že obsah fenolů a jejich antioxidační aktivita u červených vín může být výrazně ovlivněna odrůdou hroznů, faktory životního prostředí, zralostí hroznů, lisovacím režimem, rozsahem a teplotou macerace, teplotou kvašení, používáním enzymů a druhem dubového dřeva zrcího sudu [ALÉN-RUIZ *et al.*, 2009; GARCÍA-FALCON *et al.*, 2007].

Obr. 5. Fenolické látky červeného vína (a) Kyselina gallová, (b) kvercetin, (c) myricetin, (d) kyselina ferulová (e) katechin, (f) kaempferolu, (g) kyselina kumarová a (h) kyselina kávová. [GARCÍA-FALCON *et al.*, 2007].



Resveratrol a další majoritní komponenty, jako jsou myricetin (hexa-hydroxyflavon) a kvercetin (penta-hydroxyflavon) [WATERHOUSE, 2002], obvykle představují 20-50% flavonolů z celkového obsahu. Polyfenoly z hroznů vinné révy a vína jsou součástí komplexních směsí látek, které mohou reagovat s radikály různými mechanismy a často na ně mají inhibiční účinek. [RICE-EVANS 1996].

Taniny se do vína dostávají hlavně při kvašení rmutů, při nešetrném zpracování hlavně nezralých hroznů se zbytky třapin nebo z dubových sudů, ve kterých se víno skladuje. Třísloviny ve víně se nazývají oenotannin a jejich základem jsou různé vazby kyseliny digallové na glukósu [KUTTELVAŠER, 2003].

Patří sem i flobafeny způsobující hnědnutí výlisků i moštů vyrobených z nahnilých hroznů nebo lisovaných na kontinuálních lisech, ve kterých přichází lisovaný mošt do styku s rozdrcenými výlisky. V těchto případech může dojít k poškození jakosti vína. Barevné látky v bobulích hroznů odpovídají i barevným látkám ve víně. Významnou skupinou jsou antokyany, jejichž obsah v bobulích révy vinné se zvětšuje od fáze zaměkání k fázi zralosti.

Způsobují charakteristické zbarvení červených vín. Zelená a žlutá barviva, jako je chlorofyl, flavonové látky, karoteny, xantofyly a kvercetin, ovlivňují barvy bílých vín. Mezi červená barviva patří skupina antokyanů např. oenin, oenin nebo bezbarvý leukoanthokyan. [STEIDL, 2002].

Tab. 2. Obsah fenolických látek ve víně [KUTTELVAŠER, 2003].

Fenolické látky	Červená vína (mg.l⁻¹)	Bílá vína (mg.l⁻¹)
Kemferol, kvercetin	15	stopy
Deriváty k. benzoové	50 – 100	1 – 5
Deriváty k. skořicové	50 – 100	1 – 5
Malvidin, kyanidin	20 – 500	0
Taniny	1500 – 5000	0 – 100
Katechiny	50 – 100	0
Prokyanidiny	stopy	0

2 POLYFENOLY JAKO ANTIOXIDANTY

V organismu probíhá ve všech živých buňkách řada metabolických pochodů. Jedná se o enzymatické i neenzymatické chemické reakce, jejichž produkty jsou nezbytně nutné pro udržení homeostázy a tím i vlastní existence organismu. Při těchto dějích vznikají i látky se silnými oxidačními účinky, které mohou poškozovat buněčné struktury. Jejich vysokou reaktivnost způsobuje přítomnost nepárového elektronu. Takové molekuly vstupují do radikálových reakcí, které mají tři fáze. V iniciační fázi dochází ke vzniku radikálu nejčastěji homolytickým rozštěpením nepolární či slabě polární vazby. Látky podporující tyto reakce se označují jako prooxidanty. Mohou tak působit některé v organismu běžně přítomné látky. Autooxidačně působí ionty Fe^{3+} , Cu^{2+} nebo radikály $\text{OH}\cdot$, Fe^{2+} a Cu^+ ionty iniciují oxidaci prostřednictvím komplexu s molekulou kyslíku. Následuje fáze propagační, ve které reagují radikály s jinými sloučeninami za vzniku dalších radikálů. Například peroxylový radikál ($\text{R-OO}\cdot$) je schopen odštěpit vodíkový atom z nenasyceného uhlovodíku za vzniku hydroperoxidu ($\text{R-C-OOH}\cdot$) a nového radikálu C. Navíc ionty Fe^{3+} (Cu^{2+}) rozkládají hydroperoxydy za tvorby $\text{R-OO}\cdot$ a Fe^{2+} (Cu^+). Poslední fází jsou terminační reakce, které ukončují řetězovou radikálovou reakci [AUST *et al* 1993; STOHS *et al.*, 1995].

Mezi nejčastější a nejreaktivnější radikály vyskytující se v organismu patří volné kyslíkové radikály (VKR). Vykazují silné oxidační účinky a mohou interagovat s bílkovinami, lipidy, nukleovými kyselinami a dalšími molekulami. Tyto interakce vedou k modifikaci funkce poškozených molekul a VKR se tak podílejí na vzniku některých onemocnění [HOLMES-MCNARY, 2000].

Organismus disponuje na druhé straně i látkami a reakcemi, které mohou volné radikály neutralizovat, vychytávat je, zabraňovat jejich vzniku nebo působit proti jejich účinku. Základními prvky antioxidační bariéry organismu jsou: redukovaná forma glutathionu, glutathionperoxidáza (GPX), reduktáza a katalázy. [GHAFOOR *et al.*, 2009].

Kromě výše uvedených antioxidačních mechanismů organismu, se na inaktivaci radikálů podílejí i antioxidační látky přijaté potravou. Za fyziologických podmínek jsou pro- a anti-oxidanty přibližně v rovnováze. Tato rovnováha však může být posunuta na stranu prooxidantů, a potom dochází ke zvýšené produkci VKR. Uvedený stav je označován jako oxidační (aerobní) stres. Je-li příliš intenzivní nebo trvá-li příliš dlouho, může vést k vážnému poškození buněk. Zabránit tomuto stavu lze pouze zvýšením antioxidační kapacity orga-

nismu. Z tohoto důvodu jsou velmi důležité antioxidačně působící látky obsažené ve stravě [ZENDULKA *et al.*, 2006].

Antioxidanty musí ve své struktuře obsahovat elektrofilní část schopnou akceptovat nepárový elektron radikálu. Takovou částí jsou u polyfenolů fenolické skupiny, které se v přítomnosti radikálů oxidují na ketoskupiny. Množství fenolických skupin proto hraje významnou roli v množství radikálů, které je schopný příslušný polyfenol likvidovat. Polymerizované fenoly mají teoreticky silnější antioxidační účinky než jednoduché polyfenoly, ale je nutné si uvědomit, že tyto látky se do systémové cirkulace dostávají až po metabolizaci střevní mikroflórou, čímž je jejich účinek silně ovlivněn. Antioxidační aktivita závisí ale i na jiných strukturních vlastnostech než jen na počtu fenolických skupin, a proto jsou některé dihydroxystilbeny účinnější než stilbeny se třemi fenolickými skupinami [CAI *et al.*, 2003].

Polyfenoly jsou považovány za antioxidanty také proto, že mohou zmírnit, nebo zabránit tvorbě reaktivních forem kyslíku a dusíku, které hrají důležitou roli v karcinogenezi. Některé fenolové fytochemikálie, včetně kyseliny gallové a kvercetinu, vykazují silnější antioxidační aktivitou než vitamin C [KIM *et al.*, 2002].

2.1 Antikarcinogenní účinky

Rozvoj nádorového onemocnění je dlouhodobý proces, který zahrnuje tři hlavní stádia a to: iniciaci, promoci a progresi. Mnoho chemoprotektivních látek je schopných zasahovat do iniciační fáze díky inhibici tvorby karcinogenu. Dále působí opresivně a zastavují promoci a progresi procesu karcinogeneze ovlivněním či narušením klíčových faktorů, které kontrolují buněčnou proliferaci, diferenciaci, stárnutí či apoptózu. Mnoho polyfenolických látek běžně zastoupených v naší stravě, jako je např. resveratrol obsažený v hroznech révy vinné, genistein obsažený v sóji, epigallokatechin nalezený v čaji apod. mohou působit právě jako blokující či opresivní látky, a některé vykazují oba mechanismy účinku. [AHMAD a MUKHTAR, 1999].

Nedávné studie naznačují, že chemopreventivní účinky polyfenolů jsou odvozeny nejen z přímého působení na radikály, ale také zprostředkováním enzymové aktivity zapojené v karcinogenezi. Některé polyfenoly mohou snížit aktivitu pro-oxidačních enzymů a vykonávat tak antioxidační účinky. Jiné studie prokázaly, že resveratrol snižuje činnost NADPH oxidázy k ochraně endoteliální buňky [CHOW *et al.*, 2007].

Navíc, jiné polyfenoly mohou zvýšit činnost antioxidantních enzymů. Přírodní fenol mangiferin, obsažený v mangu zvýšil aktivitu enzymů působících proti benzo[a]pyrenu, který vyvolal rakovinu. Zachoval také aktivitu enzymatické katalázy, glutathion peroxidázy a glutathion reductázy [RAJENDRAN *et al.*, 2008].

2.2 Protizánětlivé účinky

Výzkum fenolických látek v hroznech, a to zejména v hroznových semenech, ukázal významné protizánětlivé účinky jak *in vivo* tak *in vitro*. Velmi účinné jsou molekuly flavonolů, flavonů a anthokyanů (oligomerních flavonoidů) [TERRA *et al.*, 2009].

J. Alexander Bralley *et al.*, [2007] prokázal, že výtažky z hroznových slupek a jader potlačily záněty ucha a různé otoky u myši. Navíc kombinace semen a slupek hroznů se projevila jako účinný lék proti degenerativním onemocněním kloubů. Tyto nálezy ukázaly, že fenolické látky v hroznech mají protizánětlivé účinky

2.3 Ovlivnění buněčného stárnutí

Bylo zjištěno, že polyfenoly obsažené v potravinách mohou být přínosné pro zvrácení průběhu stárnutí neuronů. Vzhledem k jejich výrazné antioxidantní aktivitě, jako je odbourávání volných radikálů, by mohly ochránit orgány a tkáně před oxidačním poškozením a modifikovat negativní působení mechanismů redoxních stavů. Důkazy byly získány pozorováním chování krys, ve věku 19 až 21 měsíců, kterým byla podávána hroznová šťáva o různé koncentraci. Po vypití 10% hroznové šťávy, byl zjištěn lepší orientační výkon v bludišti, zatímco vypití 50% hroznové šťávy vedlo ke zlepšení akceschopnosti [SHUKITT-HALE *et al.*, 2006].

Další výzkum zjistil, že fenolické sloučeniny z hroznových jader podávané po dobu 30 dní, potlačily oxidační poškození DNA v nervové tkáni, snížen byl i výskyt volných radikálů vyvolaný peroxidací lipidů v centrálním nervovém systému [BALU *et al.*, 2005].

2.4 Antibakteriální účinky

U rostlinných polyfenolů byl prokázán antibakteriální potenciál, protiplísňová a protivirová aktivity. Rodriguez-vaquero *et al.*, [2007] prokázal, že hroznové víno inhibuje mikrobiální růst zejména *Escherichia coli*, přičemž inhibiční efekt se zvyšoval spolu s koncentrací polyfenolů u všech testovaných druhů bakterií. Extrakty červeného a bílého vína vystavoval mikrobiální aktivitě některých patogenů, jako je *Staphylococcus aureus*, *Escherichia*

coli a *Candida albicans*. Výsledky naznačují, že polyfenolické sloučeniny obsažené v červených vínech byly zodpovědné potlačení proliferace patogenů [PAPADOPOULOU *et al.*, 2005].

Fenolické látky z různých částí hroznů mají různé antimikrobiální účinky. Antimikrobiální aktivita fermentovaných výlisků byla výrazně lepší než extrakty z celých hroznů [THTMOTHE *et al.*, 2007]. Použití fenolických sloučenin by mohlo sloužit pro lepší uchování jídla. Silný účinek fenolů jako dokonalých přírodních antimikrobiálních a konzervačních prostředků na jídlo, je velmi slibný. V Turecku se jako součást zálivky na salát používá koruk, což je šťáva z nezralých hroznů, která inhibuje růst *Salmonella typhimurium* [KARAPINAR *et al.*, 2007].

2.5 Ochrana před srdečními chorobami

Resveratrol jako hlavní zástupce polyfenolů ve víně je schopen tvořit cheláty s mědí, která jinak stimuluje peroxidaci lipidů. Tímto způsobem resveratrol snižuje oxidaci polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Flavonoidy pomáhají snižovat aktivitu krevních destiček, což umožňuje volnější průtok krve a redukuje se tak riziko jejich slepování v krevním řečišti. [FREMONT, 2000]. Kromě toho bylo zjištěno na základě *in vitro* testů, že resveratrol inhibuje produkci peroxidu vodíku a aktivitu myeloperoxidázy. Také inhibuje v buňkách maligních nádorů O-acetyltransferázu a sulfotransferázu [KUNDU *et al.*, 2004].

Isoflavony mohou ovlivňovat stabilitu LDL lipoproteinů v plasmě [MORAVCOVÁ *et al.*, 2002]. Genistein i daidzein jsou silnými antioxidanty *in vitro* proti LDL oxidaci a chrání endoteliální buňky proti cytotoxickému účinku oxidovaného LDL. Tento účinek je způsoben pravděpodobně inhibicí tyrosin kinázy [KAPIOTIS *et al.*, 1997]. Bylo také prokázáno, že antokyany z vína a hroznů inhibují aktivitu fosfodiesterázy-5, která snižuje riziko kardiovaskulárních chorob [DELL AGLI *et al.*, 2005].

Výzkumy zjistili, že fenolické látky výrazně zlepšují plazmatické hladiny lipidů. Po vypití 100 ml červené hroznové šťávy (denně po dobu 14 dnů) se koncentrace cholesterolu standardizovala a výrazně se zvýšily antioxidační schopnosti plazmy a naopak se snížilo množství oxidovaných LDL. Plazmatické hladiny HDL a apolipoproteinu byly zvýšené. Kromě toho, konzumace červeného vína vedla k vysoké koncentraci HDL cholesterolu, která souvisí s kontrolou rizika koronárních srdečních onemocnění [CASTILLA *et al.*, 2006].

2.5.1 Vliv polyfenolů na tukové buňky

Nedávno provedená studie z Texas Woman's University si dala za cíl zjistit, zda polyfenoly borůvek hrají roli v diferenciaci adipocytů. Bylo prokázáno, že rostlinné polyfenoly brání procesu adipogeneze, tedy tvorbě tukových buněk a indukují lipolýzu. Výsledky podporuje také Shiwani Moghe, která provedla pokus s tukovou tkání myši, a bylo zjištěno, že s rostoucí dávkou polyfenolů došlo k potlačení diferenciaci tukových buněk [SHIWANI, 2011].

3 BUNĚČNÁ SMRT

3.1 Nekróza

Nekrózu je třeba chápat jako patologický proces. Je vyvolána patologickými vlivy na buňku, ať již mechanickými, chemickými či tepelnými. Nekrózu také může vyvolat virová infekce buňky, různé bakteriální toxiny nebo třeba i náhlé vyčerpání buněčných energetických zásob (například vlivem ischemie). Při nekróze dochází k narušení integrity cytoplazmatické membrány, což vede k narušení rovnováhy vnitřního prostředí buňky. To vede k objemovým změnám jak celé buňky, tak některých organel (mitochondrie, endoplazmatické retikulum). Celý proces nakonec vede k enzymatickému poškození buňky (náhodné štěpení jaderné DNA) a jejímu rozpadu. Celé vnitřní prostředí buňky se tak uvolní do okolí, přičemž enzymy takto uvolněné mohou indukovat nekrózu okolních buněk a způsobit reakci, kdy dojde k rozsáhlejšímu poškození tkáně a následnému zánětu. Různé patologické externí vlivy nemusí vyústit pouze v nekrózu, ale při určité konstelaci mohou spustit i apoptotický proces [CONTRANS *et al.*, 1999].

3.2 Apoptóza

Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt je fyziologický děj. Na rozdíl od nekrózy, která postihne víceméně náhodnou buňku, která byla vystavena nepříznivým vlivům, je apoptóza indukována naprosto cíleně a buňka je usmrcena a následně odstraněna takovým způsobem, že nedojde k poškození okolních buněk. Je to tedy organizovaný a přísně regulovaný děj v buněčné komunitě. Počty buněk v komunitě jsou přísně regulovány řízením rychlosti dělení buněk, ale i mírou buněčné smrti. Pokud buňky již nejsou potřebné, dochází k aktivaci vnitrobuněčného programu vedoucího k apoptóze, který je usmrtí [ALBERTS, 2002].

Apoptóza může být indukována signálem zvenčí i z buňky samotné. Podnětem zvenčí může být například akce cytotoxického lymfocytu v případě nádorové či virem infikované buňky). Jiným signálem může být naopak absence jakéhokoli signálu. Buňka izolovaná od kontaktu s ostatními buňkami a bez stimulace určitými cytokiny tak může také podlehnout apoptotickému procesu. Buňka sama pak může apoptózu spustit například při neopravitelném poškození jaderné DNA [STEJSKAL, 1992].

Vlastní průběh apoptózy využívá enzymatické regulační kaskády buňky. Uplatňují se zde tzv. kaspázy, které se nacházejí v buňce v neaktivním stavu a jejich aktivace proapoptotickým signálem vede k dějům, kterými se buňka připravuje na svou smrt. Dochází k fragmentaci jaderné DNA, na rozdíl od nekrózy je však fragmentace nenáhodná a fragmenty jsou stejně dlouhé. Toho se využívá při detekci apoptózy a nekrózy pomocí gelové elektroforézy. Dále se buňka také trochu smrští a změní se i charakter různých organel. Významnou úlohu v apoptóze hrají mitochondrie. Celý proces končí rozpadem buňky do apoptotických tělísek, což jsou membránou ohraničené buněčné fragmenty, které jsou následně fagocytovány bílými krvinkami (makrofágy). Nitrobuněčné enzymy tedy nepoškodí okolní buňky. Apoptóza se nejvíce uplatňuje v prenatálním vývoji jedince, kdy celé skupiny buněk hynou apoptózou během vývoje tkání a orgánových soustav [CONTRANS *et al.*, 1999]. Výskyt apoptózy ve vyvinutých tkáních dospělého zvířete může být velmi rozsáhlý. Při vývoji obratlovců každou hodinu umírá až polovina buněk nervového systému nebo buněk kostní dřeně. Buněčnou smrtí buňka pomáhá regulovat jejich množství. Ve všech těchto případech, buňky umírají apoptózou. U dospělých tkání, buněčná smrt přesně vyrovná buněčné dělení. Kdyby tomu tak nebylo tak by tkáň nemohla růst nebo se zmenšovat [FRESHNEY, 2002]. Apoptóza je tedy na rozdíl od nekrózy programovaná buněčná smrt vyvolaná na základě aktivace specifických signálních drah. V buňce existují proapoptické i antiapoptické signální dráhy. Posunutí rovnováhy směrem k proapoptickým faktorům znamená smrt buňky. Z morfologického hlediska se apoptóza projevuje agregací nukleárního chromatinu, fragmentací buněčné membrány, zmenšováním buňky a vznikem apoptotických tělísek, která jsou zpracována okolními buňkami a makrofágy, bez vyvolání zánětu v daném místě [PULIDO *et al.*, 2003].

V závislosti na typu buňky a vyvolávajícím faktoru je aktivována jedna ze tří možných signálních drah (receptorová, nereceptorová, mitochondriální). Vyvolávající faktor může být dvojího typu. Extracelulární faktory se váží na membránové receptory složené z extracelulární, na cystein bohaté části, a intracelulární domény, která po navázání extracelulárního ligandu aktivuje proteiny. Tyto proteiny aktivují kaspázy (aspartát specifické proteázy) a různé signální dráhy. Kaspázy se dělí na dvě podskupiny a to na iniciační kaspázy, které zesilují signál z receptoru, a na efektorové kaspázy degradující řadu buněčných komponent [QUINEY *et al.*, 2004]

Spouštěcím prvkem intracelulárního způsobu aktivace apoptózy je porucha buněčné homeostázy, při které hrají významnou roli mitochondrie. Jestliže dojde k poruše mitochon-

driální membrány a uvolnění cytochromu do cytoplazmy, vznikají komplexy zvané cytochrom c. Další kaskádu intracelulárních reakcí tvoří aktivace kaspáz a další reakce společné i pro druhou apoptickou cestu. Permeabilita mitochondriální membrány je řízena protoonkogeny, kdy jedny mají antiapoptický účinek, další proapoptický [SUHR *et al.*, 2001]

Polyfenol resveratrol v nádorových buňkách indukuje apoptózu. Resveratrol má schopnost uvonit ligand, který se pak na povrchu nádorové buňky spojí s receptorem pro apoptózu. Účinek resveratrolu je nádorově selektivní. U zdravých buňek apoptózu nevyvolává [LARROSA *et al.*, 2004].

Quiney *et al.*, [2004] uvádí, že resveratrol, jeho dimer ϵ -viniferin a syntetický flavon diaminomethoxyflavon, indukují apoptózu leukemických B lymfocytů. Mechanismus účinku spočívá zřejmě v inhibici NO syntázy, což se projeví snížením hladin oxidu dusnatého, který může inaktivovat kaspázy S-nitrosylací jejich cysteinového fragmentu.

4 NEGATIVNÍ ÚČINKY POLYFENOLŮ

Navzdory zřejmým zdraví prospěšným účinkům polyfenolů existují studie, které přinášejí výsledky o jejich negativních vlastnostech. Např. v Chile byla analyzována domácí i komerčně vyráběná červená i bílá vína. Výsledky byly překvapivé, neboť u některých byly v Amesově testu (test, sloužící ke stanovení karcinogenního a mutagenního potenciálu chemických sloučenin) prokázány mutagenní účinky. Nicméně tento test hodnotí pouze mutagenitu směsi nikoli jednotlivých sloučenin. Vědci poukazovali, že za mutagenní účinky může být zodpovědný kvercetin, který je obsažen ve slupkách hroznů červeného vína. Je zajímavé, že výskyt rakoviny žaludku je nejvyšší v části Chile s největšími vinohrady. [BULL *et al.*, 1987]. Podobné výsledky na bakteriálním kmenu *Salmonella typhimurium* našel i tým vědců ze Španělska [ARIZA *et al.*, 1992], přičemž červená vína vykazovala vyšší mutagenitu než vína bílá.

Další studie přinášejí důkazy o mutagenních a karcinogenních účincích kvercetinu, které jsou doložené krátkodobými testy mutagenity a testy na zvířatech. Za mutagenní vlastnosti je pravděpodobně zodpovědná chemická struktura s volnou hydroxylovou skupinou v poloze 3, dvojnou vazbou v poloze 2,3 a keto skupinou v poloze 4. Mutagenita a genotoxicita kvercetinu byla sledována v testech *in vitro*. Tyto vlastnosti mohou být zapříčiněny jejich pro-oxidačním působením, tvorbou reaktivních forem kyslíku a poškozením DNA. Výsledky potvrzující mutagenitu flavonoidů jsou získávány v testech *in vitro*, nicméně v *in vivo* testech na zvířatech za použití vysokých dávek čistých látek nebyly pozorovány karcinogenní účinky [RIETJENS *et al.*, 2005].

Je zřejmé, že strava bohatá na flavonoidy přináší ochranu před mnohými onemocněními, nicméně stále není zcela jasné za jakých podmínek a v jakých dávkách je příjem jednotlivých flavonoidů bezpečný, aniž by představoval zdravotní riziko. Množství flavonoidů, které by mohlo působit mutagenně či cytotoxicky, by nemělo být dosažitelné z běžné stravy. Riziko by mohly představovat doplňky stravy, avšak doposud neexistují dlouhodobé studie, které by toto prokázaly [SKIBOLA a SMITH, 2000].

Výzkum potenciální toxicity hroznového polyfenolu epikatechinu, přinesl také negativní účinky. Byly pozorovány dvě buněčné linie keratinocytů vystavených po dobu 24 hodin dávce epikatechinu, která byla 3-7 násobně vyšší než antioxidačně působící koncentrace. Sloučeniny obsahující fenolické skupiny měly větší potenciál toxicity než sloučeniny, které je neobsahovaly [UGARTONDO *et al.*, 2006].

Patrné poškození DNA v buňkách bylo pozorováno u buněk myší sleziny, která byla inkubována s vyšší koncentrací (150 mmol / l) katechinu. Dle výsledků se negativní účinky fenolických látek týkaly jen některých molekul, účinky byly převážně synergické a koncentrace byla vždy rozhodujícím faktorem [FAN *et al.*, 2008]. Další studie se zabývají negativními dopady proanthokyanidinů a hydrolyzovaných tříslovin v bacheru přežvýkavců [HART *et al.*, 2011]. Trpkost a nepříznivé vlivy tříslovin na epitel ústní dutiny má krátkodobý vliv na příjem potravy. Dlouhodobé účinky mohou vést ke snížení koncentrace amoniaku a volných mastných kyselin v tekutinách bacheru. Zvýšení obsahu tříslovin ve stravě přežvýkavců může být spojeno se zvýšením koncentrace plazmatických bílkovin a se sníženou rychlostí degradace rozložitelných látek v bacheru. V důsledku toho organické látky a bílkoviny, které zvyšují stravitelnost nepřímo souvisí s koncentrací taninu. Pokud se značné množství tříslovin dostane do dvanáctníku, mohou výrazně snížit střevní aktivitu enzymů slinivky břišní (trypsinu a amylázy) a aminokyselin, které se vstřebávají ve střevním traktu. Kondenzované třísloviny mohou také snížit obsah tekutiny v bacheru, urychlit průchod kapaliny ze slezu a zpozdít tak průchod tráveniny ve střevě. Celkovým efektem je zpoždění průchodu kapalin a pevných částic v celém zažívacím traktu. Předpokládá se, že tyto reakce jsou do značné míry důsledkem působení tříslovin s trávicími enzymy na epitel sliznice trávicího traktu [SILANIKOVE *et al.*, 2001].

5 BUNĚČNÉ KULTURY

5.1 Buněčná kultura jako zdroj biologického materiálu

Testy prováděné na buněčných kulturách dnes patří mezi základní techniky používané v základním a aplikovaném výzkumu i ve výrobě. Ve výzkumu slouží především jako zdroj materiálu (tj. buněk nebo buněčných součástí) pro pokusy. Zcela nezastupitelné postavení mají kultury při výrobě protilátek. Kromě toho se buněčných kultur využívá i pro výrobu dalších bílkovinných molekul a peptidů. Kultivované buňky jako pokusný model mají dnes již své pevné a nenahraditelné postavení [FRESHNEY, 2002].

Využití buněčných kultur v experimentální práci má ve srovnání s jinými typy biologických modelů, např. v porovnání s použitím laboratorního zvířete nebo izolovaného orgánu či tkáně, zásadní výhody. Především pokus probíhá na jediném, dobře charakterizovaném buněčném typu a jeho výsledky nejsou ovlivněny interakcí s jinými orgány, tkáněmi či buněčnými populacemi. Řadu buněčných linií lze snadno kultivovat a v krátké době je možné získat poměrně velké množství přesně definovaného a homogenního materiálu, což při práci s jinými biologickými modely bývá obtížné. Na kultivovaných buňkách lze také bez nesnází provádět experimenty, při nichž dojde k jejich zničení. Naproti tomu zničení nebo poškození pokusného modelu při práci se zvířaty přináší etické problémy a v případě pokusů na lidech je zcela nemyslitelné [DAVIS, 2002].

Je potřeba počítat i s významnými omezeními, která použití buněčných kultur limitují. Kultivované buňky rostou za nefyziologických podmínek – pěstují se v umělém kultivačním médiu, jehož složení neodráží přesně složení vnitřního prostředí v organismu, a také v atmosféře s mnohonásobně vyšším tlakem kyslíku, než odpovídá situaci ve tkáních. Kultivované buňky postrádají obvyklý tkáňový kontext, tj. přítomnost jiných buněčných typů s nimiž by *in vivo* komunikovaly a vyměňovaly si nejrůznější látky. V důsledku toho se často mění fenotyp kultivovaných buněk, takže jejich vlastnosti nemusejí přesně odpovídat vlastnostem stejných buněk v organismu – kultivované buňky mění svou morfologii, mění se exprese genů, citlivost na různé podněty atd. [REGNIER *et al.*, 1997].

5.2 Zdroje buněk pro kultivaci

Zdrojem buněk pro založení kultury je laboratorní zvíře nebo člověk (méně často se používají kultury buněk hmyzu a rostlinné buněčné kultury). Buňky ke kultivaci *in vitro* se získávají z daného orgánu (např. kůže) nebo z embryí způsobem rozvolnění tkáně pomocí

trypsinu či mechanického rozrušení. Vznikne tzv. primokultura s omezenou dobou kultivace a specifickými požadavky. Po první pasáži (odebrání části buněk a přenesení do čerstvého životního prostředí) vzniká buněčná linie, tzv. sekundární kultura. V těchto fázích může docházet k mutacím a imortalizaci buněk, nemusí však dojít ke ztrátě kontroly nad růstem. Buněčné linie jsou adaptovány na dlouhodobý růst *in vitro* [FRESHNEY, 1992].

Po namnožení buněčné kultury se buňky oddělí a přenesou do nových kultivačních nádob. Tímto postupem vzniká již zmíněná sekundární kultura. Buňky v sekundární kultuře se pěstují tak dlouho, dokud není dostatečné množství materiálu pro pokus. Pokud jde o zakládání primokultury, můžeme rozlišit buňky pocházející z normální a z nádorové tkáně. Nádorové buňky se svými vlastnostmi liší od normálních buněk – lépe se množí a obecně se snáze kultivují. Kultury normálních buněk mají omezenou životnost, po několika pasážích dochází k tzv. zestárnutí kultury – buňky změni svoje vlastnosti a přestanou se dělit. Nádorové buňky většinou stárnutí nepodléhají. Odlišně se také chovají buňky izolované z dospělého jedince a z embrya. Embryonální buňky se opět snáze pěstují a kultury, které z nich vycházejí, mají zpravidla výrazně delší životnost. Na druhou stranu bývají náchylnější ke změnám fenotypu [MARCOVIC *et al.*, 1998].

Vlastnosti kultivovaných buněk se mohou lišit podle živočišného druhu a případně i podle linie pokusného zvířete. Nejčastěji se kultivují buňky izolované z laboratorního potkana, myši, králíka a často se kultivují lidské buňky. Buněčnou kulturu lze založit různými postupy. V některých případech stačí nechat vyrůstat buňky přímo z kousku tkáně kultivované za vhodných podmínek (tzv. explantační kultura, tímto způsobem se získávají např. fibroblasty). Většinou je však třeba nejprve vhodnými postupy izolovat jednotlivé buňky. Obvykle se používají postupy založené na kombinaci mechanického rozvolnění tkáně a enzymatického natrávení mezibuněčné matrix kolagenázou, elastázou, trypsinem apod. Některé buněčné typy, např. buňky jaterního parenchymu, lze izolovat pomocí perfuze orgánu vhodným médiem (často roztokem, který obsahuje proteázy). Uvolněné buňky se pak zcentrifugují a kultivují [EIBL *et al.*, 2008].

Uvedenými postupy zpravidla získáme směs, která kromě požadovaných buněk obsahuje i příměs dalších buněčných typů. Musí proto následovat krok, který zajistí čistotu vytvořené kultury. Nejjednodušší, i když ne zcela spolehlivou metodou, bývá použití kultivačních podmínek, které umožní růst pouze požadovaného buněčného typu. Používá se i selekčních médií, která zabrání růstu kontaminujících buněk – např. optický D-izomer aminokyseliny

valinu je toxický pro fibroblasty. Máme-li suspenzi, která obsahuje několik buněčných typů, můžeme je oddělit pomocí centrifugace dle gradiendu hustoty. Využívá se toho, že různé buněčné typy mívají různou specifickou hmotnost.

5.3 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálních-chemických vlastností buňky nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Je to rychlá, přesná a reprodukovatelná metoda, umožňuje současné měření několika parametrů, až 100 000 buněk za 1 sekundu [SHAPIRO, 1995]. Ve chvíli, kdy buňka tento paprsek kříží, dochází k lomu a rozptylu světla, který podle směru a úhlu lomu bývá označován jako přímý rozptyl - forward scatter (FSC) a boční rozptyl - side scatter (SSC). FSC je charakterizován lomem světla o malém úhlu ($20-130^\circ$) a je úměrný velikosti buňky. Úhel bočního rozptylu je 90° a je indikátorem vnitřní buněčné struktury resp. granularity. Kromě parametrů lomu a rozptylu světla je detekována rovněž fluorescence procházejících buněk nebo částic. Fluorescenční barviva (fluorochromy) navázané na analyzované buňky nebo částice absorbují světlo určité vlnové délky vyzařované laserem a následně emitují část takto absorbovaného světla avšak již o odlišné vlnové délce. V průtokové cytometrii se používají fluorochromy, které mají většinou stejné spektrum absorpční, ale jiné emisní. Průtokové cytometry využívají jako světelného zdroje totiž nejčastěji argonový laser o excitační vlnové délce 488 nm [ORMEROD, 1994].

5.4 Kultivační podmínky

5.4.1 Vybavení potřebné pro kultivaci buněk *in vitro*

Práce s tkáňovými kulturami vyžaduje zvláštní vybavení. Jedním z hlavních požadavků je udržení sterility a zabránění kontaminacím. Je vhodné pracovat ve vyhrazené čisté laboratoři podléhající speciálnímu režimu. Mezi základní pomůcky patří laminární box, inkubátor s řízenou atmosférou (zvýšený parciální tlak oxidu uhličitého, vysoká relativní vlhkost) a inverzní mikroskop vybavený fázovým kontrastem. 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, 2002].

Většina buněčných kultur je adherentní, tj. buňky rostou na vhodném kultivačním povrchu. Nejčastěji se pro pěstování buněk používají polystyrenové nádoby, jejichž povrch je upraven tak, aby byl hydrofilní. Náročnějším kulturám hydrofilní polystyren k růstu nestačí

a je nutné povrch potáhnout vhodnou látkou, která adhezi buněk zlepší. Mohou to být polypeptidy složené z aminokyselin s polárním postranním řetězcem (nejčastěji polylysin). Adhezi řady buněk usnadní kolagen [SHALLER *et al.*, 2002].

Buňky se zpravidla kultivují při teplotě blízké tělesné teplotě zdrojového organismu, většinou tedy při 37 °C. Atmosféra v inkubátoru se obohacuje o oxid uhličitý a obvykle obsahuje 5 % CO₂. Zvýšená koncentrace oxidu uhličitého se podílí na udržení pH médií s bikarbonátovým pufrem. Aby se neodpařovala voda z kultivačního média a nedocházelo tak ke změně koncentrace jeho složek, udržuje se relativní vlhkost atmosféry kolem 90 %. Buňky se pěstují ve speciálních inkubátorech, které mohou zajistit všechny uvedené parametry. Kromě regulace teploty musejí tedy být vybavené i zařízením pro řízení koncentrace CO₂. Je nutné zajistit, aby nedošlo ke kontaminaci kultur bakteriemi, plísněmi či parazity. Inkubátor musí umožňovat snadné čištění, dezinfekci a případně i sterilizaci povrchů, jeho součásti bývají proto někdy vyrobeny z materiálů, které růstu bakterií a plísní brání. Některé inkubátory používané pro práci s buněčnými kulturami jsou vybavené dalšími součástmi, které riziko kontaminací snižují, např. sterilizují vnitřní atmosféru ultrafialovým zářením [SALLBACH *et al.*, 1997].

5.5 Kultivační média

Kultivované buňky rostou v médiu, které do značné míry napodobuje extracelulární tekutinu. Kultivační médium tvoří tenkou vrstvu kapaliny nad adherovanými buňkami a umožňuje tak dostatečně rychlou difúzi kyslíku a oxidu uhličitého. Obsahuje množství živin, které umožňuje růst buněk po několik dní. Médium se mění zpravidla dvakrát až třikrát týdně.

Kultivační médium má vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti a obsahuje ve vhodné koncentraci látky, které buňky potřebují pro život a proliferaci. Jde o vodné roztoky obsahující mnoho, někdy i několik desítek složek. Mezi nejvýznamnější látky obsažené v kultivačních médiích patří anorganické soli, pufrů, glukosa a 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 do média dodává přídatkem séra. Rozdělení médií podle toho, zda jejich součástí je či není sérum, je významným klasifikačním kritériem [FRESHNEY, 2005].

5.6 Sérum

Přídavek séra do kultivačního média doplní velkou řadu biologicky významných organických látek, jako jsou růstové faktory, inhibitory proteáz či některé látky významné pro adhezi buněk. Samotná koncentrace bílkovin je důležitá, pomáhá buňkám odolávat mechanickému poškození. Sérum je významnou součástí kultivačního média a zdrojem látek, jejichž koncentrace je velmi nízká, přesto jsou pro růst kultury nezbytné – příkladem mohou být stopové prvky, jako je zinek, selen, měď, mangan, vitamíny a podobně. Přídavkem séra tak do média dodáme několik stovek biologicky významných sloučenin [DAVIS *et al.*, 2002].

Pro suplementaci kultivačních médií se nejčastěji používá bovinní sérum, zvláště pak sérum získané z telecích fětů. Důvodem pro použití fetálního séra je vyšší obsah růstových faktorů, což umožňuje lepší proliferaci kultivovaných buněk. Kromě fetálního telecího séra je dostupná i řada dalších sér pro speciálnější aplikace. Jsou to séra vyrobená z krve různých živočichů, např. koně, králíka apod. Séra nemusejí být izolovaná jen z krve fětů, ale i z krve novorozených zvířat (prekolostrální séra) či dospělých jedinců. V závislosti na stáří jedince se mění složení a koncentrace růstových faktorů v séru a tím i vliv na proliferaci, ale také diferenciaci kultivovaných buněk. Vedle běžných sér, která jsou pouze sterilizována filtrací, se prodávají i séra tepelně inaktivovaná, při jejichž použití je menší riziko přenosu virové infekce. Problémem obohacení kultivačního média sérem je riziko přenosu infekce. Séra se běžně sterilizují filtrací, čímž se spolehlivě zabrání přenosu většiny bakterií a plísní, významně se sníží riziko přenosu mykoplazmat. Nebezpečí přenosu virů také klesá, nelze je však vyloučit a totéž platí o riziku přenosu prionů. Renomovaní výrobci testují séra na přítomnost nejdůležitějších patogenů [FRESHNEY, 1997].

5.6.1 Bezsérová média

Snaha o lepší definovanost kultivačního média a o eliminaci problémů, s nimiž je používání médií se sérem spojeno, vedla k vyvinutí bezsérových médií. Složení kultivačního média je v tomto případě mnohem komplexnější. Všechny potřebné mikronutrienty, růstové faktory a další látky se dodávají jednotlivě nebo v jednoduchých, dobře definovaných směsích. Příprava bezsérových médií je o něco náročnější, často bývá i dražší. Tato média jsou velmi dobře definovaná a odpadají obavy ze zavlečení infekce přenášené sérem, na druhou stranu většina kultur roste v bezsérových médiích hůře než v médiích se sérem [MACLEOD *et al.*, 1999].

5.7 Anorganické soli a pufrující složky

Nezbytnou součástí média je vždy směs vhodných anorganických solí. Zajišťuje hlavní ionty nezbytné pro fyziologické funkce kultivovaných buněk. Anorganické soli se největší měrou podílejí na udržení osmotického tlaku média. Některé z nich, zejména uhličitany a fosfáty mají zásadní význam při udržování stálého pH.

V zásadě se používá několik osvědčených směsí anorganických solí, které můžeme považovat za základ většiny běžných kultivačních médií. V závislosti na použitém pufracím systému je můžeme rozdělit do dvou skupin podle toho, jestli se hodí pro práci v normální atmosféře (taková média se používají např. pro oplachování buněk při různých manipulacích s kulturou, při pokusech atd.) nebo pro kultivaci v inkubátoru s vyšší koncentrací CO₂. Směs solí, která tvoří základ médií pro kultivaci v atmosféře s 5 % CO₂, obsahuje například tzv. Earlov vyvážený roztok solí nebo Dulbecův roztok solí pufrovaný fosfáty. Naproti tomu pro práci v normální atmosféře se nejčastěji používají média založená na Hankově vyváženém roztoku solí [OXFORD LABORATORY HANDBOOK, 2001]. Kromě anorganických pufrů se pro udržování stálého pH do kultivačních médií přidávají i vybrané organické pufrů. Nejčastěji se používají látky krátce označované HEPES a TES, k dispozici je ale ještě několik dalších tzv. biologických pufrů. Hodnota těchto látek je pak velmi blízká fyziologickému pH 7,4. Kromě toho jsou tyto pufrů v obvyklých koncentracích netoxické a prakticky neovlivňují fyziologické funkce kultivovaných buněk. Do kultivačních médií se rutinně přidává acidobazický indikátor – fenolová červeň. Při pH 7,4 má jasně červenou barvu, která se směrem ke kyselé oblasti mění na žlutou, v alkaličtějším prostředí na fialovou. Přídavek indikátoru usnadňuje běžnou práci s buněčnými kulturami – rostoucí buňky do média vylučují kyselé katabolity, zežloutnutí média je tedy známkou, že je nutné jej vyměnit [HAY *et al.*, 2000].

5.8 Zdroje energie

Další složkou kultivačního média je zdroj energie. Nejvýznamnější postavení má bezpochyby glukosa. Nezanedbatelnou měrou využívají buňky jako energetický substrát i L-glutamin, který rovněž bývá častou součástí médií. Vzácněji se namísto glukosy používají jiné sacharidy, například galaktosa nebo fruktosa. Při jejich metabolizování tvoří buňky méně laktátu a médium není tolik okyselováno [DAVIS, 2002].

5.9 Další složky médií

Kultivační média dále obsahují různé směsi aminokyselin. Většina běžně používaných kultivačních médií obsahuje přinejmenším esenciální aminokyseliny, ostatní aminokyseliny mohou být dodány přídatkem séra. Podobně jsou součástí médií vitaminy, především skupiny B. I v tomto případě se část vitaminů dodává se sérem. Podle typu kultivovaných buněk se i do sérových médií někdy přidávají vhodné růstové faktory. Běžným doplňkem řady směsí je inzulin (který má významnou mitogenní aktivitu), často přidávaný společně se selenem a transferinem ve standardně používané směsi. Jiným častým doplňkem podporujícím růst buněk je hydrokortizon, případně se přidávají specifické látky většinou peptidického charakteru. Zejména do bezsérových médií se doplňují i mastné kyseliny, lipidy a stopové prvky [FRESHNEY, 1992].

5.10 Antibiotika

Antibiotika se často do médií přidávají, aby se zabránilo kontaminaci kultury bakteriemi. Používání antibiotik může vést k tomu, že se pracuje s kulturou kontaminovanou skrytou infekcí. Při běžné práci se nedaří kontaminaci rozpoznat, přitom se zásadně mění vlastnosti buněk. Experimentální data získaná s takovými kulturami proto mohou být výrazně zkreslená. S kulturou, která byla ošetřena antibiotiky, je třeba pracovat v karanténě, a to i nějakou dobu po jejich vysazení. [DAVIS, 2002].

Nejčastěji se z antibiotik do médií přidává penicilin a streptomycin. Penicilin je velmi málo toxický, poměrně rychle se však v kultivačním médiu rozkládá. Streptomycin patří mezi výrazně alergenní látky, práce s ním je tedy potenciálně riskantní pro personál. Je rovněž toxický pro některé buňky. Streptomycin se někdy nahrazuje gentamycinem, který má širší spektrum účinku. Jinou běžně používanou kombinací je penicilin a kanamycin. V případě potřeby se k antibiotikům přidávají i antimykotika, nejčastěji amfotericin B nebo nystatin. Obecně platí, že antimykotika mívají na některé buněčné linie toxické účinky [OXFORD LABORATORY HANDBOOK, 2001].

5.11 Růst buněčné kultury

Z praktického hlediska můžeme říci, že buňky se v kultuře množí přibližně exponenciálně (tzv. log-fáze) až do okamžiku, kdy se v důsledku kontaktní inhibice začne růst buněk zpomalovat (dosažení plató). V ideálním případě se buňky pěstují právě ve fázi exponenciálního růstu – krátce před dosažením plató se kultura nařadí a nasadí do nových kultivač-

ních nádob v takové hustotě, aby opět rostla exponenciálně. Pokud je buněk v kultuře velmi málo, je jejich množení výrazně pomalejší, nebo dokonce mohou buňky zaniknout apoptózou (tzv. lag-fáze růstu kultury). To je způsobeno tím, že normálně se buňky v kultuře vzájemně ovlivňují a produkují růstové faktory. Je-li počet buněk v kultuře příliš nízký, není koncentrace růstových faktorů uvolňovaných do média dostatečná a množení buněk se zpomalí nebo i zastaví. Pokud je potřeba pěstovat buňky v nízkých koncentracích, může být řešením použití tzv. kondicionovaného média – v kultivačním médiu se před použitím nechají po krátkou dobu (několik hodin až dní) růst vhodné, rychle se množící buňky (např. fibroblasty). Pak se médium sterilizuje filtrací a použije pro řídkou kulturu [FRESHNEY 1992].

Různé buněčné linie se při nízkých hustotách chovají různě. Stejně tak se různé linie liší i svým chováním před dosažením plató. Většina buněčných kultur časem dosáhne konfluence – na kultivačním povrchu se vytvoří hustá, prakticky souvislá vrstva buněk, které se vzájemně dotýkají. Konfluentní kultura je přitom uspořádána do jediné vrstvy (monolayer), pak se další množení buněk zastaví. Některé buněčné linie ovšem konfluence nikdy nedosáhnou (např. endotelie), dělení buněk se zastaví dříve – například jakmile se jednotlivé buňky začnou dotýkat třeba jen svými výběžky. Naproti tomu nádorové buňky kontaktní inhibici postrádají, takže rostou i po vytvoření jednoduché konfluentní vrstvy. Začnou se vytvářet shluky buněk. Pokud se taková kultura včas nenařadí, začnou buňky v centrech shluků odumírat, neboť nejsou dostatečně dobře zásobovány živinami. Nechá-li se konfluentní kultura příliš dlouho v původní nádobě, začnou se buňky oddělovat od kultivačního povrchu a odumírat. Přitom se již omezeně dělí, takže celková hustota buněk zase začne klesat [MACLEOD *et al*, 1999].

5.11.1 Subkultura

Zpravidla krátce před koncem exponenciální fáze růstu se buněčné kultury tzv. pasážují, vytvářejí se subkultury. Adherentní buňky se uvolní od kultivačního povrchu i od sebe navzájem, nařadí se a přenesou se do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem [DAVIS, 2002].

K disociaci buněk se nejčastěji používá kombinace odstranění dvojmocných iontů (vápníku a hořčíku) z média a působení proteáz (nejčastěji trypsinu). Vápenaté a hořečnaté ionty jsou součástí mnoha adhezních faktorů. Z kultury se odstraní jednak opláchnutí médiem, které vápník a hořčík neobsahuje, jednak pomocí chelátorů – nejčastěji EDTA, vzácněji

např. citrátu. Bílkovinné adhezni molekuly se pak krátce natráví trypsinem. Po uvolnění se buněčná suspenze ošetří čerstvým kultivačním médiem se sérem (sérum obsahuje řadu antiproteáz, např. α 1-antitrypsin) nebo s inhibítorem trypsinu. Mnohem méně se při pasážování používají jiné postupy k uvolnění buněk, např. prudké snížení teploty nebo mechanická disociace [OXFORD LABORATORY HANDBOOK, 2001].

5.11.2 Stárnutí kultury

Buňky není možné kultivovat neomezeně. Po určitém počtu pasáží dochází k jejich zestárnutí, buňky mění své vlastnosti a přestávají se dělit. Životnost buněčné kultury záleží na typu kultivovaných buněk, jejich původu (např. embryonální buňky lze kultivovat déle než buňky z dospělého jedince) apod. V některých případech k zestárnutí kultury nedojde, buněčnou linii je možné pěstovat neomezeně – mluvíme o kontinuálních nebo imortalizovaných kulturách. Někdy vznikne kontinuální linie spontánní transformací buněčné kultury, popřípadě jde o kultury nádorových buněk. Cíleně se dá imortalizace dosáhnout chemickou nebo virovou transformací buněk [DAVIS, 2002].

5.12 Zmrazování kultivovaných buněk

Živé kultivované buňky je možné v případě potřeby zmrazit a po dlouhou dobu uschovat. Dá se k tomu využít i běžný hlubokomrazicí box s teplotou kolem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, v němž je možné přechovávat zmražené živé buňky po několik měsíců i let. Jde o levné řešení nenáročné na speciální vybavení, po delší době však takto přechovávané zmražené buňky ztrácejí životaschopnost. Živé buňky je třeba zmrazit tak, aby nedošlo k jejich poškození krystaly vody. Do kultivačního média se proto přidává vhodné kryoprotektivum, nejčastěji dimethylsulfoxid (DMSO), což je látka přidávaná k biologickému materiálu při kryo-konzervaci chránící buňky před účinky nízkých teplot a po rozmrazení je obvykle nutné ji odstranit. Mnohem méně často se jako kryoprotektivum používá glycerol nebo jiné látky. Aby se zlepšilo přežívání buněk při zmrazení a rozmrazení, přidává se často do kultivačního média více séra. Nejlepších výsledků se dosáhne, pokud se buňky zmrazují pomalu (obvykle se doporučuje ochlazování o 1 až 3 $^{\circ}\text{C}$ za minutu). K tomu se dá použít speciálního programovatelného zařízení. Běžně používanou variantou jsou speciální pomůcky na zmrazování buněk – zpravidla jde o vhodně izolované nádoby, často naplněné určitým nemrznoucím roztokem, který zabezpečí správnou rychlost chladnutí buněčné suspenze. Zatímco mrznutí uchovávaných buněk musí probíhat pomalu, rozmrazení by mělo být naopak co nejrychlejší (v zásadě do 3 minut). Při zmrazení a rozmrazení buněk může dojít

ke kontaminaci kultury. Rozmražená kultura by z toho důvodu měla být považována za potenciálně rizikovou a měla by projít karanténou. [FRESHNEY, 1992].

5.12.1 Přeprava buněk

Přeprava buněk může probíhat několika způsoby. V termosce (lokální přeprava), zmrazené v izolačním boxu se suchým ledem (CO₂) pro přepravu na velké vzdálenosti (zásilkové společnosti mívají i službu s doplňováním suchého ledu), nebo také živé v kultuře, v kulturační nádobce s nadbytkem média (v závislosti na buněčném typu 1 – 3 dny). Tkáně (s výjimkou krve) se přepravují podchlazené (ne zmrzlé) ve výživných médiích [SPECTOR, 1998].

5.13 Dezinfekce a sterilizace

Dezinfekce a sterilizace je v laboratoři buněčných kultur potřebná při přípravě pomůcek a materiálu, ale i pro dekontaminaci použitého materiálu a odpadu. Z hlediska účinnosti můžeme rozlišit dezinfekci, rozšířenou dezinfekci a sterilizaci. Jako dezinfekci označujeme postupy, které snižují riziko kontaminace tím, že ničí velkou část mikroorganismů. Dezinfekční postupy, které se svou účinností již blíží sterilizaci, někdy označujeme jako tzv. rozšířenou dezinfekci. Nejčastěji se k rozšířené dezinfekci používá roztok kyseliny peroxyoctové (Persteril), který při správné aplikaci spolehlivě likviduje všechny běžné mikroorganismy, nezničil by však např. některé cysty [KLEMENT *et al.*, 1987].

Ke sterilizaci materiálu se v laboratorních podmínkách používá nejčastěji autoklávování a horkovzdušná sterilizace. Při autoklávování se mikroorganismy ničí nasycenou vodní parou při vysoké teplotě (nejčastěji 121 °C) a zvýšeném tlaku. Jde o velmi spolehlivou sterilizační metodu. Plata s jamkami pro buněčné kultury a další materiál a pomůcky se průmyslově sterilizuje γ -zářením [STOKER, 1973].

5.14 Kontaminace buněčné kultury

Příčinou kontaminace buněčných kultur bývají nejčastěji běžné druhy bakterií, které jsou všudypřítomné v okolním prostředí – například Gram pozitivní koky, Gram negativní kolidiformní bakterie apod. Obávaným kontaminantem jsou mykoplasmata a příbuzné druhy bakterií. Jde o intracelulární parazity, které na rozdíl od ostatních bakterií nelze snadno

rozpoznat při mikroskopické kontrole kultury. Přítomnost mykoplasmat vede ke zpomalení proliferace buněk a má dalekosáhlý vliv na vlastnosti kultury.

Buněčné kultury by měly být pravidelně testovány na přítomnost mykoplasmat. Používají se metody založené na detekci mykoplasmatické DNA pomocí PCR a fluorescenční barvení buněk na DNA – pro kontaminaci mykoplasmaty je typická přítomnost extranukleární DNA. Mykoplasmata jsou velmi drobné organismy, objeví-li se v kultuře mykoplasmatická infekce, je velké nebezpečí, že se zanesou i do dalších kultur, se kterými se v laboratoři pracuje. Vzácněji dochází ke kontaminaci kultur plísněmi a kvasinkami – nejčastěji se tak stává u buněk dlouhodobě pěstovaných s antibiotiky. Houby rostou mnohem pomaleji než bakterie a mají typickou, nezaměnitelnou morfologii. Virové infekce kultur jsou poměrně vzácné, jsou však obtížně detekovatelné. Nejspíše na ně upozorní makroskopická kontrola kultury – objevují se plaky, ložiska, v nichž došlo k buněčné lýze. Bakteriální infekce se mezi kulturami snadno šíří aerosoly, které vznikají při základních postupech včetně pipetování a které bývají poměrně stabilní (přetrvávají ve vzduchu řadu minut), snadno proto dojde k dalším kontaminacím. Zásadně lze léčbu doporučit jen u vzácných kultur, za něž není k dispozici náhrada. [FRESHNEY, 1992].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 METODIKA

Cílem práce bylo zjistit vliv polyfenolů extrahovaných z révy vinné na proliferaci eukaryotických buněk. V první fázi bylo nutné upravit koncentraci extraktů na cílové hodnoty. Tyto koncentrované roztoky byly přidány k buňkám a nechaly se kultivovat za vhodných podmínek. Následně byla proliferace vyhodnocena pomocí MTT. Detekce apoptózy byla provedena za použití průtokové cytometrie

6.1 Materiál

K práci byly použity tři druhy buněk HaCaT (human adult low calcium temperature keratinocytes), HepG2 (human hepatocellular carcinoma cells) a buňky vazivové tkáně – (mouse embryonic fibroblast cell line). Extrakty polyfenolů byly přichystány ze slupek a bobulí odrůd Frankovka, Muškát moravský a Burgunda modrá.

Tab. 3. Testovaný materiál

Frankovka	Muškát moravský	Burgunda modrá
Slupky	Slupky	Slupky
-	Bobule	Bobule
pozdní sběr	-	pozdní sběr

6.1.1 Příprava extraktů

Polyfenoly byly extrahovány ze tří odrůd takto: Hrozny byly smíchány s kvasinkami *Oenoferm Bouguet* (Erbslöh, Geisenheim). Po fermentaci, která probíhala 4 dny, byly homogenizovány v methanolu a následně extrahovány při - 4 °C po dobu 3 hodin. Po extrakci se na centrifuze při 1800 ot. po dobu 10 minut oddělil supernatant. Sediment byl podroben další extrakci. Tento proces se opakoval třikrát. Supernatanty obsahující polyfenoly byly zakoncentrovány ve vakuové odparce při 40°C a zbytky byly rozpuštěny na koncentraci 1000 mg / ml.

6.2 Kultivace buňek

Ke kultivaci byly použity tři různé buněčné linie. První linií byly lidské keratinocyty – HaCaT [BOUKAMP, 1988]. Druhou linií tvořili myší fibroblasty NIH 3T3. Fibroblasty se často používají při kultivaci keratinocytů, jelikož působí podpůrně při jejich růstu, v případě této kultivace však byly pěstovány zvlášť. NIH 3T3 poskytl k použití Cell Lines

Service (Catalog No. 300493, Germany). Jako médium bylo použito kultivační Dulbecco's Modified Eagle Medium se zvýšeným obsahem glukózy, přídatkem 10% fetálního séra skotu a Penicilinu/Streptomycinu, (100 µg/ml), (PAA Laboratories GmbH, Austria). Třetí buněčnou linií byly HepG2 z ATCC (HB-8065). HepG2 byly kultivovány v ATCC Eagle's Minimum Essential Medium CC, jehož součástí byl přídatek 10% fetálního séra skotu, 2 mM L-glutaminu a 50 µg/ml gentamycinu (PAA laboratoře GmbH, Rakousko).

6.3 Antiproliferační test

Vzorky byly dezinfikovány vystavením UV radiaci (258 nm) z nízkotlaké Hg lampy (UV-C Long Life 30 W/G30TB, Phillips, Holandsko). Extrakty z vín byly naředěny v kultivačním médiu k získání roztoků s koncentracemi 50, 25, 10, 5 a 1 µg/ml. Tyto roztoky byly použity do 24 hodin od naředění. Buňky byly napipetovány do 96 - ti jamkových testovacích plátů s koncentracemi 1×10^5 buněk/ml. Buněčné linie HaCat a NIH 3T3 byly předkultivovány 24 hodin, buňky v případě HepG2 48 hodin. Kultury byly následně naředěny. Jako kontrolní vzorek – blank, byly použity čisté linie bez přídatku polyfenolů. K posouzení antiproliferační aktivity byl použit MTT test (Invitrogen Corporation, USA). V případě HaCaT a NIH 3T3 došlo k vyhodnocení po třech a šesti dnech kultivace, v případě HepG2 po čtyřech a osmi dnech. Inkubace probíhala při 37°C v 5% atmosféře CO₂.

Metoda MTT je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu dimethylsulfoxidu a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm [BLACK, 1954] pomocí Sunrise microplate absorbance reader (Tecan, Švýcarsko). Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk. Životaschopnost buněk byla vyjádřena jako absolutní hodnota buněk přítomných v jednotlivých ředěních, popřípadě na buňky kultivované v čistém médiu bez polyfenolů. Všechny testy byly provedeny čtyřikrát. Pro zobrazení buněk a získání mikrosnímků pro fotodokumentaci byl použit invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem (Olympus, CKX41). Rozdíly mezi pozorovanými absorbancemi byly zjištěny T-testem pomocí statistiky pro Windows.

6.4 Metodika cytometrie

Na stanovení apoptózy byly keratinocyty 24 hodin předkultivované v 96ti jamkových destičkách s výchozí koncentrací 1×10^5 buněk/ml média. Následně byly k buňkám přidány extrakty v příslušné koncentraci polyfenolů. Extrakty se nechaly působit na buňky dalších 24 hodin. Jako kontrolní měření byly použity buňky kultivované v čistém médiu bez extraktů. Apoptické buňky byly vyhodnocené pomocí průtokové cytometrie, která umožňuje analýzu fyzikálně-chemických vlastností buněk během průchodu laserem. Měření probíhalo na přístroji BD FACSCanto II (BD Biosciences) s HTS (High Throughput Sampler), který umožňuje analýzu přímo z 96-jamkových destiček. Na analýzu a zpracování výsledků byl použitý software BD FACSDiva. Apoptické buňky byly identifikované pomocí fluorescenčního propidium jodidu, který interaguje s DNA. Rychlost přítoku vzorku byla nastavená na 30 $\mu\text{l}/\text{sec}$ a objem analyzovaného vzorku byl 25 μl . Avšak, vzhledem k tomu, že přístroj byl doručený v pozdějším termínu, v rámci této práce se nestihlo dokonale zoptimalizovat metodu na stanovení apoptózy eukaryotických buněk. Z tohoto důvodu v práci nejsou uvedené výsledky apoptózy. V příloze této práce jsou grafy naměřené pomocí této metody.

7 VÝSLEDKY

K vyhodnocení vlivu extraktů na buňky linií HaCaT a NIH 3T3 došlo po třech a šesti dnech, v případě HepG2 pak po čtyřech a osmi dnech. Z každého vzorku jsou graficky zaznamenány hodnoty absorbance, vždy pět hodnot dle koncentrace extraktu. U odrůdy Burgundy modré byly použity slupky, bobule i bobule pozdního sběru, u Frankovky slupky a bobule pozdního sběru a u Muškátu moravského byl extrakt získán ze slupek a bobulí.

7.1 Vliv extraktů ze slupek Muškátu moravského

Grafy vlivu polyfenolů extrahovaných ze slupek Muškátu moravského na linie HaCaT, HepG2 a NIH 3T3 (Graf 1. – Graf 3.), ukazují absorbanci MTT v porovnání s kontrolním měřením, na kterém je vidět růst buněk bez přídavku polyfenolů. Míra absorbance zároveň vyjadřuje míru proliferace. Byly použity koncentrace polyfenolických látek 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$.

Z grafu 1. který znázorňuje antiproliferační účinek na buňky linie HaCaT za přítomnosti extraktů ze slupek Muškátu moravského je patrné, že s postupně se zvyšující koncentrací polyfenolů se snižovala proliferace buněk. Všechny hodnoty byly statisticky významné a díky velmi malým směrodatným odchylkám je možné měření označit za přesné. Z výsledků tedy vyplývá pozitivní účinek polyfenolů ze slupek této odrůdy na snižování proliferace lidských keratinocytů. Jinak je tomu ale v případě hepatocytů, jak je zřejmé z Grafu 2. Koncentrace 50 a 25 $\mu\text{g/ml}$ měly zjevný antiproliferační účinek a byl také zjištěn statisticky významný rozdíl avšak snižující se koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ byla již neefektivní, jednalo se o statisticky nevýznamná měření, při kterých již nedocházelo k ovlivnění buněčného růstu. Toto mohlo být způsobeno absencí anebo naopak nadbytkem zastoupení určitého polyfenolu v dané koncentraci, což mohlo mít za následek změnu mechanismu působení extraktu. Poslední graf, znázorňující antiproliferační efekt extraktu ze slupek Muškátu moravského na linii myších fibroblastů je také zcela odlišný od předchozího. Každá koncentrace má velmi podobný snížený antiproliferační účinek. Na základě zjištění statisticky významného rozdílu u těchto koncentrací polyfenolů je tento účinek průkazný. Lidské keratinocyty jsou ovlivněny polyfenoly které pocházejí z extraktu ze slupek Muškátu moravského dle koncentrací. Při nejvyšší koncentraci - 50 $\mu\text{g/ml}$ byla nejnižší míra proliferace, nejvyšší pak při nejnižší koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Je tedy zřejmé, že buněčná linie HaCaT je odolná vůči polyfenolům dle výše jejich koncentrace, v přímo úměrném množství. Buněčná linie HepG2 působí na proliferaci až od koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ a výše, nižším koncentracím extraktu ze slupek Muškátu moravského je tato linie

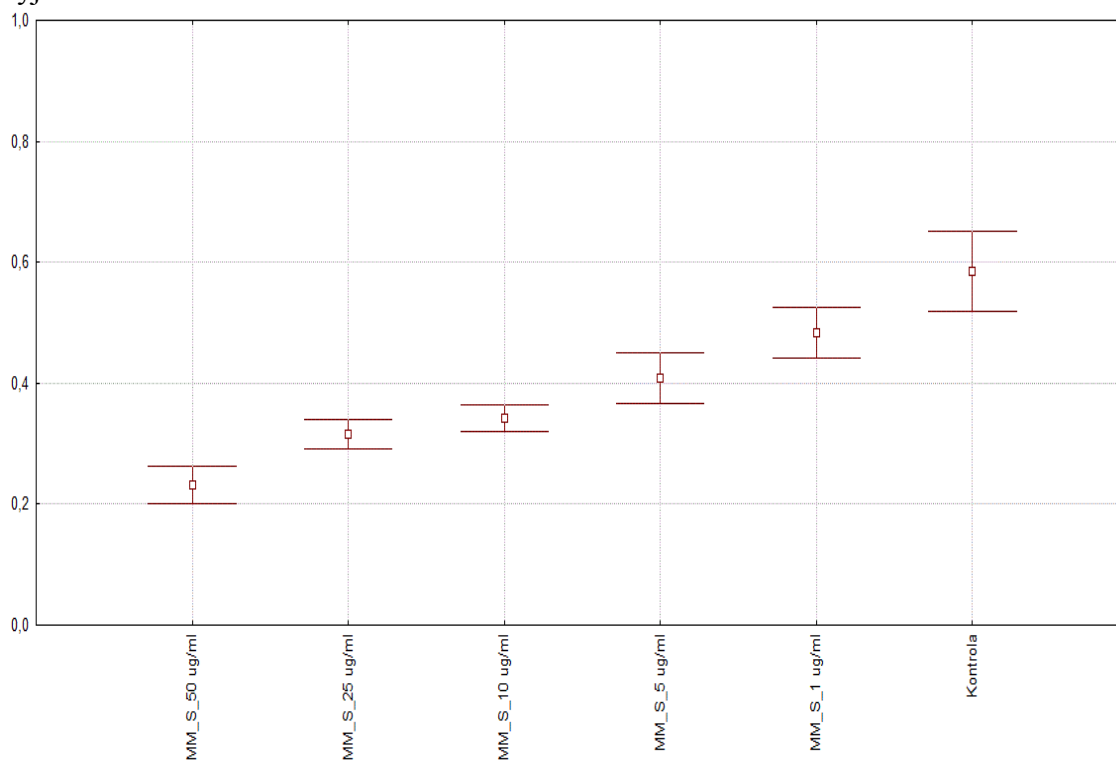
odolná. Nejvariabilnější odolnost vůči zvyšujícímu se obsahu polyfenolů byla prokázána u myších fibroblastů, jelikož byla naměřena velmi podobná absorbance u všech koncentrací.

Tab. 4. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Muškátu moravského na buňky HaCaT pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Muškat moravský slupky	50 ug/ml	0,2313	0,0329**
	25 ug/ml	0,3163	0,0253**
	10 ug/ml	0,3423	0,0228**
	5 ug/ml	0,4091	0,0443**
	1 ug/ml	0,4835	0,0448**
Kontrola		0,5846	0,0698*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 1. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Muškátu moravského na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance

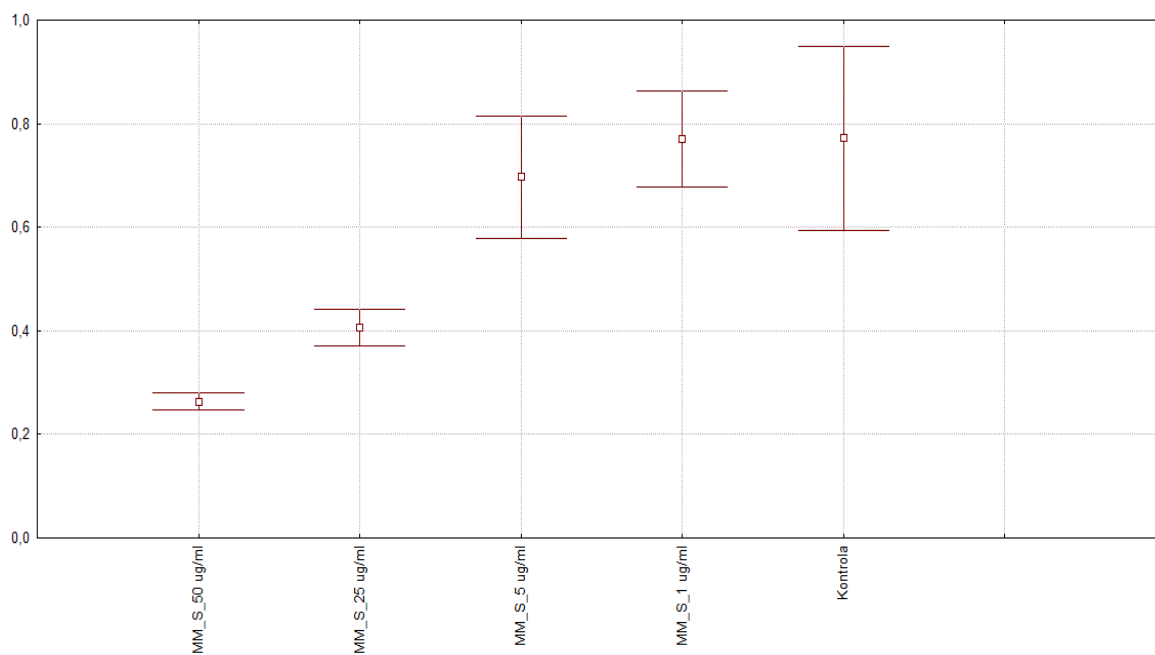


Tab. 5. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Muškátu moravského na buňky HepG2 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Muškat moravský slupky	50 ug/ml	0,2638	0,0183**
	25 ug/ml	0,4059	0,0365**
	5 ug/ml	0,6970	0,1243*
	1 ug/ml	0,7700	0,0972*
Kontrola		0,7717	0,1866*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 2. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Muškátu moravského na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance

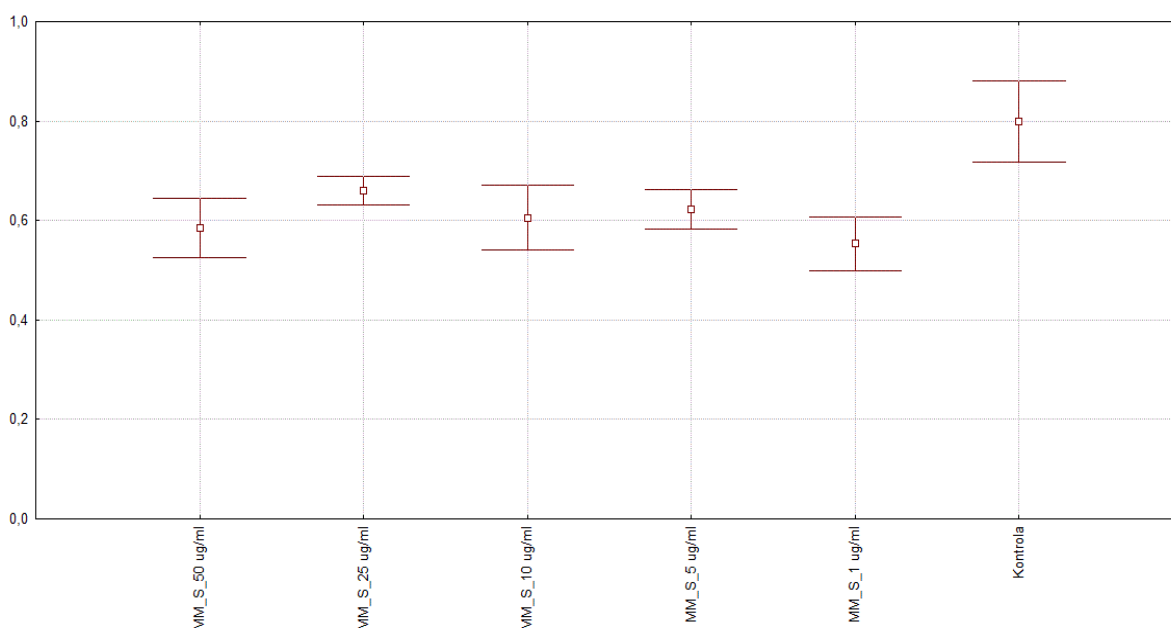


Tab. 6. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Muškátu moravského na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Muškát moravský slupky	50 ug/ml	0,5849	0,0635**
	25 ug/ml	0,6608	0,0301**
	10 ug/ml	0,6061	0,0695**
	5 ug/ml	0,6226	0,0413**
	1 ug/ml	0,5536	0,0570**
Kontrola		0,7989	0,0857*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 3. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Muškátu moravského na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance



7.1 Vliv extraktů z bobulí Muškátu moravského

Grafy vlivu polyfenolů extrahovaných z bobulí Muškátu moravského na linie HaCaT, HepG2 a NIH 3T3 (Graf 4. – Graf 6.), ukazují absorbanci MTT vyjadřující počet buněk, v porovnání s kontrolním měřením, na kterém je vidět růst buněk bez přídavku polyfenolů. Z Grafu 4. – vliv extraktů z bobulí Muškátu moravského na linii keratinocytů je patrné, že v koncentracích 50 a 25 ug/ml se se zvyšující koncentrací zvyšovala i antiproliferační aktivita. Vyjímkou je koncentrace 10 a 5 ug/ml. Při koncentraci 5 ug/ml je antiproliferační

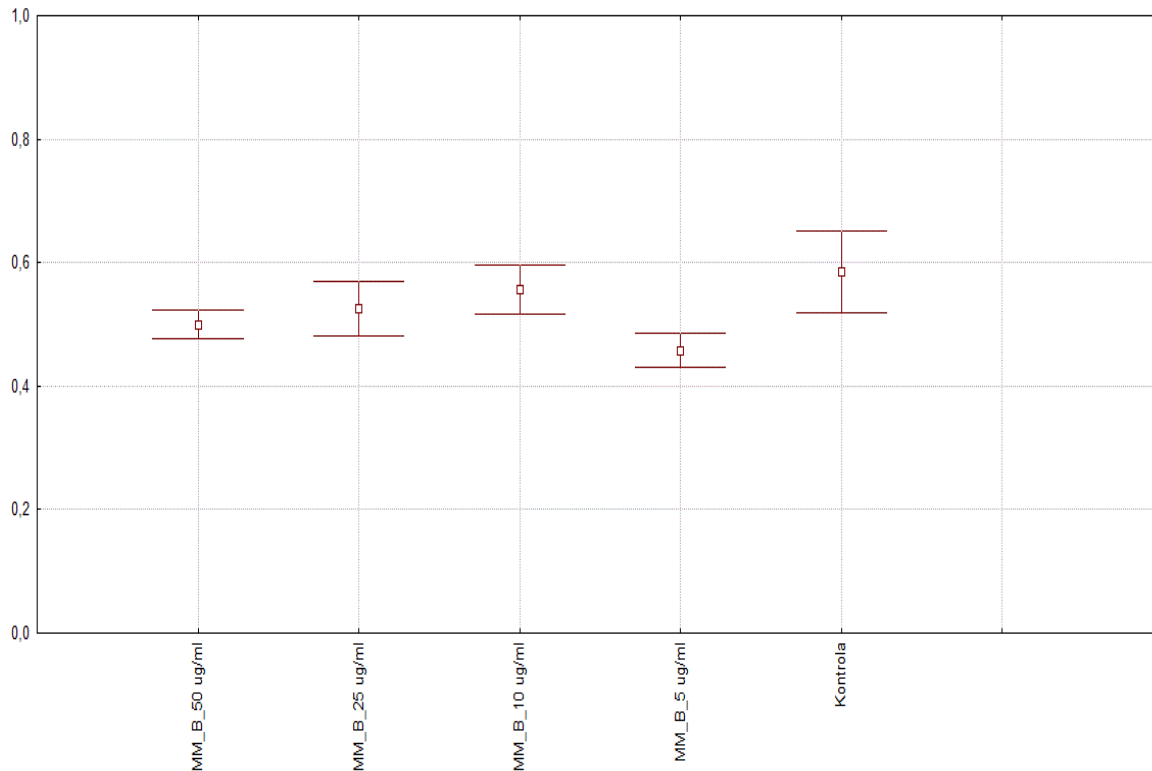
aktivita nejvyšší ze zkoumaných koncentrací a byl zde jako u ostatních zjištěn statisticky významný rozdíl. Je to způsobeno zřejmě tím, že aktivní látky extraktů při dané koncentraci mají vyšší inhibiční účinek na proliferaci. Avšak u koncentrace 10 ug/ml nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Tato koncentrace je tedy na linii HaCaT neúčinná. Graf 5., který zobrazuje účinek různých koncentrací extraktů na linii hepatocytů udává podobné výsledky jako Graf 2., kdy na linii HepG2 působily extrakty ze slupek této odrudy. Při zvyšujících se koncentracích polyfenolů se zvyšoval i antiproliferační efekt. U 10 a 5 ug/ml je větší směrodatná odchylka, což svědčí o velké variabilitě mezi měřeními ale i u těchto koncentrací byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Koncentrace polyfenolů 1 ug/ml ovšem již nemá vliv na buňky, statisticky významný rozdíl nebyl prokázán. Poslední Graf 6., znázorňující vliv extraktů polyfenolu na linii myších fibroblastů je také velmi podobný grafu 3., kdy na NIH 3T3 působily polyfenoly ze slupek Muškátu moravského. Antiproliferační účinek extraktů byl při všech koncentracích velmi podobný pohyboval se kolem hodnoty 0,6, což je způsobeno zvýšenou odolností této linie, jak při nejnižší tak i při nejvyšší měřené koncentraci.

Tab. 7. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Muškátu moravského na buňky HaCaT pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Mušlát moravský bobule	50 ug/ml	0,4997	0,0239**
	25 ug/ml	0,5261	0,0465**
	10 ug/ml	0,5568	0,0425*
	5 ug/ml	0,4580	0,0283**
Kontrola		0,5846	0,0698*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*,**)

Graf 4. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Muškátu moravského na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance

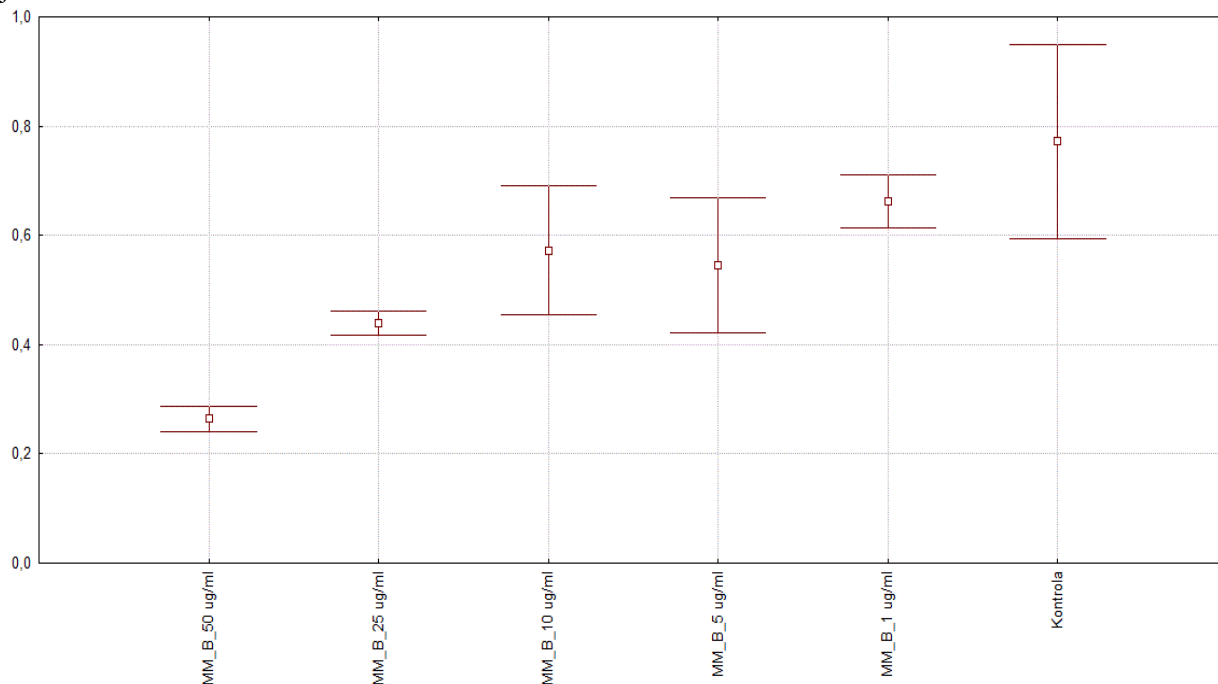


Tab. 8. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Muškátu moravského na buňky HepG2 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Muškát moravský bobule	50 ug/ml	0,2640	0,0237**
	25 ug/ml	0,4403	0,0231**
	10 ug/ml	0,5723	0,1246**
	5 ug/ml	0,5463	0,1302**
	1 ug/ml	0,6627	0,0513*
Kontrola		0,7717	0,1866*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*,**)

Graf 5. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Muškátu moravského na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance

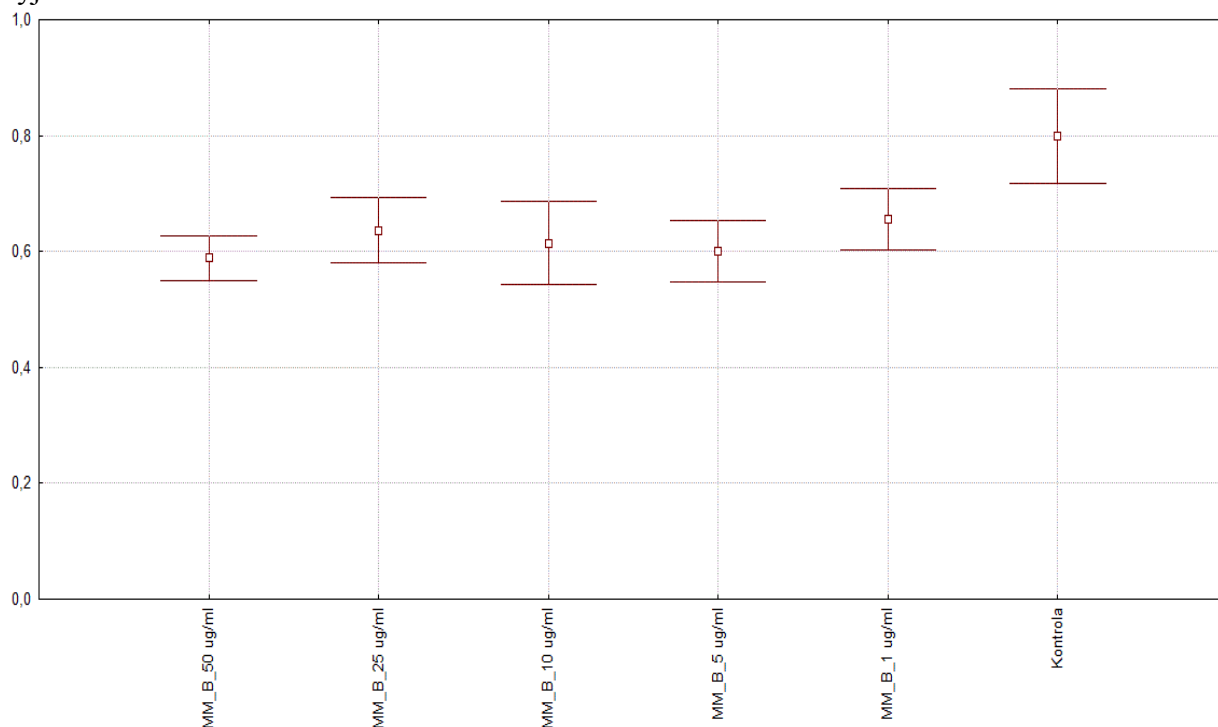


Tab. 9. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Muškátu moravského na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Muškát moravský bobule	50 ug/ml	0,5889	0,0401**
	25 ug/ml	0,6360	0,0593**
	10 ug/ml	0,6148	0,0761**
	5 ug/ml	0,6011	0,0556**
	1 ug/ml	0,6560	0,0561**
Kontrola		0,7989	0,0857*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*,**)

Graf 6. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Muškátu moravského na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance



7.2 Vliv extraktů z bobulí Burgundy modré

Následující grafy (Graf 7. – Graf 9.) znázorňují vliv polyfenolů extrahovaných z bobulí Burgundy modré na buněčné linie lidských keratinocytů, hepatocytů a fibroblastů hodnotou absorbance. Míra absorbance zároveň vyjadřuje míru proliferace. Byly použity koncentrace polyfenolických látek 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml a 1 µg/ml.

Graf 7. ukazuje výsledky HaCaT pro extrakty z bobulí Burgundy modré. Od koncentrace 5 až 50 µg/ml se tak jako u předchozích výsledků linií HaCaT zvyšuje antiproliferační účinek. Takto tomu ale není u koncentrace 1 µg/ml, kde je účinek dokonce nejvyšší. Zvýšení antiproliferačního účinku u nejmenší koncentrace může být způsobeno vlivem jednotlivého zastoupení určitého polyfenolu ve směsi. V grafu 8., který ukazuje výsledky HepG2 je patrný zvyšující se antiproliferační účinek spolu se stoupající koncentrací. I když u koncentrací 5 a 1 µg/ml jsou větší směrodatné odchylky, u všech výsledků byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Můžeme tedy říci, že se zvyšující se koncentrací extraktu z bobulí Burgundy modré se zvyšuje i inhibice proliferace linie hepatocytů. Výsledky z grafu 9., které ukazují antiproliferační efekt extraktů z bobulí Burgundy modré jsou zcela odlišné od předchozích grafů s výsledky účinku na fibroblasty, které byly téměř totožné. Z grafu je patrné, že při snižující se koncentraci se zvyšuje antiproliferační účinek, a to zejména u 5 a 1 µg/ml kdy je antiproliferační účinek nejvyšší. Absorbance pro koncentrace 10, 25 a 50 µg/ml je velmi podobná a to v rozmezí od 0,59 do

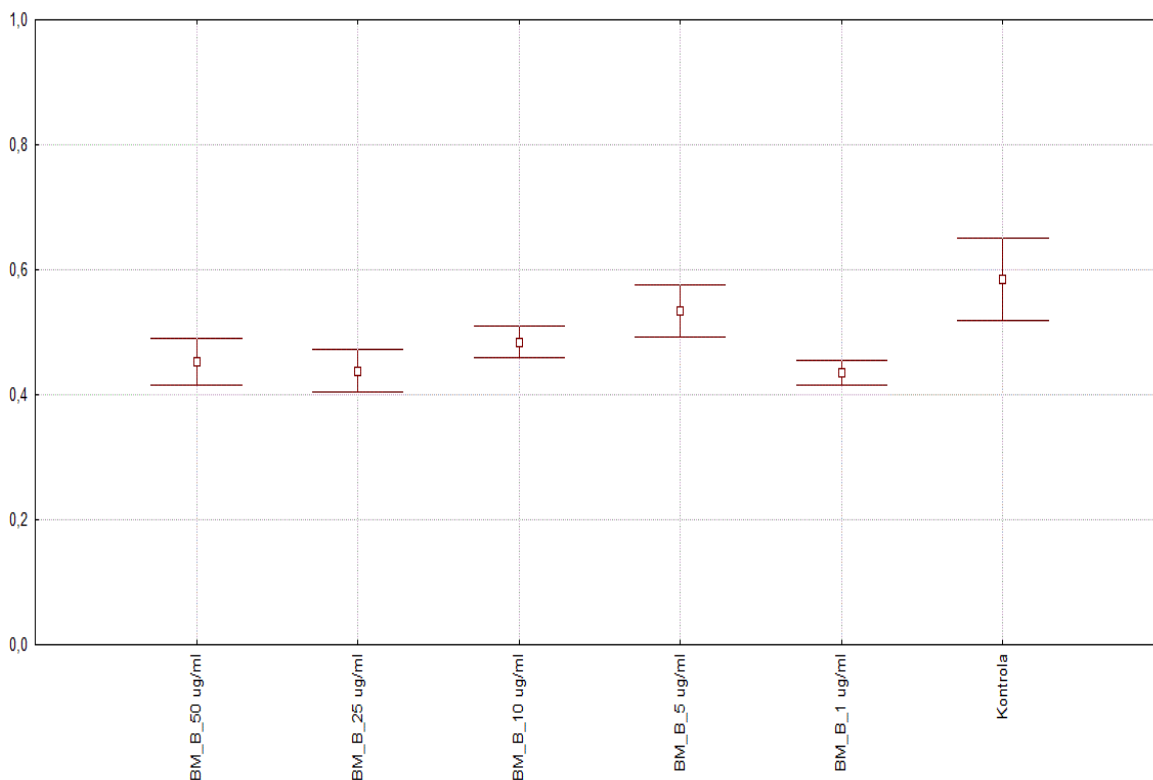
0,6. Jelikož všechny výsledky této linie měly velmi malé odchylky, jsou průměrné hodnoty velmi přesné. Z výsledků vyplývá pozitivní účinek polyfenolů této odrůdy na snižování proliferace buněk.

Tabulka 10. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Burgundy modré na buňky HaCaT pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Burgunda modrá bobule	50 ug/ml	0,4528	0,0395**
	25 ug/ml	0,4383	0,0352**
	10 ug/ml	0,4842	0,0264**
	5 ug/ml	0,5346	0,0445**
	1 ug/ml	0,4349	0,0208**
Kontrola		0,5846	0,0698*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 7. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Burgundy modré na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance

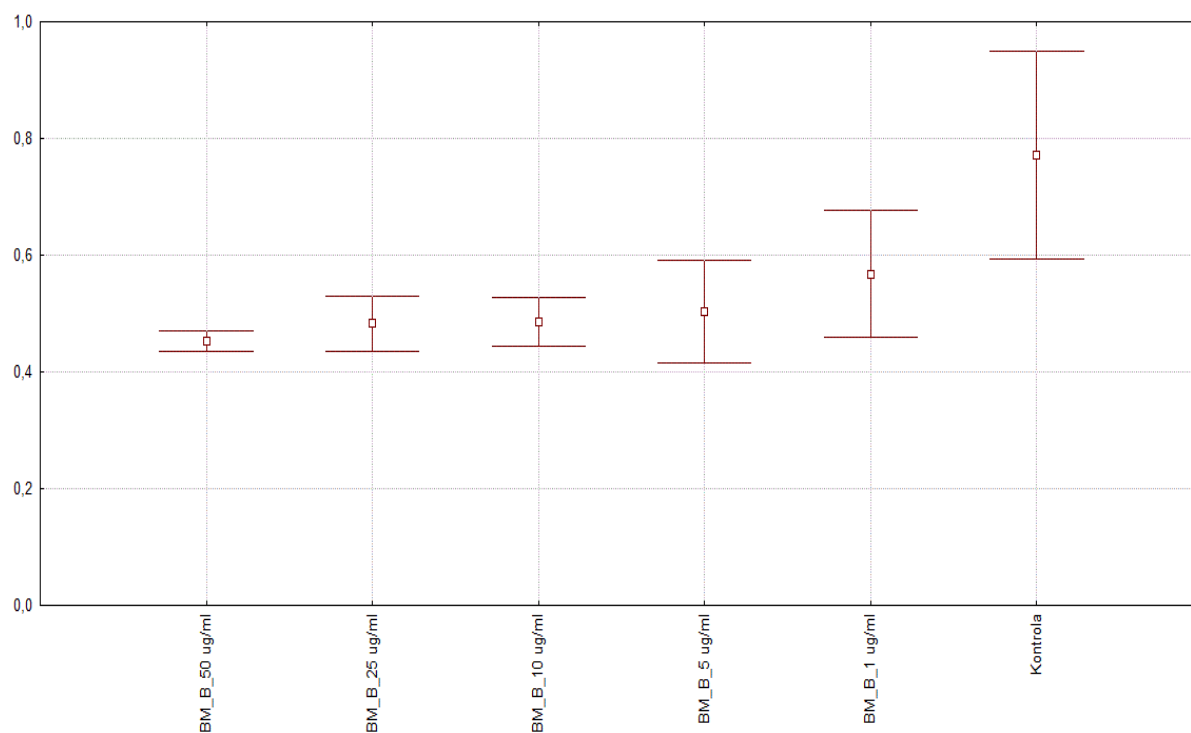


Tab. 11. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Burgundy modré na buňky HepG2 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Burgunda modrá bobule	50 ug/ml	0,4526	0,0192**
	25 ug/ml	0,4835	0,0498**
	10 ug/ml	0,4862	0,0447**
	5 ug/ml	0,5030	0,0923**
	1 ug/ml	0,5673	0,1146**
Kontrola		0,7717	0,1866*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 8. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Burgundy modré na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance

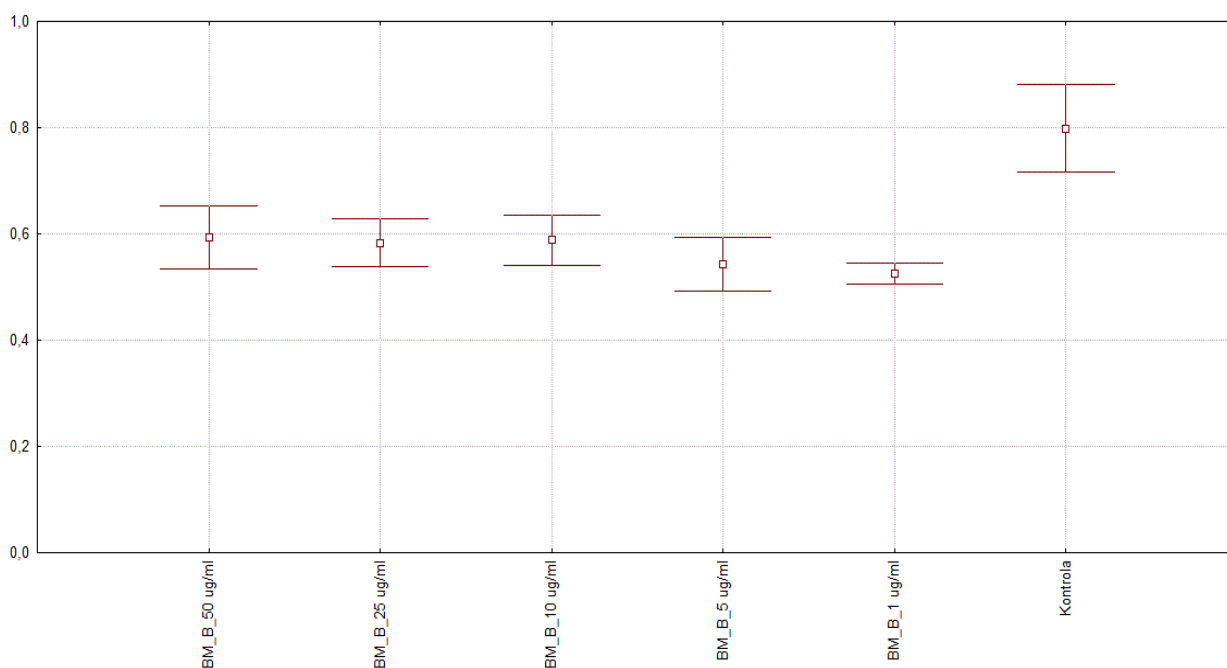


Tab. 12. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Burgundy modré na buňky NIH3T3 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Burgunda modrá bobule	50 ug/ml	0,5937	0,0625**
	25 ug/ml	0,5834	0,0475**
	10 ug/ml	0,5886	0,0501**
	5 ug/ml	0,5433	0,0532**
	1 ug/ml	0,5263	0,0209**
Kontrola		0,7989	0,0857*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 9. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Burgundy modré na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance



7.3 Vliv extraktů ze slupek Burgundy modré

Grafy vlivu polyfenolů extrahovaných ze slupek Burgundy modré na buněčné linie HaCaT (Graf 10.), HepG2 (Graf 11.) a NIH 3T3 (Graf 12.) ukazují absorbanci MTT vyjadřující počet buněk, v porovnání s kontrolním měřením, na kterém je vidět volný růst buněk. Míra absorbance zároveň vyjadřuje míru proliferace. Byly použity koncentrace extraktů 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$. V grafu je vždy kontrolní měření, bez přidavku extrak-

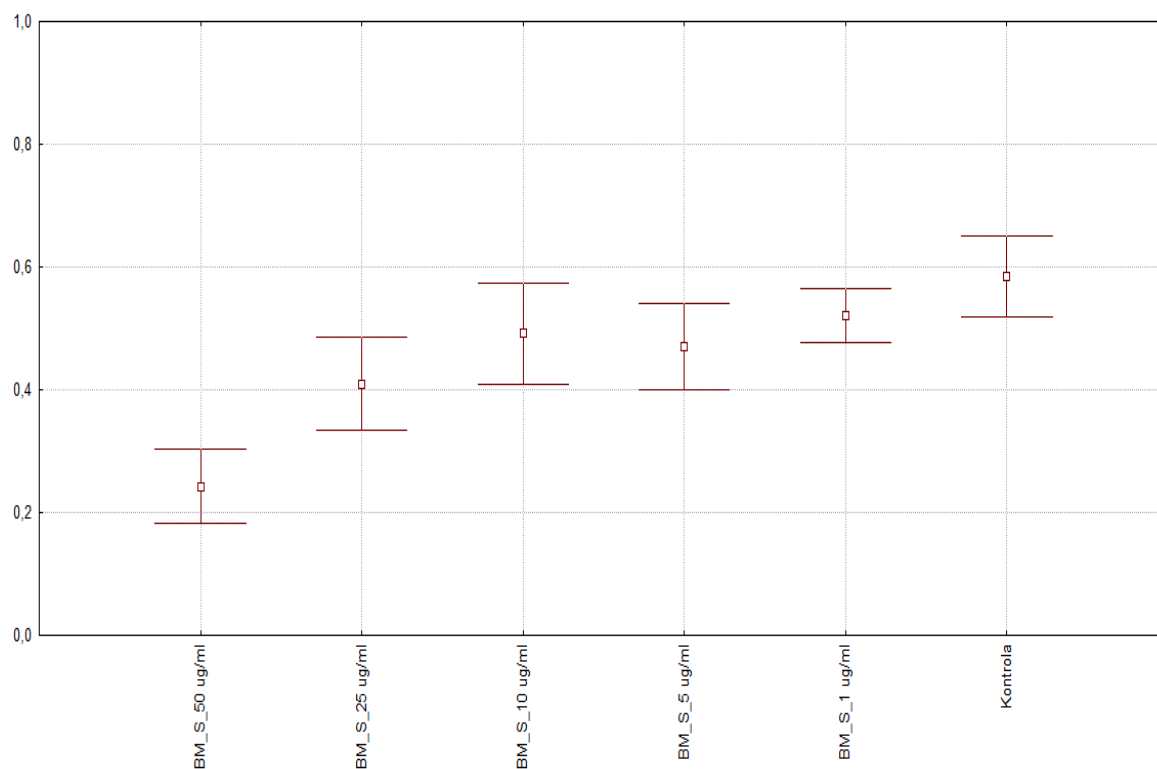
tu. V měření pro HaCaT je zaznamenána zvyšující se míra proliferace, v závislosti na snižující se koncentraci extraktů polyfenolů. Nejnižší koncentrace - 1 µg/ml má tedy i nejmenší antiproliferační účinek na linii keratinocytů. Zato extrakt o koncentraci 50 µg/ml ze slupek Burgundy modré má nejvyšší antiproliferační účinek z doposud znázorněných výsledků na linii HaCaT. Hodnota absorbance u této koncentrace klesla na 0,25. U výše zobrazených výsledků účinků na tuto linii míra proliferace zatím nedosáhla tak nízké hodnoty. Podobný efekt měla tato a koncentrace 25 µg/ml ze slupek Burgundy modré na linii hepatocytů, hodnoty absorbance byly téměř totožné – 0,28 a 0,29. Čím větší byla koncentrace polyfenolů, tím více se zvyšoval antiproliferační účinek. Jinak je tomu ale u výsledků působení 10, 5 a 1 µg/ml extraktu. Tyto koncentrace nenabývaly statisticky významného rozdílu, působí tedy neefektivně na linii hepatocytů. Poslední graf znázorňuje účinek vinného extraktu ze slupek Burgundy modré na NIH 3T3. Hodnota absorbance u všech koncentrací byla opět ve velmi malém rozmezí od 0,58-0,59 a u všech výsledků byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Jak bylo již zmíněno výše, myší fibroblasty jsou stejně odolné všem použitým koncentracím.

Tab. 13. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Burgundy modré na buňky HaCaT pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Burgunda modrá slupky	50 ug/ml	0,2428	0,0629**
	25 ug/ml	0,4100	0,0792**
	10 ug/ml	0,4915	0,0861**
	5 ug/ml	0,4700	0,0735**
	1 ug/ml	0,5207	0,0455**
Kontrola		0,5846	0,0698*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 10. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Burgundy modré na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance

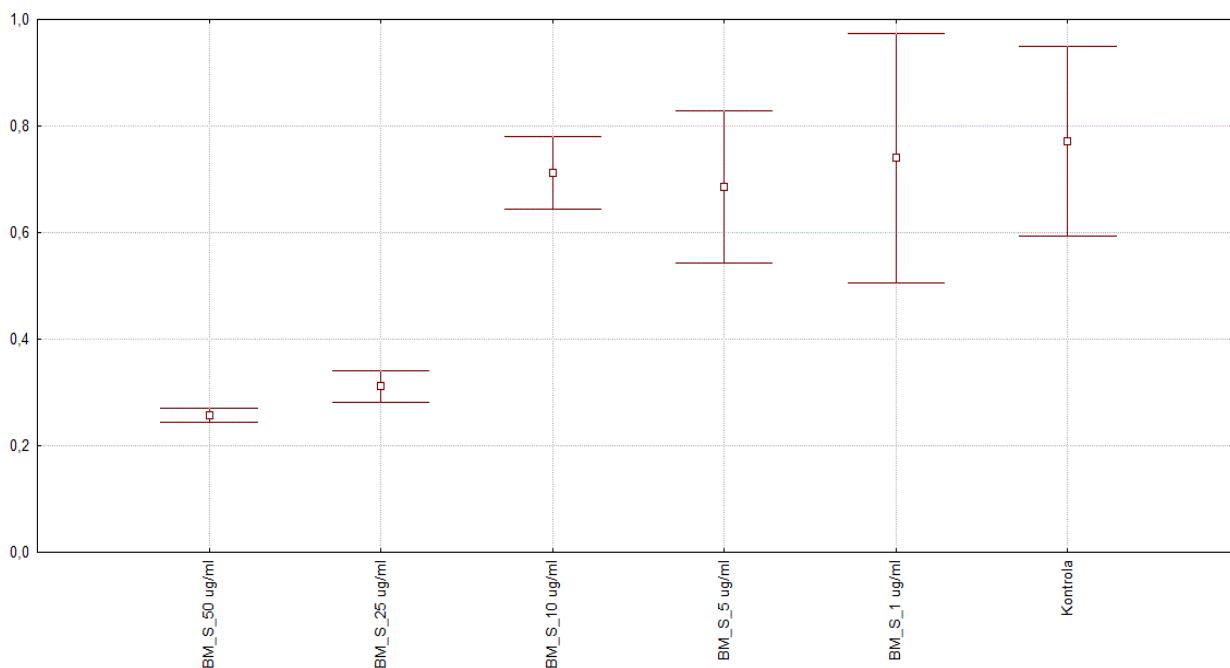


Tab. 14. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Burgundy modré na buňky HepG2 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Burgunda modrá slupky	50 ug/ml	0,2574	0,0140**
	25 ug/ml	0,3120	0,0312**
	10 ug/ml	0,7118	0,0721**
	5 ug/ml	0,6861	0,1506*
	1 ug/ml	0,7398	0,2469*
Kontrola		0,7717	0,1866*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*,**)

Graf 11. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Burgundy modré na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance

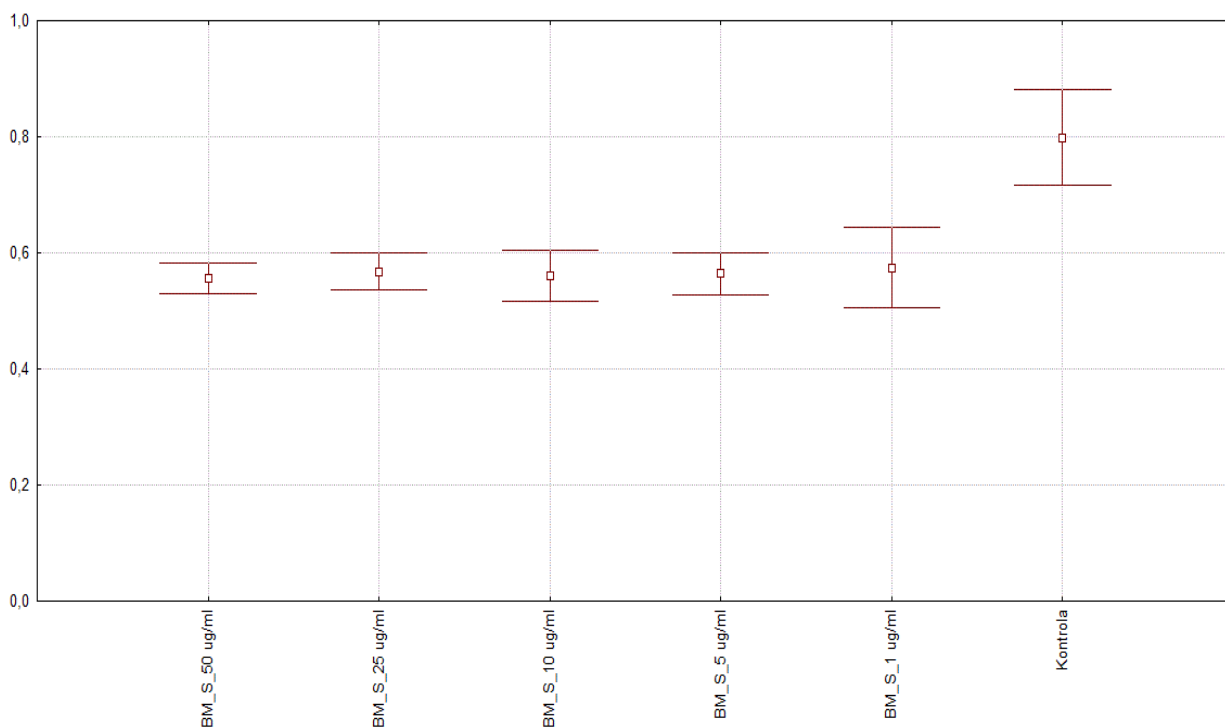


Tab. 15. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Burgundy modré na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Burgunda modrá slupky	50 ug/ml	0,5564	0,0277**
	25 ug/ml	0,5673	0,0336**
	10 ug/ml	0,5608	0,0455**
	5 ug/ml	0,5639	0,0373**
	1 ug/ml	0,5740	0,0730**
Kontrola		0,7989	0,0857*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*,**)

Graf 12. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Burgundy modré na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance



7.4 Vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Burgundy modré

Následující výsledky (Graf 13 – Graf 14.) zobrazují vliv extraktů polyfenolů pocházejících z pozdního sběru Burgundy modré na buněčné linie keratinocytů, hepatocytů a fibroblastů. Absorbance u koncentrací 50, 25, 10 a 1 µg/ml z grafu 13., který znázorňuje účinek extraktu z pozdního sběru na linii HaCaT, se nachází v téměř stejné rovině, a to od 0,37 do 0,39. U měření 5 µg/ml se hodnota snížila na 0,3, ale směrodatná odchylka byla vysoká, což bylo způsobeno velkou variabilitou mezi měřeními. U všech výsledků byl prokázán statisticky významný rozdíl. Graf 14. ukazuje výsledky měření pro HepG2. Nejefektivnější antiproliferační účinek byl u nejvyšší koncentrace 50 µg/ml kdy absorbance klesla na hodnotu 0,3. Výsledky pro 25, 10 a 5 µg/ml byly velmi podobné, hodnoty absorbance se pohybovaly v rozmezí od 0,5 do 0,58, antiproliferační účinek tedy oproti předešlé koncentraci zdaleka nedosáhl takového efektu. U koncentrace 1 µg/ml nebyl prokázán statisticky významný rozdíl, nízká koncentrace tedy neovlivnila buněčnou linii hepatocytů. Graf 15. znázorňuje míru proliferace buněčné linie myších fibroblastů ovlivněnou koncentracemi extraktů z pozdního sběru Burgundy modré. Koncentrace 50 až 1 µg/ml se podobně jako u předchozích grafů zobrazujících účinky extraktů na tuto linii pohybovaly okolo absorbance 0,6. V případě koncentrace 10 µg/ml došlo k patrnému snížení proliferace, toto bylo zřejmě

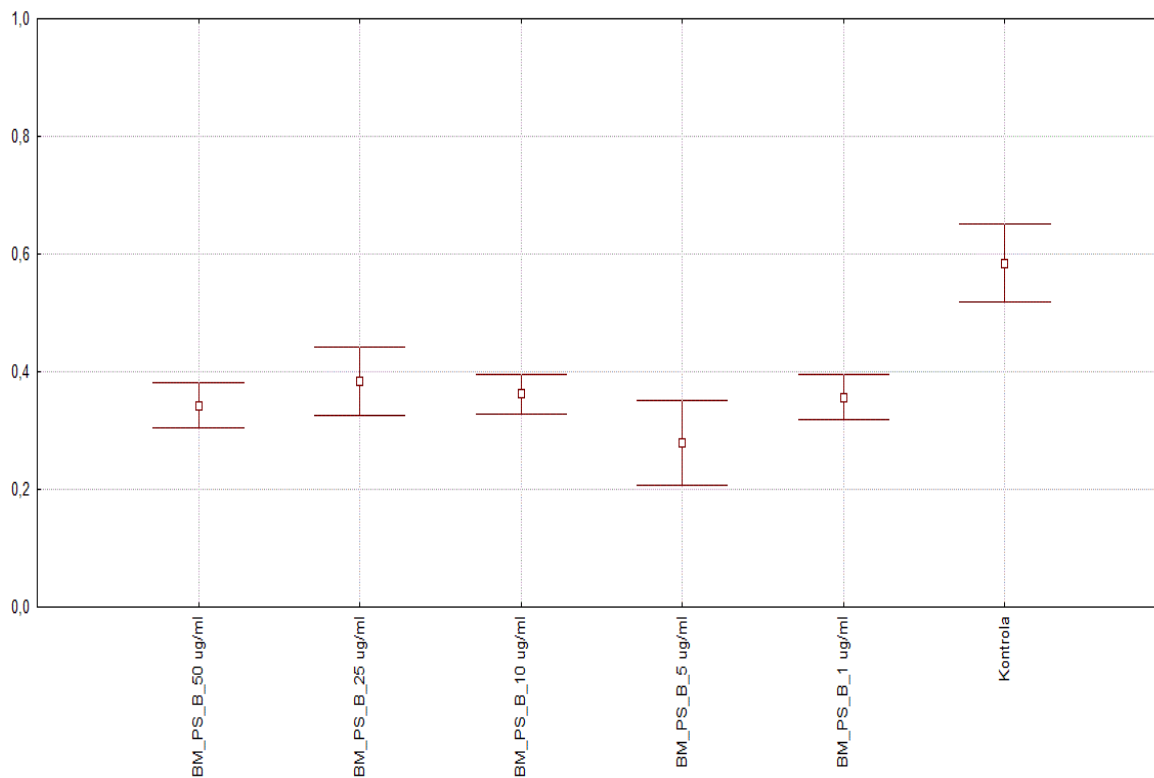
způsobeno zastoupením určitého polyfenolu, který právě při této koncentraci působil více inhibičně.

Tab. 16. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Burgundy modré na buňky HaCaT pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Burgunda modrá pozdní sběr	50 ug/ml	0,3429	0,0404**
	25 ug/ml	0,3839	0,0615**
	10 ug/ml	0,3623	0,0350**
	5 ug/ml	0,2798	0,0754**
	1 ug/ml	0,3572	0,0396**
Kontrola		0,5846	0,0698*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*,**)

Graf 13. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Burgundy modré na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance

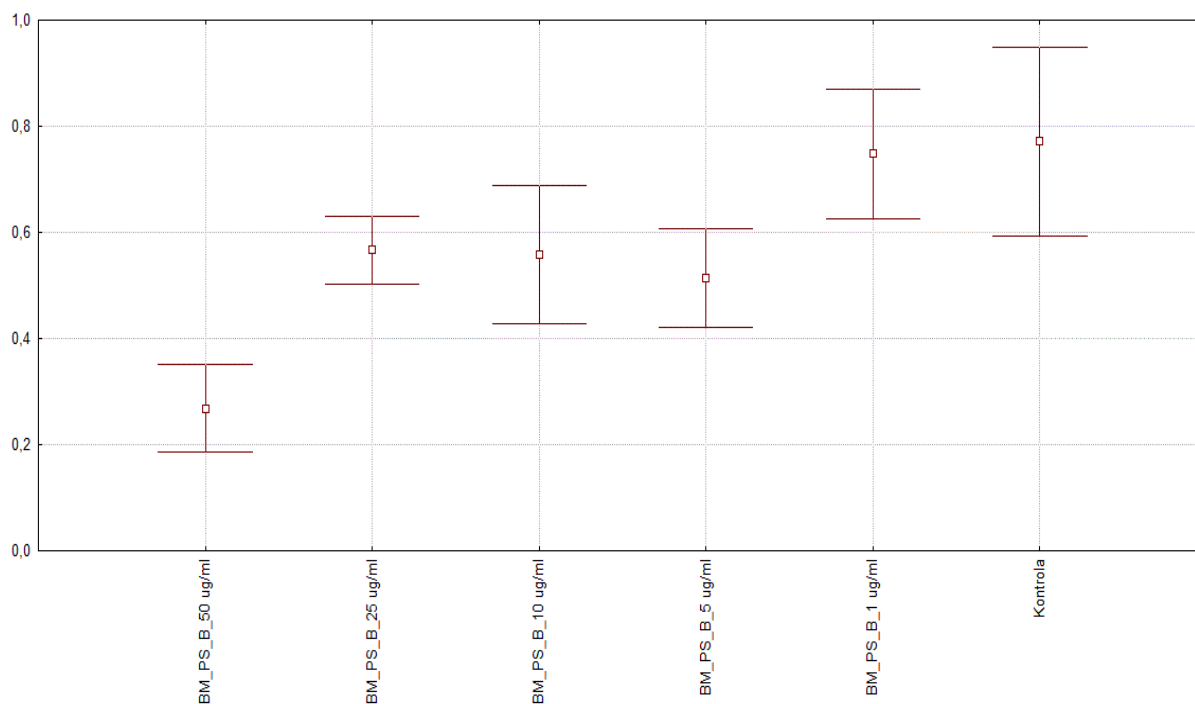


Tab. 17. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Burgundy modré na buňky HepG2 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Burgunda modrá pozdní sběr	50 ug/ml	0,2688	0,0861**
	25 ug/ml	0,5670	0,0677**
	10 ug/ml	0,5575	0,1369**
	5 ug/ml	0,5141	0,0987**
	1 ug/ml	0,7482	0,1289*
Kontrola		0,7717	0,1866*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 14. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Burgundy modré na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance

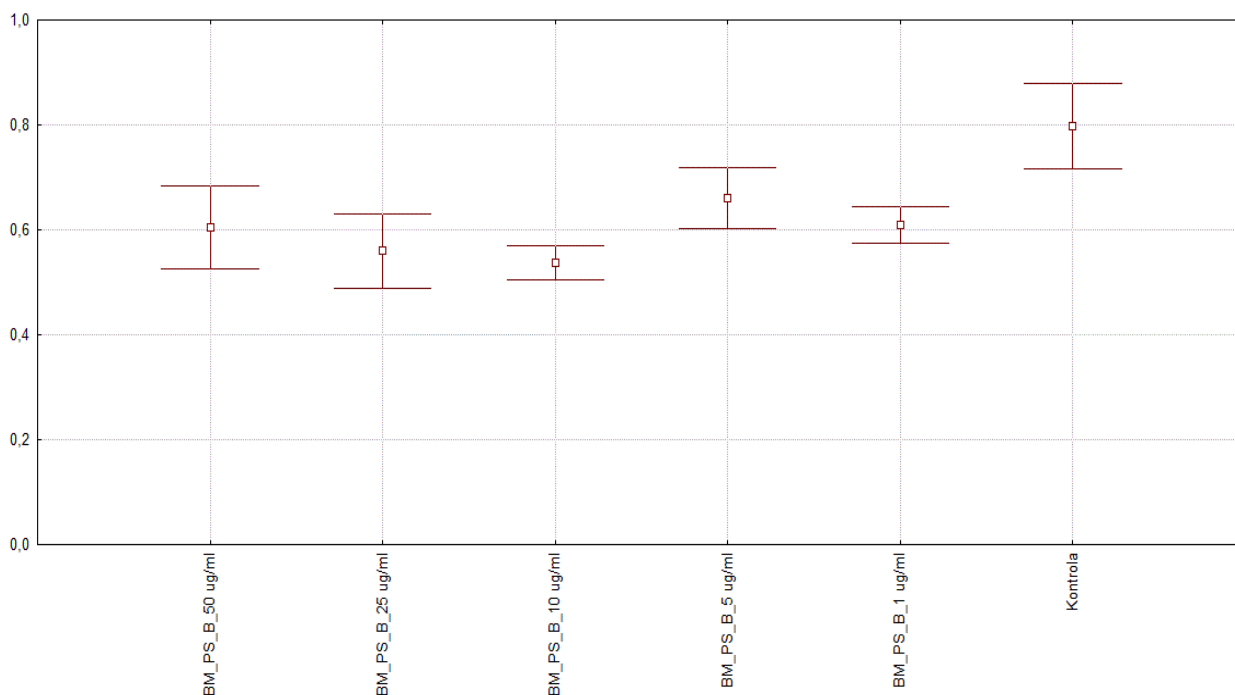


Tab. 18. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Burgundy modré na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Burgunda modrá pozdní sběr	50 ug/ml	0,6047	0,0839**
	25 ug/ml	0,5598	0,0743**
	10 ug/ml	0,5377	0,0335**
	5 ug/ml	0,6607	0,0618**
	1 ug/ml	0,6098	0,0362**
Kontrola		0,7989	0,0857*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 15. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Burgundy modré na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance



7.5 Vliv extraktů ze slupek Frankovky

Grafy 16 – 18. poukazují na vliv extraktů polyfenolů získaných ze slupek Frankovky na buněčné linie HaCaT, HepG2 a NIH 3T3. Výsledky u koncentrací 50 a 25 ug/ml pro linii keratinocytů, které znázorňuje graf 16. udávají, že se zvyšující se koncentrací se zvyšuje i antiproliferační účinek. V případě měření koncentrace 10 ug/ml dochází oproti ostat-

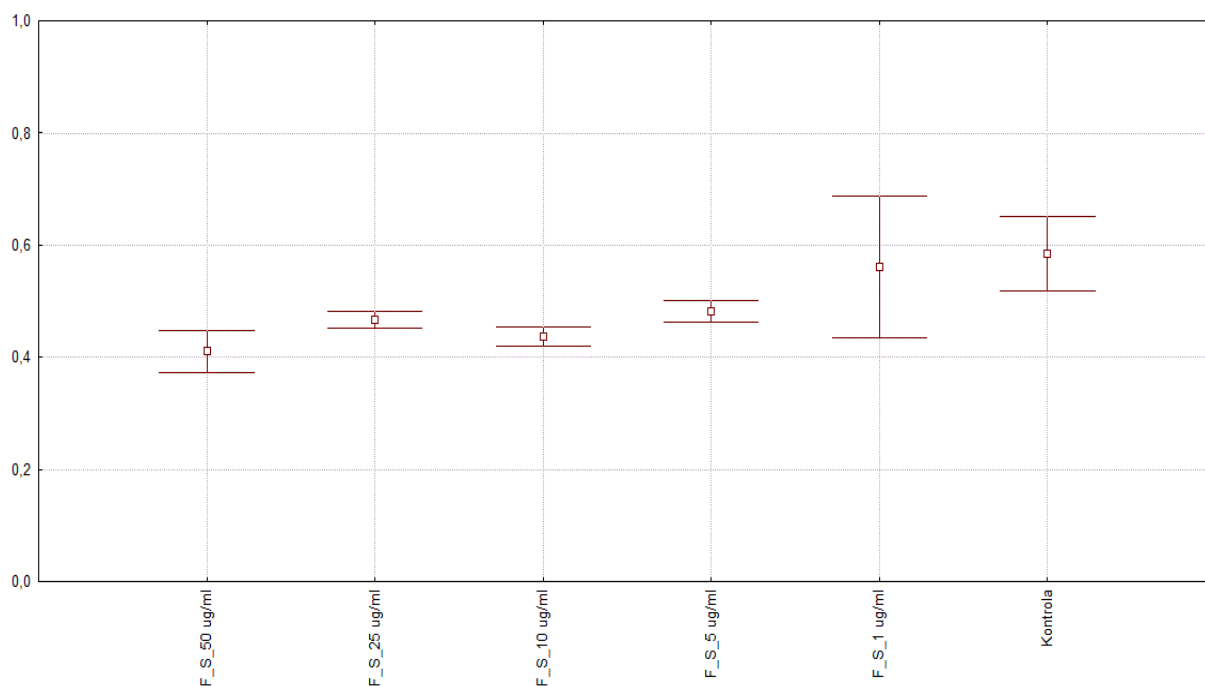
ním výsledkům k mírnému poklesu proliferace. Může to být způsobeno změnou mechanismu určitého polyfenolu, který na buňky v dané koncentraci působí více inhibičně. Výsledky působení extraktu na buněčnou linii HepG2, znázorněné v grafu 17. ukazují nejvyšší antiproliferační účinek u koncentrace 5 a 10 ug/ml s nejmenší variabilitou směrodatných odchylek, tudíž jsou průměrné hodnoty velmi přesné. U koncentrace 25 a 50 ug/ml dochází ke zvýšení proliferace, a u těchto výsledků byly také velké směrodatné odchylky. Výsledná průměrná absorbance je tedy méně přesná. Poslední koncentrace 1 ug/ml již nebyla efektivní, nebyl u ní prokázán statisticky významný rozdíl. Graf 18., který ukazuje výsledky účinků extraktů ze slupek Frankovky na linii NIH 3T3 udává, že každá koncentrace má velmi podobný snížený antiproliferační účinek, přičemž se hodnota absorbance opět pohybuje v malém rozmezí, a to od 0,53 do 0,6.

Tab. 19. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Frankovky na buňky HaCaT pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Frankovka slupky	50 ug/ml	0,4104	0,0402**
	25 ug/ml	0,4663	0,0162**
	10 ug/ml	0,4367	0,0180**
	5 ug/ml	0,4816	0,0206**
	1 ug/ml	0,5611	0,1330*
Kontrola		0,5846	0,0698*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*,**)

Graf 16. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Frankovky na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance

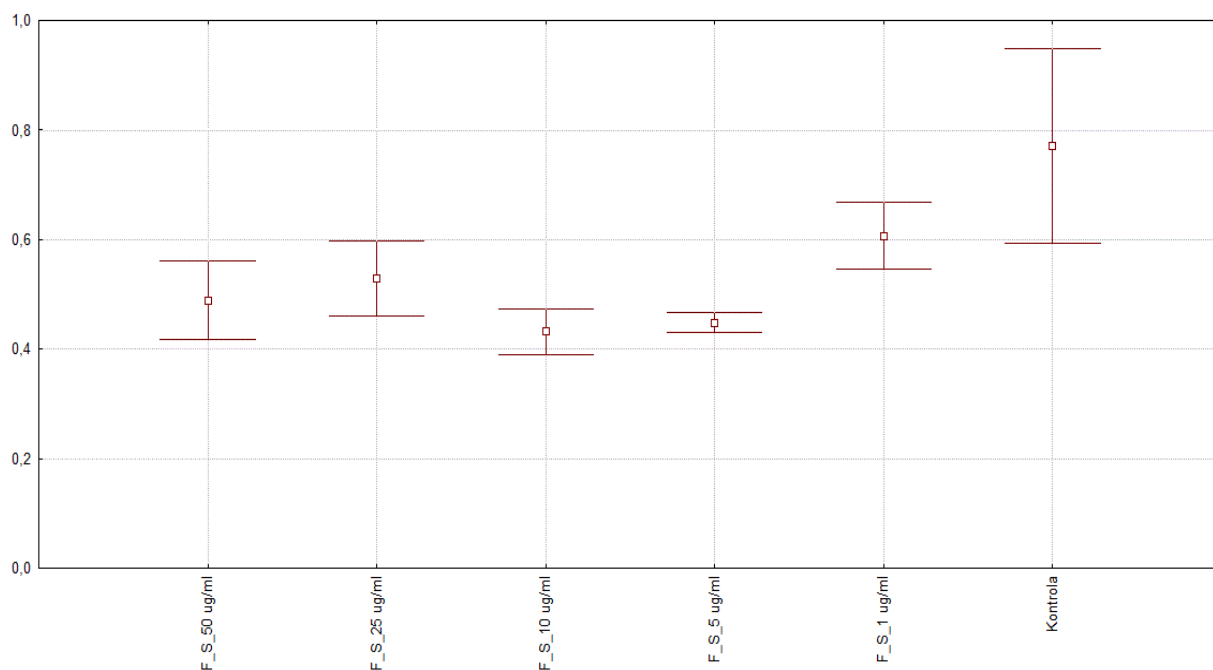


Tab. 20. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Frankovky na buňky HepG2 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Frankovka slupky	50 ug/ml	0,4888	0,0758**
	25 ug/ml	0,5290	0,0724**
	10 ug/ml	0,4318	0,0437**
	5 ug/ml	0,4485	0,0190**
	1 ug/ml	0,6068	0,0638*
Kontrola		0,7717	0,1866*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 17. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Frankovky na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance

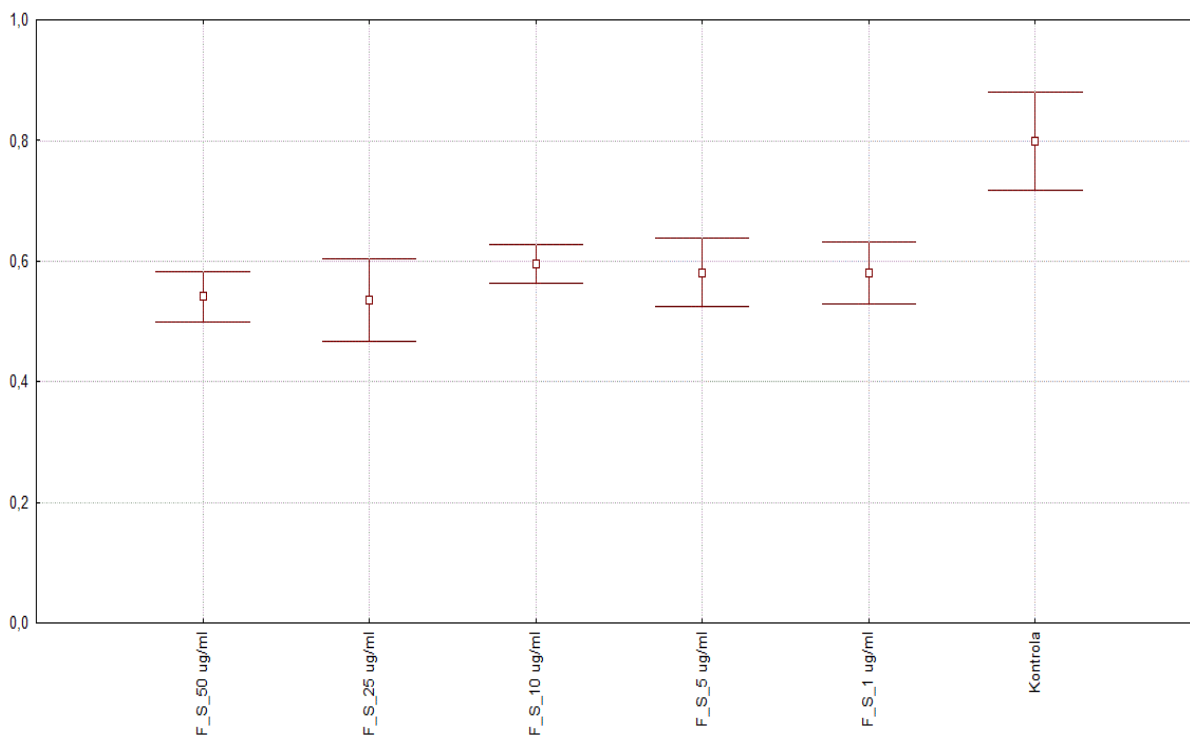


Tab. 21. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Frankovky na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Frankovka slupky	50 ug/ml	0,5411	0,0443**
	25 ug/ml	0,5346	0,0723**
	10 ug/ml	0,5955	0,0333**
	5 ug/ml	0,5813	0,0602**
	1 ug/ml	0,5804	0,0546**
Kontrola		0,7989	0,0857*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 18. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Frankovky na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance



7.6 Vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Frankovky

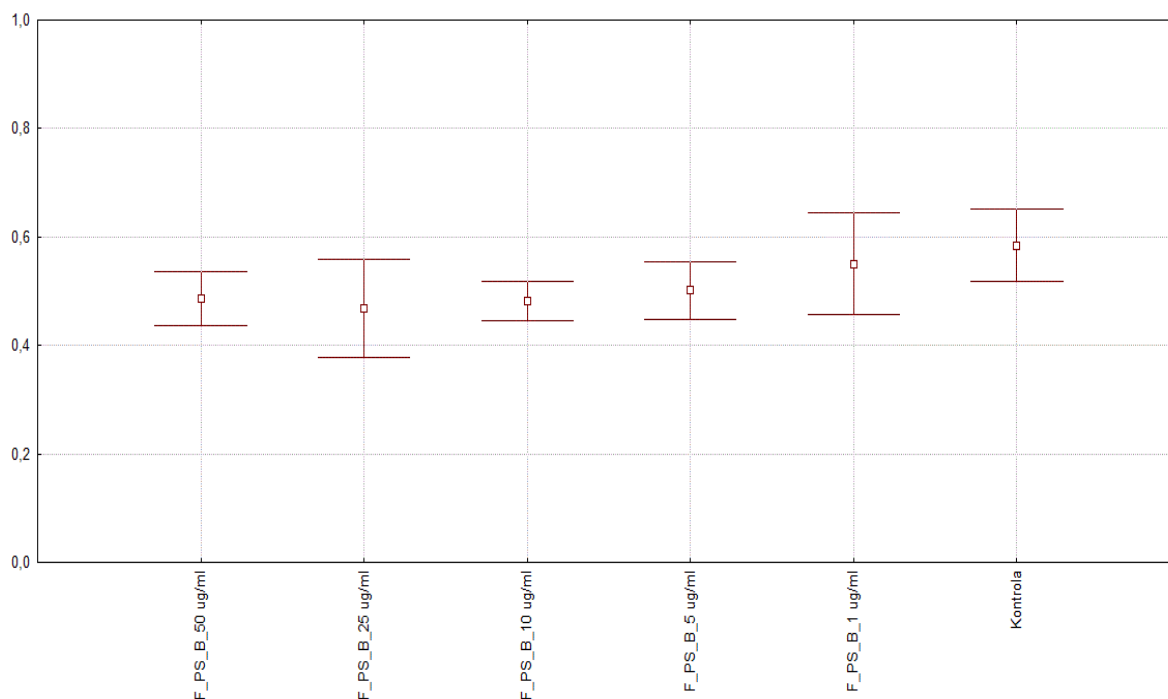
Následující výsledky (Graf 19. – Graf 21.) zobrazují vliv extraktů polyfenolů pocházejících z bobulí pozdního sběru Frankovky na buněčné linie keratinocytů, hepatocytů a fibroblastů. Graf 19., znázorňující působení extraktů na linii HaCaT udává, že se zvyšující se koncentrací se zvyšuje antiproliferační efekt. Účinek je oproti předchozím výsledkům stejné linie nižší, a u koncentrací 5, 10, 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ můžeme pozorovat jen velmi malé zvýšení, v závislosti na rozdílných koncentracích. Koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ byla již neefektivní, jednalo se o statisticky nevýznamné měření, při kterém již nedocházelo k ovlivnění buněčného růstu. Z grafu 20., který znázorňuje účinek linie HepG2 je zřejmé, že efektivní byla pouze nejvyšší koncentrace polyfenolických extraktů a to 50 $\mu\text{g/ml}$, u které byl taky jako u jediné z toho měření zjištěn statisticky významný rozdíl. U koncentrací 25 až 1 $\mu\text{g/ml}$ již nedocházelo k ovlivnění buněčného růstu, tudíž můžeme říci, že extrakt z bobulí pozdního sběru Frankovky je v nižších koncentracích pro potlačení HepG2 neefektivní. Vliv extraktů polyfenolů na buněčnou linii NIH 3T3 je zaznamenán v grafu 21. Tento, podobně jako předchozí výsledky stejné linie zobrazuje téměř rovnou křivku průměrů absorbance, opět pohybujících se kolem hodnoty 0,6. U všech koncentrací byl zjištěn statisticky významný rozdíl.

Tab. 22. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Frankovky na buňky HaCaT pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Frankovka slupky	50 ug/ml	0,4861	0,0519**
	25 ug/ml	0,4686	0,0962**
	10 ug/ml	0,4821	0,0382**
	5 ug/ml	0,5014	0,0570**
	1 ug/ml	0,5508	0,0991*
Kontrola		0,5846	0,0698*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 19. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Frankovky na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance

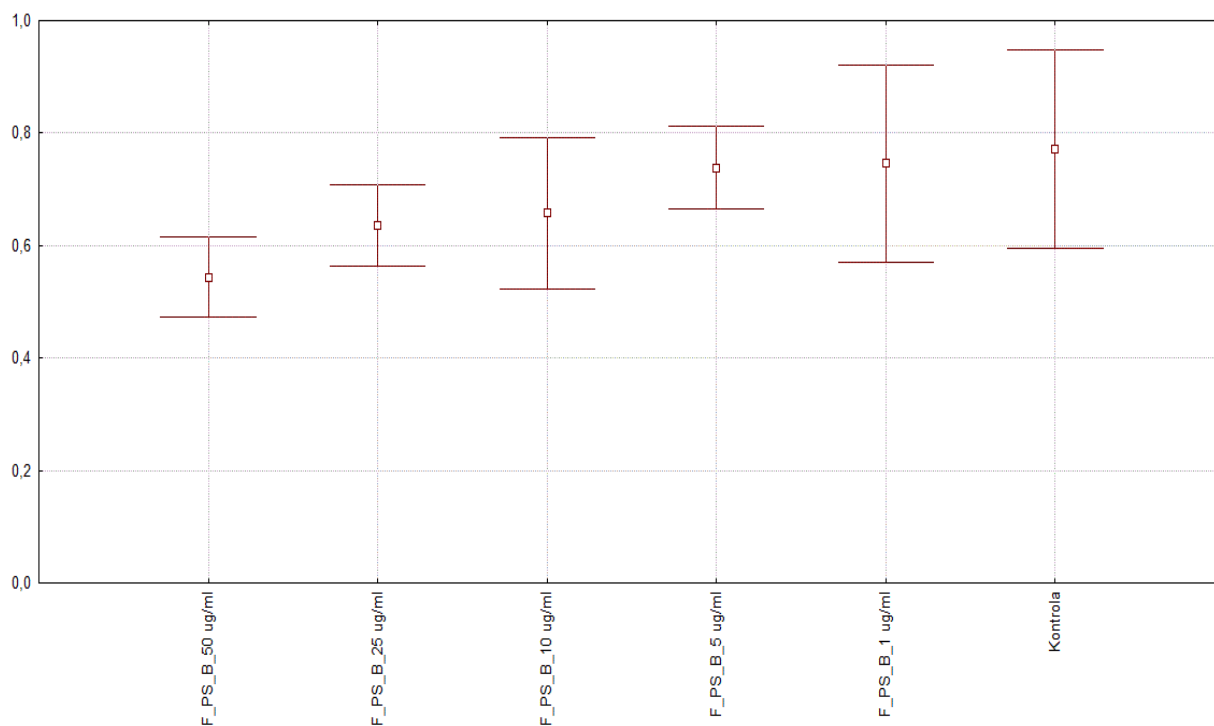


Tab. 23. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Frankovky na buňky HepG2 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Frankovka pozdní sběr	50 ug/ml	0,5443	0,0753**
	25 ug/ml	0,6360	0,0763**
	10 ug/ml	0,6583	0,1416*
	5 ug/ml	0,7388	0,0773*
	1 ug/ml	0,7459	0,1855*
Kontrola		0,7717	0,1866*

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 20. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Frankovky na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance

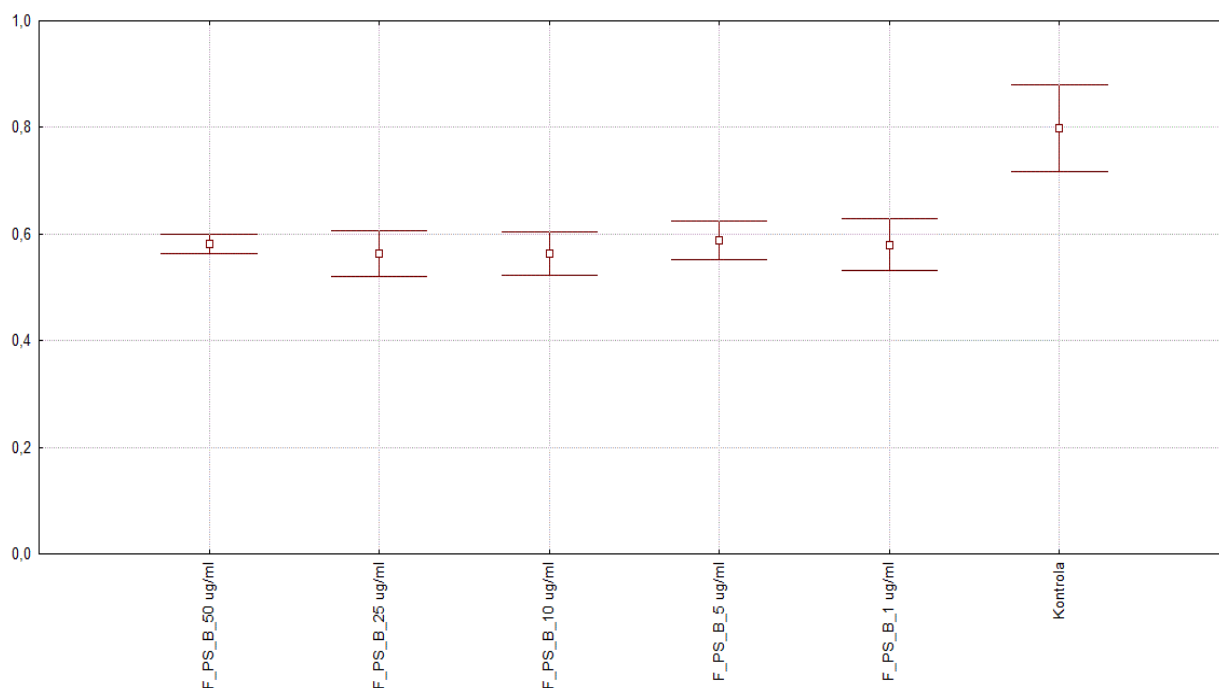


Tab. 24. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Frankovky na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu

Odrůda	Koncentrace	Průměr	Směr.odchylka
Frankovka pozdní sběr	50 ug/ml	0,5813	0,0193**
	25 ug/ml	0,5637	0,0458**
	10 ug/ml	0,5632	0,0435**
	5 ug/ml	0,5887	0,0376**
	1 ug/ml	0,5801	0,0519**
Kontrola		0,7989	0,0857**

Pozn.: Hodnoty lišící se v horních indexech zobrazují hladinu významnosti $P < 0,05$ (*, **)

Graf 21. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Frankovky na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance



7.7 Diskuze

V následující kapitole byl sledován vliv extraktů obsahujících polyfenolické látky, které byly získány ze tří různých odrůd révy vinné a to jak z bobulí, tak i ze slupek, na tři nádorové linie. Pro extrakci látek (která ale nebyla součástí mé diplomové práce, extrakty byly předem připraveny), byly použity z červených vín slupky, bobule a bobule pozdního sběru odrůdy Burgundy modré a Frankovka. Zástupcem bílých vín byl Muškát moravský, ze kterého byly použity slupky a bobule. Z každého vzorku bylo naředěno pět extraktů o různé koncentraci (50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml a 1 µg/ml), které jsme následně nechali působit na buněčné linie keratinocytů (HaCaT), hepatocytů (HepG2) a fibroblastů (NIH 3T3).

Na buněčnou linii HaCaT byl zaznamenán největší antiproliferační účinek v případě extraktu ze slupek Burgundy modré a Muškátu moravského při koncentraci 50 µg/ml. Jinak tomu ale bylo u použití extraktů z bobulí a bobulí pozdního sběru Burgundy modré kdy byla největší antiproliferační aktivita zaznamenána u nejnižších koncentrací 1 a 5 µg/ml. Při působení extraktů ze slupek a z bobulí pozdního sběru Frankovky nebyla u této linie zaznamenána rapidně se zvyšující nebo snižující se antiproliferační aktivita. Na buněčnou linii HepG2 byl zaznamenán největší antiproliferační účinek extraktů ze slupek, bobulí a bobulí pozdního sběru odrůd Muškát moravský a Burgunda modrá a v případě bobulí pozdního sběru Frankovky u nejvyšších použitých koncentrací 50 a 25 µg/ml. Vyjímkou byla nízká koncentrace 5µg/ml při působení extraktu ze slupek Frankovky, kdy byl dosažen antiproliferační účinek na tuto linii nejvyšší. U buněčné linie NIH 3T3 byla téměř u všech extraktů a koncentrací míra proliferace stejná. Nebylo zaznamenáno její rapidní zvýšení, snižující se proliferace je patrná jen u koncentrací 1 a 5 µg/ml v případě extraktu z bobulí Burgundy modré. Nelze tedy říci, že nejvyšší koncentrace je nejúčinnější, rozhodující je obsah polyfenolických látek v extraktu, protože ze slupek a bobulí získáme extrakty s rozdílným zastoupením dílčích polyfenolů ve směsi.

Vliv polyfenolů na různé druhy rakovinové tkáně byl již v minulosti součástí mnoha studií. Různé protektivní účinky polyfenolů chránící před vznikem a rozvojem nádorového onemocnění byly prokázány na různých modelech *in vitro* i *in vivo*. Antiproliferačním účinkem polyfenolických sloučenin se zabýval např. Juranic [2005]. Směs polyfenolů z malin byla testována na maligní linii buněk karcinomu kolonu LS174 a u mononukleárních buněk imunitního systému. Za přítomnosti extraktu se významně snížil počet nádorových buněk oproti stejným buňkám v kultivačním médiu. Antiproliferační vlastnosti na nádorové buňky přímo úměrně závisely na obsahu kyseliny ellagové v extraktu. U aktivovaných

buněk imunitního systému se neprojevil antiproliferativní efekt extraktů až do značně vysokých koncentrací (67%). Další výzkum provedl Shoene a kolektiv [2005], ve kterém byly buňkové linie vystaveny polyfenolickým extraktům ze skořice. Skořicový extrakt vykazoval antiproliferativní vlastnosti u tří rozdílných buněčných linií, což se projevilo snížením počtu buněk. Extrakt navíc snižoval množství buněk ve fázi G0/G1 ve prospěch ostatních fází buněčného cyklu. Řada polyfenolických látek navozuje u buněk stav nazývaný jako „cell cycle arrest“ (CCA). Jedná se o blok klíčových kroků buněčného cyklu, z čehož plyne neschopnost buňky vstupovat do ostatních fází buněčného cyklu a tím i neschopnost mitózy. Blok nastává většinou ve fázi G0 a buňka není schopna vstupovat do fáze G1. Kromě již zmíněného extraktu ze skořice má stejný účinek delphinidin a jiné polyfenoly [CHEN *et al* 2004].

Za vyšší antiproliferační aktivitu, pozorovanou při působení extraktů ze slupek červených vín zodpovídá nejspíše resveratrol, jehož obsah je vyšší ve vínech červených než bílých, což souvisí s technologií výroby červeného vína, v němž jsou vyluhovány slupky hroznů, kde se resveratrol a další polyfenoly vyskytují především. Vlivem resveratrolu a navozením apoptózy se zabývala studie provedená Mertens-Talcottovou a kolektivem. Konkrétně se jednalo o interakce resveratrolu, kvercetinu a kyseliny ellagové a jejich vliv na leukemické buňky. Buňky inkubované pouze s resveratrolem a kvercetinem vykazovaly sníženou životaschopnost, přičemž resveratrol byl účinnější. Kyselina ellagová v použité koncentraci však nevykazovala žádné účinky. V kombinaci všech tří polyfenolů bylo možné pozorovat aditivní povahu interakce [MERTENS-TALCOTT *et. al.*, 2005].

Zástupcem bílých vín byl Muškát moravský. Bílá odrůda byla v případě extraktů z bobulí účinnější při nižších koncentracích, což potvrzuje i studie, kterou provedl Stratil a kolektiv [2008], který určil několik rozdílů mezi antioxidační aktivitou bílých a červených vín a ve srovnání s ostatními, stanovil nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity pro bílá a sherry vína. Naopak u studií červených vín se názory shodují na faktu, že fyziologické účinky mohou být dosažitelné až v koncentracích, které se běžně nekonzumují (> 2g/den za předpokladu 50 kg tělesné hmotnosti) [FERNÁNDEZ-PACHÓN, 2006].

Fakt, že polyfenolické látky obsažené ve víně mají vliv na nádorové linie potvrzuje i studie, kterou provedl Kim a spol. [2006], kteří prokázali řadou molekulárních metod sledování účinků polyfenolů obsažených ve víně na buněčné linii karcinomu tlustého střeva SNU-C4, že tyto látky v koncentraci 100 mikrogramů/ml podporují funkci proapoptického genu bax a kaspázy 3, zatímco vliv antiapoptického genu bcl-2 je jimi blokován. Do-

chází k tomu při koncentracích 100 mikrogram/ml, což jsou dávky dosažitelné i při umírněné konzumaci vína. Wolter a spol. [2004] sledovali zejména účinky trans-resveratrolu ve vztahu k přenosu některých klíčových signálů v buňkách. Opět na modelech kolorektálních karcinomů zjistili snížení exprese některých proto-onkogenů, snížení aktivity různých proteinových kináz a také pokles aktivity ornithin dekarboxylázy, která je klíčovým enzymem v syntéze polyaminů. Je již dlouho známo, že polyaminy hrají nepříznivou roli ve vzniku i růstu nádorů.

Také práce W. M.Schoonena z Hutchinsonova ústavu pro výzkum rakoviny v Seattlu, srovnávající pití alkoholických nápojů ve skupinách 753 pacientů s rakovinou prostaty a 703 zdravých mužů přinesla závěr, že při hodnocení týdenních dávek pravidelně vypitého červeného vína vedly tyto k redukci rizika rakoviny prostaty o 6 %. Přínos bioaktivních polyfenolických látek obsažených ve víně tedy pravděpodobně značně převyšuje potenciální riziko dávek alkoholu umírněně pitého vína.

Uvedené novější experimentální poznatky se samozřejmě netýkají již pouze vlivu vína jako směsi látek v jednom nápoji, ale zejména farmakologických možností z něj extrahovaných látek, kde metodickou nutností je popis účinku ve vztahu k přesně stanoveným dávkám. Různost koncentrací sledovaných látek ve víně podle odrůdy révy, místa produkce i způsobu zpracování a dosavadní absence metodik jejich stanovování, jak je již běžné u koncentrace alkoholu, je zatím překážkou organizace klinických studií a tudíž i efektivnějšího praktického využití. Mechanismus účinku jednotlivých polyfenolů závisí ve většině případů na jejich chemické struktuře, která je velmi různorodá, a proto i možnost, jakými polyfenoly chrání organismus před vznikem nádorů, je několik. Na základě množství protektivních vlastností a směsí polyfenolů zastoupených ve stravě, lze vyslovit domněnku, že jejich působení proti karcinogenezi má nejspíš komplexní charakter složený z příspěvků jednotlivých látek

8 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo popsat vliv polyfenolů extrahovaných z různých odrůd révy vinné na buňččné linie. Extrakty z vín byly naředěny v kultivačním médiu k získání roztoků s koncentracemi 50, 25, 10, 5 a 1 $\mu\text{g/ml}$, které následně působily na tři druhy buněčných linií. K posouzení antiproliferační aktivity byl použit MTT test. Byly použity tři odrůdy vína. Burgunda modrá a Frankovka byly zástupci červených vín, bílou odrůdu zastoupil Muškát moravský. Byly také porovnávány rozdíly mezi účinkem polyfenolů z celých bobulí a ze slupek jednotlivých odrůd. Vliv těchto polyfenolů byl testován na třech buněčných kulturách HaCaT, HepG2 a NIH 3T3.

Jelikož jsem nestanovovala celkový obsah polyfenolů, ale jen účinky různě koncentrovaných extraktů, mohu tedy pouze porovnat působení odrůd na různé druhy linií. Všechny polyfenolické extrakty dosahovaly antiproliferačních účinků. Podle materiálu použitého k extrakci polyfenolů byly nejméně účinné bobule révy vinné, následně pozdní sběr hroznů a nejučinněji působily vzorky ze slupek vína. Většina extraktů působila na zmírnění proliferace od koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ a nejvíce pozitivních výsledků bylo zaznamenáno u koncentrace nejvyšší - 50 $\mu\text{g/ml}$. Při porovnání buněčných linií byla nejodolnější NIH 3T3, která u všech použitých extraktů (slupky, bobule) prokazovala téměř shodnou míru proliferace. HaCaT a HepG2 se dělí o druhé místo, přičemž obě linie byly méně odolné extraktům ze slupek. Z pohledu použité koncentrace polyfenolů vyšla jako nejučinnější odrůda Burgundy modré, jejíž extrakty významně působily již v malých koncentracích a také působily největší měrou, zejména extrakty z pozdního sběru. Druhý byl Muškát moravský, který již ale nedosáhl takového účinku. Frankovka proliferaci také ovlivnila, ale pouze v nejvyšších koncentracích a nepříliš významně. Tyto výsledky naznačují, že vinné extrakty mohou být použity pro léčbu a prevenci nádorových onemocnění.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADLERCREUTZ H.: Reproductive and Developmental Toxicology, An Med č. 29, str. 95-120, New York (1997).
- AHMAD N., MUKHTAR H.: Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications. Nutr Rev. č. 57, str. 78-83, (1999).
- ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J.: Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky., Esp. Pub. str. 630, Ústí nad Labem (2002), ISBN: 978-0-8153-2045-6.
- ALÉN-RUIZ, GARCÍA-FALCÓN M. S., PÉREZ-LAMELA M. C., MARTÍNEZ-CARBALLO E., SIMAL-GÁNDARA J.: Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. Food Chemistry č. 113, str. 53–60, (2009).
- ARIZA R. R., SERRANO A., PUEYO C.: DirectNacting mutagenic aktivty in white, rose, and red wines with the Ara test of Salmonella typhimurium. Environmental Molecular Mutagen č. 19, str. 14 - 20, (1992).
- AUST S. D., CHIGNELL C. F., BRAY T. M., KALYANARAMAN B., MASON R. P.: Free radicals in toxicology. Toxicology and Applied Pharmacology č. 120, str. 168–178, (1993).
- BALU M., SANGEETHA P., MURALI G., PANNEERSELVAM C.: Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. Brain Res. Bull. č. 68, str. 469–473 (2006).
- BARLASS M., MILLER R. M., DOUGLAS T. J.: Bioavailability of ferulic acid. American Journal of Enology and Viticulture č. 38, str. 65 (1987).
- BECKMAN C. H.: Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? Physiol. Mol. Plant Pathol. č. 57, str. 101, (2000).
- BENNETS H. W., UNDERWOOD E. J., SHIER F. L.: A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia. Aust. Vet. J. č. 22, str. 2, (1996).

- BOUKAMP B. A., VINKE I. C., SESHAN K., VRIES de K. J., BUGGRAAF A. J.: Influence of electrode geometry and NLLS fit analysis of I-V measurements in a three-electrode cell. *Solid State Ionics* č. 28-30, str. 1187-1191, (1988), ISBN 0167-2738.
- BRALLEY E. E., HARGROVE J. L., GREENSPAN P., HARTLE D. K.: Topical anti-inflammatory activities of vitis rotundifolia (Muscadine Grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. *J. Med. Food*. č. 10, str. 636–642, (2007).
- BROWN D. E., RASHOTTE A. M., MURPHY A. S., NORMANLY J., TAGUE B. W., PEER W. A., TAIZ L., MUDAY G. K.: Flavonoids act as Negative Regulators of Auxin Transport in Vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. č. 126, str. 524–535, (2001).
- BUER CH. S., MUDAY G. K.: The *transparent testa4* mutation prevents flavonoid synthesis and alter auxin transport and the response of *Aabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell*. č. 16, str. 1191–1205, (2004).
- BULL P., YANEZ L., NERVI F.: Mutagenic substances in red and white wine in Chile, a high risk area for gastrin cancer. *Mutat. Res*. č. 3, str. 113-117, (1987).
- CAI, Y. J., FANG, J. G., MA, L. P., YANG, L., LIU, Z. L. Inhibition of free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. *BiochimBiophys Acta* č. 1637, str. 31-38, (2003)
- CAO G., SOFIE E., PRIOR R. L.: Antioxidant and prooxidant behaviour flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med*. č. 5, str. 749-760, (1997).
- CASTILLA P., ECHARRI R., DAVALOS A., CERRATO F., ORTEGA H., TERUEL J. L., LUCAS M. F., GOMEZ-CORONADO D., ORTUNO J., LASUNCION M. A.: Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr*. č. 84, str. 252–262, (2006).
- CLIFFORD M. N.: Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric*. č. 80, str. 1033, (2000).
- CORNWELL T., COHICK W., RASKIN I.: Dietary phytoestrogens and health *Phytochemistry* č. 65, str. 995–1016, (2004).
- COTRAN R. S., KUMAR V., COLLINS T., ROBBINS S. L.: Robbins pathologic basis of disease, *Diseases of Immunity* č. 6, str. 214, (1999).

- COWARD L, BARNES N. C., SETCHELL K. D. R., BARNES S.: Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets, *Agric Food Chem* č. 41, str. 1961-1967, (1993).
- CERMAK R., WOLFFRAM S.: The Potential of Flavonoids to Influence Drug Metabolism and Pharmacokinetics by Local Gastrointestinal Mechanism, *Institute of Veterinary Physiology, University of Leipzig*, str.729-744, (2006).
- ČOPÍKOVÁ J.: *Technologie čokolády a cukrovinek.*, str. 168, VŠCHT, Praha 1999, ISBN 80-7080-306-1.
- DAKORA F. D, PHILLIPS D. A.: Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*č. 49, str. 1-20, (1996).
- D'ARCHIVIO M., FILESI C., DI BENEDETTO R., GARGIULO R., GIOVANNINI C., MASELLA R.: Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita.* č 43, str. 348–361., (2007).
- DAVIS J. M.: Fibroblastic, hematopoietic, and hormone responsive epithelial cell lines and culture conditions for elucidation of signal transduction and drug resistance pathways by gene transfer. *Methods Mol Biol.* č. 218, str. 185-201, (2002).
- DELL AGLI M., GALLI G. V., VRHOVSEK U., MATTIVI F; BOSISIO E.: In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J. Agric. Food Chem.* č. 53, str. 1960–1965, (2005).
- DIMMOCK J. R., ELIAS D. W., BEAZELY M. A., KANDEPU N. M.: Bioactivities of chalcones. *Curr. Med. Chem.* č. 6, str. 1125 (1999).
- DOSTÁL J., KAPLAN P.: *Lékařská chemie II.*, 1.vyd., Masarykova univerzita v Brně, str. 223, (2003) Brno, ISBN 80-210-2731-2.
- EIBL D., EIBL R., PÖRTNER R.: *Cell and Tissue Reaction Engineering: Principles and Practice*, Berlin (2008), ISBN: 978-3-642-01874-9.
- EICHHORN S., WINTERHALTER P.: Anthocyanins from pigmented potato. *Food Res. Int.* č. 38, str. 943, (2005).
- FAN P.; LOU H. X.: Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. *Mol. Cell Biochem.* č. 267, str. 67–74, (2008).

- FERREIRA C. V., GUSTO G. Z., ZAMBUZZI W. F., AOYAMA H.: Natural compounds as a source of protein phosphatase inhibitors; application to the rational design of small-molecule derivatives. *Biochemie č. 88*, str. 1859–1873, (2006).
- FREMONT L.: Biological effects of resveratrol. *LifeScience*, č. 8, str. 663-673, (2000).
- FRESHNEY R. I.: *Animal Cell Culture. A Practical Approach.* (ed.), 2nd Ed., Oxford University Press. Oxford, (1992), ISBN 0 19 963213 8.
- FRESHNEY, R. I. Cell line provenance. *Cytotechnology č. 39*, str. 3–15, (2002).
- FRESHNEY, R. I.: *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5th Ed. Hoboken NJ, John Wiley & Sons. (2005) ISBN: 978-0-471-45329-1.
- GARCÍA-FALCÓN M. S., PÉREZ-LAMELA C., MARTÍNEZ-CARBALLO E., SIMAL-GÁNDARA J.: Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, č. 105, str. 248–259(2007).
- GHAFOOR K., CHOI Y. H., JEON J. Y., JO I. H.: Optimization of ultrasound-assisted Extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric. Food Chem.č, 57*, str. 4988–4994, (2009).
- HARBONE J. B.: *The Flavonoids.*, str. 589-618, London (1994), Chapman and Hall, ISBN 0-412-25550-2.
- HARBORNE J. B.: Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry č. 55*, str. 481, (2000).
- HART K. J., SINCLAIR L. A., WILKINSON R. G., AND HUNTINGTON J. A.: Effect of whole-crop pea (*Pisum sativum* L.) silages differing in condensed tannin content as a substitute for grass silage and soybean meal on the performance, metabolism, and carcass characteristics of lambs, *Journal animal science č. 89*, str. 3663-3676, (2011).
- HAY R. J., MIRANDA-CLELAND M., DURKIN S., REID Y. A.: Cell line preservation and authentication. *Animal Cell Culture*, 3rd Ed. Oxford, Oxford University Press, str. 69–103, (2000).
- HERTOG M. G. L.: Flavonols in wine and tea and prevention of coronary heart disease. In: 18th International Conference on Polyphenols, Bordeaux- France. Polyphenols 96 – Colloques De l'INRA, str. 117–131, (1998).

- HESS D.: Fyziologie rostlin. Praha: 1.vyd., str. 341, Academia, (1983), ISBN: 978-80-200-0586-1.
- HOIKKALA A., SOIDINSALO O., WAHALA K.: Effects of different mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cancer prevention and inhibition of carcinogenesis of Ehrlich breast carcinoma Polyphenols Communictons, str. 217–218, Finland: Gummerus Printing; Helsinki (2004), ISBN 952-10-1977-8.
- HOLMES-MCNARY M., BALDWIN A. S.: Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res* č. 60, str. 3477-3483, (2000).
- CHOW S. E., HSHU Y. C., WANG J. S., CHEN J. K.: Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidativefunctional damages. *J Appl Physiol* č. 102, str. 1520–1527 (2007).
- JEANDET P., DOUILLET-BREUIL A. C., BESSIS R., DEBORD S., SBAGHI M., ADRIAN M.: Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* č. 50, str. 2731-2741, (2002).
- KADAM, S. S., SALUNKHE D. K.; CHAVAN J. K.: Dietary tannins: consequences and remedies. str. 177. Boca Raton CRC Press (1990), ISBN 0-8493-6811-1.
- KAPIOTIS S., HERMANN M., HELD I., SEELOS C., EHRINGER H., GMEINER B. M.: Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevent LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, č. 11, str. 2868-2874, (1997).
- KARAPINAR M.; SENGUN I. Y.: Antimicrobial effect of koruk (unripe grape-*Vitis vinifera*) juice against *Salmonella typhimurium* on salad vegetables. *Food Control*, č. 18, str. 702–706, (2007).
- KIM D. O., LEE K. W., LEE H. J., LEE C. Y.: Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* č. 50, str. 3713–3717, (2002).
- KLEMENT G., SCHEIRER W., KATINGER H. W.: Construction of a large scale membrane reactor system with different compartments for cells, medium and product. *Dev Biol Stand.*, č. 66, str. 221–226, (1987).

- KOSIERADZKA I., BORUCKI W., MATYSIAK-KATA I., SZOPA J., SAWOSZ E.: J.: Transgenic potato tubers as source of phenolic compounds. Localizations of anthocyanins in the epidermis. *Anim. Feed Sci.*, č. 13, str. 87, (2004).
- KRAUS V., FOFKOVÁ Z., VURM B.: *Nová encyklopedie českého a moravského vína 2. díl*. Praha, str. 311, Praga Mystica, (2008), ISBN 978-80-86767-09-3.
- KUNDU J. K., SURH Y. J.: Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- κ B and AP-1 as potential targets. *Mutat. Res.*, č. 1-2, str. 65-80, (2004).
- KUTTELVAŠER Z.: *Abeceda vína*. Praha: Radix, spol. s.r.o., str. 296, (2003), ISBN 80-86031-43-8.
- LABORATORY HANDBOOK, *Fundamental Techniques in Cell Culture*, Sigma Aldrich Co., (2001).
- LACHMAN J., ORSÁ M., PIVEC V., KUČER J.: Effect of the year and storage on ascorbic acid content and total polyphenol content in three apple varieties., *Czech Journal of Food Sciences* č. 18, str. 71-72, (2000).
- LANGCAKE P., PRYCE R. J.: Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against botrytis cinerea, the causal agent for gray mold. *Physiol. Plant Pathol.* č. 9, str. 77, (1996).
- LARROSA M., TOMAS-BARBERAN F. A., ESPIN J. C. The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma. *Eur J Nutr.* č. 43, str. 275-284, (2004).
- LOTITO S. B., FREI B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon, *Free Radic Biol. Med.* č. 41, str. 1727-1746, (2006).
- LUŠTINEC, J., TÁRSKÝ, V.: *Úvod do fyziologie vyšších rostlin. Nakl. Karolinum*, (2003) Praha, ISBN: 80-246-0563-5.
- MACLEOD R. A., DIRKS W. G., MATSUO Y., KAUFMANN M., MILCH H., DREXLER H. G.: Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int. J. Cancer* č. 83, str. 555-563, (1999).
- MACHEIX J. J., FREURIET A., BILLOT J.: Changes and metabolism of phenolic compounds in fruits. In *Fruit phenolic*. str. 149-278, (1990).

- MARCOVIC O., MARCOVIC N.: Cell cross-contamination in cell cultures: the silent and neglected danger. In *Vitro Cell Dev Biol.* č. 34, str. 108, (1998).
- MIDDLETON E. JR., KANDASWAMI C., THEOHARIS T. C.: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* č. 52, str. 673-751, (2000).
- MIZUNUMA H., KANAZAWA K., OGURA S., OTSUKA S., NAGAI H.: Anticarcinogenic effects of isoflavones may be mediated by genistein in mouse mammary tumor virus-induced breast cancer. *Oncology* č. 62, str. 78, (2002).
- MORAVCOVÁ J., KLEINOVÁ T.: Fytoestrogeny ve výživě – přinášejí užitek, nebo riziko? *Chem. Listy* č. 5, str. 282-289, (2002).
- OPLETALOVÁ V., ŘIČIČÁŘOVÁ P., ŠEDIVÝ D., MELTROVÁ D., KŘIVÁKOVÁ J.: Chalcones and their heterocyclic analogues as potential medicaments. *Folia Pharm. Univ. Carol.* č. 25, str. 21, (2000).
- ORMEROD M. G.: *Flow Cytometry. Second Edition*, str. 282, IRL Press, Oxford, (1994), ISBN 978-0-9559812-0-3.
- PAPADOPOULOU C., SOULTI K., ROUSSIS I. G.: Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Taphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technol. Biotechnol.* č. 43, str. 41–46, (2005).
- PARR S., BOLWEL L.: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile, *J. the Sci. Food and Agric.*, č. 80, str. 985-1012, (2000).
- PULIDO M. D., PARRISH A. R.: Metal-induced apoptosis mechanisms. str. 227-241, *Mutat Res* (2003), ISBN 533:227- 41.
- QUINEY C., DAUZONNE D., KERN C., FOURNERON J. D., IZARD J. C., MOHAMMAD R. M., KOLB J. P., BILLARD C.: Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leuk Res* č. 28. str. 851-861, (2004).
- RAJENDRAN P., EKAMBARAM G., SAKTHISEKARAN D.: Cytoprotective effect of mangiferin on benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in swiss albino mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* č. 103, str. 137-142, (2008).

- REGNIER M., STAQUET M. J., SCHMITT D., SCHMIDT R.: Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* č. 109, str. 510–512, (1997).
- REYNAUD J., GUILLET D., TERREUX R., LUSSIGNOL M., WALCHSHOFER N.: Isoflavonoids in non-leguminous families an update. *Nat. Prod. Rep.* č. 22, str: 504–515, (2005).
- RICE L., SAMEDI V. G., MEDRANO T. A., SWEENEY C. A., BAKER H. V., STENSTROM A., FURMAN J., SHIVERICK K. T.: Soy isoflavones alter expression of genes associated with cancer progression, including interleukin-8, in androgen-independent PC-3 human prostate cancer cells. *J Nutr.* č. 52, str. 201, (2002).
- RICE-EVANS C. A.: The metabolit fate of dietary polyphenols in humans. *Free Rad. Biol. and Med.* č. 33, str. 220 – 235, (2002).
- RIETJENS I. M., BOERSMA M. G., VAN DER WOUDE H., JEURISSEN S. M.: Flavonoids and alkenylbenzenes: New concepts in bioactivation studies. *Chem Biol Interact.* Jun č. 30, str. 87-95, (2011).
- RODRIGUEZ-VAQUERO M. J., ALBERTO M. R., MANCA-DE-NADRA M. C.: Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, č. 18, str. 587–593, (2007).
- SAALBACH A., AUST G., HAUSTEIN U. F., HERRMANN K., ANDEREGG U.: The fibroblastspecific MAb AS02: A novel tool for detection and elimination of human fibroblasts. *Cell Tissue Res.* č. 290, str. 593–599, (1997).
- SHAPIRO H. M.: *Practical Flow Cytometry, Third Edition*, str. 279-281, Willey-Liss, New York-(1995), ISBN 0-471-41125-6.
- SHIWANI M.: Blueberries may inhibit development of fat cells, *Science Daily* č. 117, str. 563, (2011).
- SHUKITT-HALE B., CAREY A., SIMON L., MARK D. A., JOSEPH J. A.: Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. *Nutrition* č. 22, str. 295–302, (2006).
- SCHALLER M., MAILHAMMER R., GRASSL G., SANDER C. A., HUBE B., KORTING H. C.: Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cyto-

- kine expression correlated to the degree of virulence. *J. Invest. Dermatol.* č. 118, str. 652–657, (2002).
- SCHOONHOVEN L. M., JERMY T., VAN LOON J. J. A.: *Insect-Plant Biology*, str. 409, Chapman Hall, London (1998), ISBN 0-412-58700-9.
- SILANIKOVE N., PEREVOLOTSKY A., PROVENZA F. D.: Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants, *Animal Feed Science and Technology*, č. 91, str. 69-81, (2001).
- SKIBOLA C. F., SMITH M. T.: Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med.* č. 29, str. 375 - 383, (2000).
- SMITH B.: Flavonoid compounds. In: *Comparative biochemistry*, č. 75, str. 809, (1992).
- SOLEAS G. J., DIAMANDIS E. P., GOLDBERG D. M.: Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* č. 30, str. 91, (1997).
- SPECTOR D. L., GOLDMAN R. D.: *Basic methods in microscopy: Protocols and concepts from Cells. A laboratory manual*, sv. 2, str. 382, (1998).
- STEIDL R.: *Sklepní hospodářství. První vydání: Národní salon vín Valtice.*, str. 303, (2002), ISBN 80-903201-0-4.
- STEJSKAL J.: *Obecná patologie v poznámkách.*, str. 164 H&H, (1992) Jinočany, ISBN 80-86022-86-2.
- STEVENSON D. E., HURST R. D.: Polyphenolic phytochemicals - Just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci.* č. 64, str. 2900–2916, (2007).
- STOHS, S. J., The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of Basic Clinical Physiology and Pharmacology* č. 6, str. 205–228, (1995).
- STOKER M. G. P.: Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. *Nature* č. 246, str. 200–203, (1973).
- SURH Y. J., CHUN K. S., CHA H. H., HAN S. S., KEUM Y. S., PARK K. K., LEE S. S.: Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* č. 1, str. 480-481, (2001).
- SUJAK A., KOTLARZ A., STROBELI W.: Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds.: *Food Chem.* č. 98, str. 711-719, (2006).

- ŠMIDRKAL J., FILIP V., MELZUCH K., HANZLÍKOVÁ I., BUCKIOVÁ D., KŘÍSA B.: Differences in polyphenol and resveratrol content among bottles of tramin wine of the same production series *Chem. Listy* č. 95, str. 60, (2001).
- TERRA X., MONTAGUT G, BUSTOS M., LLOPIZ N., ARDEVOL A., BLADE C., FERNANDEZ-LARREA J., PUJADAS G., SALVADO J., AROLA L.: Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* č. 20, str. 210–218, (2009).
- THTMOTHE J., BONSI I. A., PADILLA-ZAKOUR O. I.: Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis Interspecific Hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.* č. 55, str. 10200–10207, (2007).
- UGARTONDO V., MITJANS M., LOZANO C., TORRES J. L., VINARDELL M. P.: Comparative study of the cytotoxicity induced by antioxidant epicatechin conjugates obtained from grape. *J. Agric. Food Chem.* č. 54, str. 6945–6950, (2006).
- WATERHOUSE A. L. Wine phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* č. 21, str. 957, (2002).
- YAMAMOTO S., SOBUE T., KOBAYASHI M., SASAKI S., TSUGANE S.: Soy, Isoflavones, and Breast Cancer Risk in Japan. *J. Natl. Cancer I.* č. 95, str. 906, (2003).
- ZENDULKA O., ZAHRADNÍKOVÁ L., JUŘICA J., TOTUŠEK J., The Influence of Trans-resveratrol and Quercetin on the Activity of CYP1A2 in Rat, *Czech J. Food Sci.* č. 26, str. 60-64, (2006).

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

LDL	Low density lipoprotein
UV	Ultrafialové záření
HPLC	Kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
VKR	Volné kyslíkové radikály
GPX	Glutathionperoxidáza
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
DNA	Deoxyribonucleic acid
HDL	High density lipoprotein
ug	Mikrogram
ml	Mililitr
l	Litr
h	Hodina
C°	Stupeň Celsia
tzv.	takzvaný
mg	Miligram
MTT	Master Technology Teacher. (test cytotoxicity)
SDS	Dodecyl sulfát sodný
FSC	Forward scatter (přímý rozptyl)
SSC	Side scatter (boční rozptyl)
CO ₂	Oxid uhličitý
pH	Power of hydrogen
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctovou
DMSO	Dimethyl sulfoxide
PCR	Polymerázová řetězová reakce
HaCaT	Keratinocyty

HepG2 Hepatocyty

NIH 3T3 Fibroblasty

ATCC Airedale Terrier Club of Canada

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Flavan.....	14
Obr. 2 Chemické struktury některých skupin flavonoidů.....	15
Obr. 3 Tanin.....	18
Obr. 4. Resveratrol.....	20
Obr. 5. Fenolické látky červeného vína.....	21

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách.....	13
Tab. 2. Obsah fenolických látek ve víně.....	22
Tab. 3. Testovaný materiál.....	45
Tab. 4. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Muškátu moravského na buňky HaCaT pomocí MTT testu.....	49
Tab. 5. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Muškátu moravského na buňky HepG2 pomocí MTT testu.....	50
Tab. 6. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Muškátu moravského na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu.....	51
Tab. 7. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Muškátu moravského na buňky HaCaT pomocí MTT testu.....	52
Tab. 8. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Muškátu moravského na buňky HepG2 pomocí MTT testu.....	53
Tab. 9. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Muškátu moravského na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu.....	54
Tabulka 20. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Burgundy modré na buňky HaCaT pomocí MTT testu.....	56
Tab. 11. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Burgundy modré na buňky HepG2 pomocí MTT testu.....	57
Tab. 12. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích Burgundy modré na buňky NIH3T3 pomocí MTT testu.....	58
Tab. 13. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Burgundy modré na buňky HaCaT pomocí MTT testu.....	59
Tab. 14. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Burgundy modré na buňky HepG2 pomocí MTT testu.....	60
Tab. 15. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Burgundy modré na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu.....	61

Tab. 16. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Burgundy modré na buňky HaCaT pomocí MTT test.....	63
Tab. 17. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Burgundy modré na buňky HepG2 pomocí MTT testu.....	64
Tab. 18. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Burgundy modré na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu.....	65
Tab. 19. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Frankovky na buňky HaCaT pomocí MTT testu.....	66
Tab. 20. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Frankovky na buňky HepG2 pomocí MTT testu.....	67
Tab. 21. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených ve slupkách Frankovky na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu.....	68
Tab. 22. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Frankovky na buňky HaCaT pomocí MTT testu.....	70
Tab. 23. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Frankovky na buňky HepG2 pomocí MTT testu.....	71
Tab. 24. Antiproliferační vliv koncentrací polyfenolických sloučenin obsažených v bobulích pozdního sběru Frankovky na buňky NIH 3T3 pomocí MTT testu.....	72

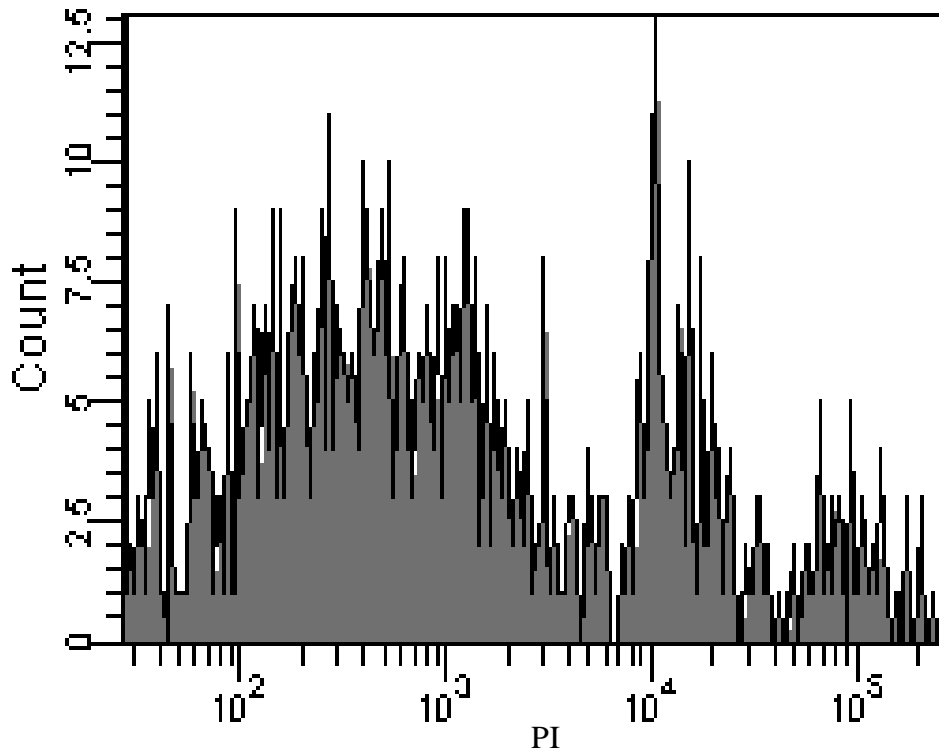
SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Muškátu moravského na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance	49
Graf 2. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Muškátu moravského na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance.....	50
Graf 3. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Muškátu moravského na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance.....	51
Graf 4. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Muškátu moravského na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance.....	53
Graf 5. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Muškátu moravského na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance.....	54
Graf 6. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Muškátu moravského na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance.....	55
Graf 7. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Burgundy modré na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance.....	56
Graf 8. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Burgundy modré na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance.....	57
Graf 9. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí Burgundy modré na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance.....	58
Graf 10. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Burgundy modré na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance.....	60
Graf 11. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Burgundy modré na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance.....	61
Graf 12. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Burgundy modré na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance.....	62
Graf 13. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Burgundy modré na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance.....	63
Graf 14. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Burgundy modré na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance.....	64

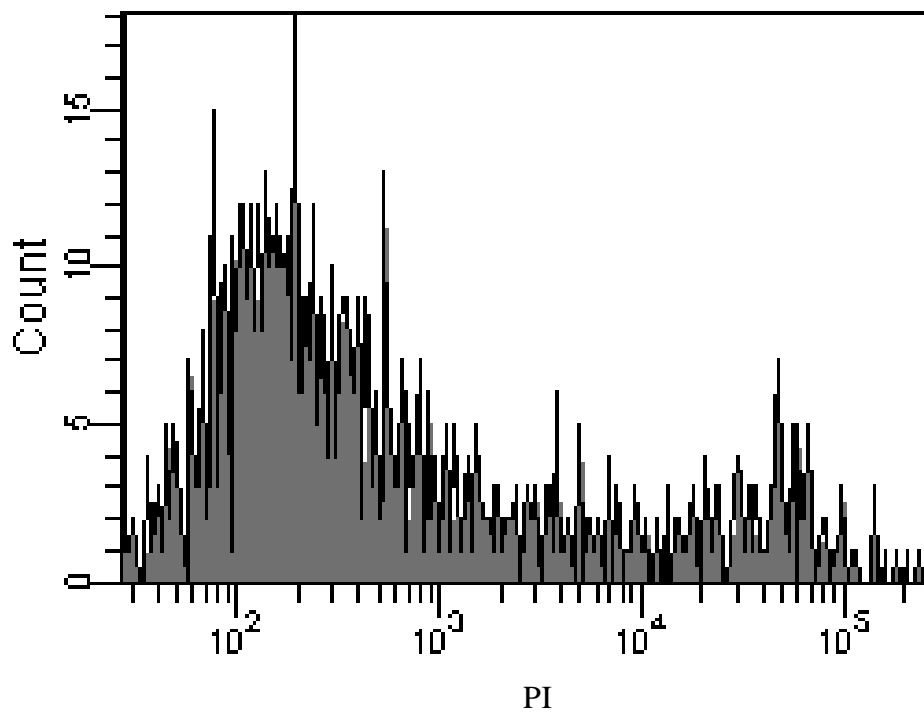
Graf 15. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Burgundy modré na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance.....	65
Graf 16. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Frankovky na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance.....	67
Graf 17. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Frankovky na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance.....	68
Graf 18. Antiproliferační vliv extraktů ze slupek Frankovky na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance.....	69
Graf 19. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Frankovky na buňky HaCaT, vyjádřen hodnotou absorbance.....	70
Graf 20. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Frankovky na buňky HepG2, vyjádřen hodnotou absorbance.....	71
Graf 21. Antiproliferační vliv extraktů z bobulí pozdního sběru Frankovky na buňky NIH 3T3, vyjádřen hodnotou absorbance.....	72

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I: Graf 22. Vyhodnocení metody průtokové cytometrie pro HaCaT - kontrolní měření bez přidavku extraktu.....94



PŘÍLOHA II: Graf 23. Vyhodnocení metody průtokové cytometrie pro HaCaT –Působení extraktu z Burgundy modré o koncentraci 50 ug/ml94



PŘÍLOHA III: Graf 24. Vyhodnocení metody průtokové cytometrie pro HaCaT – Působení extraktu ze slupek Frankovky o koncentraci 50 ug/ml95

