

Vliv polyfenolických látek extrahovaných z révy vinné na lidské buňky

Bc. Pavla Curusová

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavla CURUSOVÁ**
Osobní číslo: **T09528**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vliv polyfenolů extrahovaných z révy vinné na lidské buňky**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika polyfenolů.
2. Polyfenoly ve víně.
3. Vliv polyfenolů na lidské zdraví.

II. Praktická část

1. Metodika stanovení polyfenolů.
2. Stanovení polyfenolů ve vybraných vzorcích vín.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

SEZNAM DOPORUČENÉ LITERATURY: [1] LACHMAN, J., PIVEC, V., ORSÁK, M. Polyphenols compounds – antioxidants influencing biological quality of seed [online]. [cit. 2010–11–4]. Dostupné na WWW: <http://www.agris.cz/vyzkum/detail.php?id=111118&iSub=566&PHPSESSID=a3> [2] ŠVEJCAR, V., MINÁRIK, E. Vinařství Biochemie vína. 1 vyd. Brno: Vysoká škola zemědělská, 1976. 77s [3] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin 2. Vyd. 2. uprav. Tábor : OSSIS, 2002. 304 s. ISBN 8086659011 [4] ISLANINA J., TÁBORSKÁ E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. Chem. Listy 98, 2004. S 239–245

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

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

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

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

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

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či 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). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

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

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

ABSTRAKT

Řada experimentálních studií ukázala, že polyfenolické látky z vína mohou mít antikarcinogenní vlastnosti. Jejich antioxidantní a protinádorové účinky byly mnohokrát prokázány v různých *in vitro* a *in vivo* studiích. Cílem diplomové práce bylo sledovat vlivy polyfenolů extrahovaných z révy vinné, ať už z hroznů celých, botritických, nebo pouze z jejich slupek, na proliferační aktivitu nádorových buněk. Antiproliferační efekt byl hodnocen *in vitro* za použití čtyř různých koncentrací roztoků polyfenolů. Studovány byly tři odrůdy révy vinné a dva typy nádorových buněk. Ke stanovení obsahu polyfenolů byla použita metoda HPLC a k určení míry proliferace MTT test.

Klíčová slova: Proliferace, réva vinná, polyfenolické látky, rakovina.

ABSTRACT

A series of experimental studies has proven that polyphenolic substances from wine can have anti-carcinogenic traits. Theirs antioxidant and anti- tumor effects has been proven many times in different *in vitro* and *in vivo* studies. Main aim of this thesis was to observe influences of polyphenols extracted from wine grapes wheter from whole grapes botritic or peels on proliferatic activity of tumor cells. Anti-proliferatic effect was evaluated *in vitro* using four different solutions of polyphenols. Three varieties of grape wine and two types of tumor cells were studied. To determine contents of polyphenol were used the HPCL method ant to determine amount of proliferation were used MTT test.

Keywords: Proliferation, wine grape, polyphenolic substances, cancer.

Děkuji svému vedoucímu práce Ing. Petrovi Humpolíčkovi Ph.D., za odborné vedení při práci, cenné rady a velkou dávku trpělivosti při konzultacích. Chci také poděkovat své rodině a přátelům za velkou podporu. Děkuji univerzitě, za poskytnutý materiál k práci a za asistenci v laboratořích.

Tuto práci bych chtěla věnovat Davidovi Komenderovi (2.1.1973 – 2.12.2010), který rakovinně podlehl.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA POLYFENOLŮ	12
1.1 ROZDĚLENÍ POLYFENOLICKÝCH LÁTEK.....	12
1.1.1 Jednoduché fenoly.....	13
1.1.2 Fenolkarboxylové kyseliny.....	14
1.1.3 Flavonoidy.....	15
1.1.3.1 Flavony	15
1.1.3.2 Flavonoly	16
1.1.3.3 Katechiny	17
1.1.3.4 Fytoestrogeny.....	17
1.1.3.5 Anthokyanidiny.....	18
2 OBSAH POLYFENOLŮ VE VÍNĚ.....	19
3 VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÝ ORGANISMUS.....	23
3.1 KVERCETIN	24
3.2 KATECHINY	25
3.3 FLAVONY	25
3.3.1 Resveratrol	26
3.4 PROANTHOKYANIDINY	26
3.5 FRANCOUZKÝ PARADOX.....	27
4 BUNĚČNÉ KULTURY	28
4.1 BUNĚČNÝ CYKLUS.....	28
4.2 RŮSTOVÝ CYKLUS	28
4.3 STANOVENÍ VIABILITY BUNĚK	29
4.4 BUNĚČNÉ LINIE.....	29
4.4.1 Primokultury.....	30
4.4.2 Permanentní linie	31
4.4.3 Adherentní buňky	31
4.4.4 Suspenzní buňky	32
5 KULTIVAČNÍ PODMÍNKY	33

5.1	TEPLOTA	33
5.2	PH A ATMOSFÉRA CO ₂	33
5.3	KYSLÍK.....	35
5.4	OSMOLALITA	36
5.5	MÉDIA A SÉRA	36
5.6	ANTIBIOTIKA	39
5.7	PRÁCE S KULTURAMI.....	39
5.7.1	Zchlazování a zamrazování buněk	40
5.7.2	Rozmrazování buněk.....	41
5.7.3	Přeprava buněk.....	41
5.7.4	Monitorování infekce	41
II	PRAKTICKÁ ČÁST	42
6	METODIKA	43
6.1	MATERIÁL	43
6.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	43
6.3	EXTRAKCE POLYFENOLŮ	44
6.4	STANOVENÍ OBSAHU POLYFENOLŮ	44
6.5	KULTIVACE BUNĚK.....	46
7	VÝSLEDKY	47
7.1	VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÉ KERATINOCYTY	47
7.1.1	Burgunda modrá.....	47
7.1.2	Frankovka.....	51
7.1.3	Muškát moravský	53
7.2	VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÉ HEPATOCYTY.....	53
7.2.1	Burgunda modrá.....	54
7.2.2	Frankovka.....	60
7.2.3	Muškát moravský	64
7.3	DISKUSE	68
	ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	87
	SEZNAM TABULEK.....	90
	SEZNAM PŘÍLOH.....	92

ÚVOD

Ke zdraví lidí, kromě základních živin a vody přispívá také řada látek doplňkových. Tyto látky, ačkoliv jsou přijímány z potravy v minoritním množství, mohou mít na lidský organismus značný vliv. Jednou skupinou z těchto látek jsou polyfenoly. Jejich škála je tak široká, že mnoho účinků na lidské zdraví ještě nebylo objeveno, nebo potvrzeno, ale v souvislosti s léčbou rakoviny jsou polyfenoly zmiňovány velmi často.

Vinná réva rostla již před 150 ti miliony lety, v období konce druhohor, ale na severní polokouli se stala běžnou rostlinou až v období třetihor. Evropské typy vinné révy (*Vitis vinifera*) mají svůj původ v Zakavkazsku - území dnešního Ázerbájdžánu, Arménie a Gruzie. Nejen nápojům, ale také hroznům této rostliny jsou již těchto dob, přisuzovány léčivé účinky.

Tato práce se zabývá sledováním vlivu polyfenolů obsažených ve vybraných odrůdách révy vinné na buněčnou proliferaci vybraných druhů buněk a prokázat vhodnost polyfenolů ve víně pro prevenci nádorových onemocnění. V teoretické části jsou polyfenoly stručně charakterizovány, rozděleny do skupin a jsou popsány jejich vlivy na lidský organismus. Jsou zde také základní informace o buněčných kulturách a práci s nimi. V praktické části je práce zaměřena na vliv polyfenolů extrahovaných z vybraných odrůd révy vinné, na dva vybrané typy nádorových buněk.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA POLYFENOLŮ

Polyfenoly patří k heterogenní třídě sloučenin, která má v přírodě hojné zastoupení. Mají ve své struktuře benzenové jádro substituované alespoň jednou hydroxylovou skupinou a můžeme je nalézt čaji, ovoci, zelenině [HERTOG, 1998] a v mnoha dalších rostlinách. Obsah fenolických látek v jednotlivých rostlinných částech (např. listy, plody, pecky, semena) se mohou významně lišit [BUCHANAN, 2000]. Odlišnosti ve struktuře a vlastnostech jednotlivých fenolických látek určují senzorycké vlastnosti materiálu i jeho vhodnost pro využití v potravinářství a významně ovlivňují kvalitu potravin rostlinného původu [LAMPART-SZCZAPA, 2003]. Vykazují antioxidační vlastnosti, mají antibakteriální účinky, mohou ovlivňovat autoimunitní systém živočišných organismů [DOSTÁL, 2003] a v neposlední řadě se v současnosti obrací pozornost na jejich antimutagenní účinky [RYAN, 2002].

1.1 Rozdělení polyfenolických látek

Na základě struktury uhlíkatého skeletu je možné polyfenolické látky rozdělit do několika skupin (viz. Tab. 1). Tyto skupiny se liší nejen počtem uhlíků v řetězci, ale hlavně svými vlastnostmi. V tabulce 1. jsou uvedeny jednotlivé skupiny i se zástupci [HESS, 1983].

Tab. 1. Rozdělení polyfenolů:

SLOŽENÍ	POČET UHLÍKŮ	TYP FENOL. L.	ZÁSTUPCI
C6	6	Jednoduché fenoly	Katechol
C6-C1	7	Fenolické kyseliny	Kys.salicylová
C6-C3	9	Fenylpropanoidy	Chromen
C6-C2-C6	14	Stilbeny	Resveratrol
C6-C3-C6	15	Flavonoidy	Kvercetin
(C6-C3) ₂	18	Lignany	Yatein
(C6-C3-C6) ₂	30	Biflavonoidy	Amentoflavon
(C6-C3-C6) _n	n	Flavolany	Gallotaniny
(C6-C3) _n	n	Ligniny	Lignin
(C6) _n	n	Katecholmelaniny	Rostlinné pigmenty

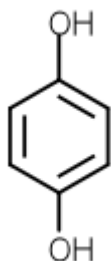
Společnou vlastností fenolických látek je jejich struktura, díky které mají schopnost tvořit relativně stabilní radikály. Tato skutečnost je zapříčiněna interakcí hydroxylové skupiny a π -elektronů benzenového kruhu. Díky této vlastnosti mohou působit jako antioxidanty a začleňovat se do různých oxidačních procesů zprostředkovaných radikály a mít v organismu důležitou biologickou roli [PARR, 2000].

Za silné antioxidanty jsou považovány fenolické sloučeniny obsahující benzenový kruh se dvěma hydroxylovými skupinami substituovanými v poloze *ortho*- (např. *o*-salicylaldehyd nebo *o*-benzendiol). Hydroxylové skupiny fenolických látek mohou být snadno ionizovány. Látka pak má vlastnosti slabé kyseliny a je dobrým H-donorem při tvorbě vodíkových vazeb. Z tohoto poznatku vyplývá schopnost některých polymerních fenolů, které mají ve struktuře takovýchto donorových skupin velké množství [BUCHANAN, 2000], tvořit stabilní komplexy s jinými molekulami [VELÍŠEK, 2002]. Antioxidační účinky polyfenolů lze přičíst více mechanismům. Mnohé z nich vytvářejí chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem a tyto volné ionty se účastní tvorby reaktivních kyslíkových forem např. při Fentonově reakci [LUŠTINEC, 2003]. Ne všechny polyfenolické látky jsou v révě vinné přítomné, proto je v následujících kapitolách věnována pozornost, pouze některým.

1.1.1 Jednoduché fenoly

Jednoduché fenoly ve struktuře obsahují cyklické C_6 řetězce [SUJAK, 2006] a základní skelet molekuly bývá často substituován methylovými skupinami.

Obr. 1. Strukturální řetězec hydrochinonu:



Tato skupina polyfenolických látek není v rostlinné říši příliš zastoupená a řadíme do ní například hydrochinon (Obr. 1.). Jeho molekula obsahuje dvě hydroxylové skupiny vázané

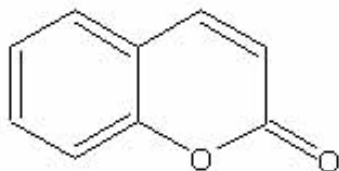
na benzenové jádro v pozici *para*- (na protilehlých koncích). Nejčastěji se vyskytují mono- a di-fenoly, menší část obsahových látek tvoří trifenoly. Tyto látky se často vyskytují ve formě glykosidů, nebo methyletherů [PARR, 2000].

1.1.2 Fenolkarboxylové kyseliny

Rostlinné fenolické kyseliny se mohou v rostlinách vyskytovat volné, často jsou ale vázány ve formě glykosidů či esterů. Řadíme k nim kyseliny, jejichž struktura je odvozena od skeletu kyseliny benzoové nebo skořicové. Struktura jejich uhlíkového skeletu je C₆-C₁ (u hydroxybenzoových kyselin) a C₆-C₃ (u hydroxyskořicových kyselin) [LUŠTINEC, 2003]. Benzoová kyselina tvoří základ např. kyseliny *p*-hydroxybenzoové, kys. pyrokatechové, nebo kyseliny gallové (a jejího dimeru hexahydroxydifenové kys.), která je základem hydrolyzovatelných tříslovin. Tyto látky jsou v rostlinách poměrně běžné a často se vyskytují jako např. taniny (třísloviny). Mezi kyseliny odvozené od kys. hydroxyskořicové patří např. kyselina *p*-kumarová, kávová, ferulová, sinapová a chlorogenová. Díky násobné vazbě v postranními C₃ řetězci, mohou tyto kyseliny existovat jako *cis*- a *trans*-izomery [WATERHOUSE, 2002].

Do skupiny fenolických kyselin také bývají zařazovány aldehydicke sloučeniny s analogickou strukturou, např. vanilin. Tato skupina kyselin se často stává prekurzory řady jednoduchých fenolů, fenolických aldehydů a dalších látek, které z nich vznikají činností mikroorganismů, nebo při termických procesech (např. toastováním dubového dřeva fenylypropanidy). Tato významná skupina sloučenin obsahuje ve své struktuře aromatický (fenolový) kruh s navázaným C₃ řetězcem. Řadíme do ní již zmíněný vanilin, stavební polymerní látku lignin a také kumariny [MACHOLÁN, 1998].

Obr. 2. Strukturní vzorek kumarinu:



Od fenylypropanových kyselin vznikají *in vivo* další fenylypropanové deriváty, které tvoří vedle terpenů jednu z nejdůležitějších součástí éterických olejů. Jedním ze zástupců je myristicin a další jemu chemicky podobné deriváty, se vyskytují např. v éterickém oleji muškátového oříšku [RICE-EVANS, 1996].

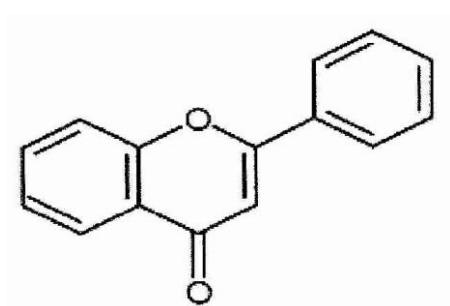
Kyselina skořicová a její deriváty jsou vyššími rostlinami produkovány jako odpadní produkty biosyntézy stilbenových derivátů. Ty vznikají po kondenzaci fenylypropanových kyselin se třemi molekulami acetátu. Zástupci této skupiny jsou např. anetol, nebo estragol [HEELDT, 1997].

1.1.3 Flavonoidy

Flavonoidy, mezi něž patří tisíce sloučenin, byly klasifikované podle jejich chemické struktury a rozděleny do 6 podskupin: flavonoly, flavony, katechiny, flavanony, isoflavonoidy a anthokyanidiny. Základ struktury molekuly je u těchto sloučenin odvozen od flavanu (Obr. 3.), a skládá se ze dvou částí. První je C_6-C_3 řetězec, který je výsledkem šikimátové metabolické dráhy a druhá část vzniká odvozením od acetátů a je tvořena cyklickým řetězcem C_6 s navázaným atomem kyslíku. Na hydroxylové skupiny flavonoidů se mohou navázat i další molekuly, nejčastěji cukry [ODSTRČIL, 2006].

Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu např. xantinoxidázy nebo proteinkinázy C [RICE-EVANS, 1996] a inhibují i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů (cyklooxygenáza, lipoxygenáza, mikrosomální monooxygenázy ad.) [ŠVEJCAR, 1976].

Obr. 3. Strukturní vzorec flavanu:



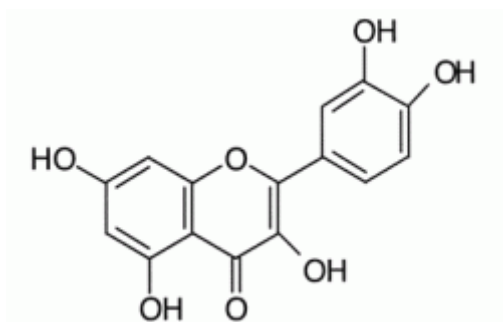
1.1.3.1 Flavony

Flavony jsou žlutá rostlinná barviva ze skupiny flavonoidů vyskytující se volně (jako glykosidy), nebo jako estery [HESS, 1983]. V kombinaci s anthokyaniny vytvářejí barevné odstíny okvětních lístků rostlin ve spektru od žluté po červenou. Zástupci jsou např. luteolin v přesličce, nebo apigenin v celeru či kadeřavé petrželi [LUŠTINEC, 2003].

1.1.3.2 Flavonoly

Flavonoly se vyskytují v ovoci, zelenině, a také v nápojích, avšak v poměrně malém množství. Stejně jako flavony vystupují v rostlinné říši, jako barevné pigmenty. Jejich denní příjem u člověka byl odhadnut pouze na 20 mg, přesto patří (především kvercetin a jeho deriváty, jako je rutin), k nejčastěji studovaným flavonoidům. Je to dáno jejich komerční dostupností a významnou biologickou aktivitou [SAKKIADI, 2001]. Nejrozšířenějšími flavonoly jsou kvercetin (Obr. 4.), kemferol a myricetin. Tyto flavonoly byly nalezeny například v čaji nebo révě vinné.

Obr. 4. Strukturální vzorec kvercetinu:



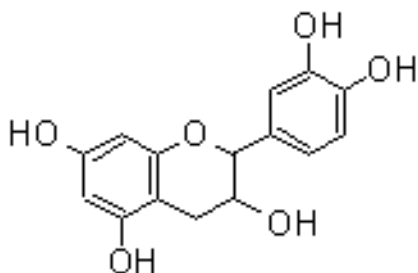
Existuje také glykosylovaná forma flavonolů, u které cukernou složku tvoří glukosa nebo rhamnosa a je známá pod názvem rutin (chemicky kvercetin-3-O-ramnoglukosid) [PAGANGA, 1996]. Ten snižuje permeabilitu a fragilitu kapilár, příznivě působí na cévy a žíly a je součástí léků používaných jako venofarmaka. Tyto látky vykazují silné antioxidační účinky, přičemž kvercetin má aktivitu výraznější, než kemferol. Vzhledem k tomu, že při vystavení rostliny mechanickému poškození se jejich obsah v listech rostlin zvyšuje, předpokládá se, že glykosidy kvercetinu hrají roli při obraně rostlin na abiotické faktory [HERTOG, 1998].

Významným zástupcem této skupiny je kvercetin. Nachází se v běžně přijímaných potravinách, jako jsou jablka, cibule, kapusta, červené víno (v množství 4 – 6 mg.l⁻¹), nebo zelený a černý čaj. V těchto zdrojích se nachází jednak ve formě volné a jednak vázán s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4'-O-glukosid a kvercetin-3-O-ramnosid [CATTANI, 1998].

1.1.3.3 Katechiny

Název katechiny pochází od slova „catech“, což je šťáva z rostliny *Acacia catechu*, pocházející z Austrálie. Jsou to látky rozpustné ve vodě, avšak mají i částečně nepolární charakter a pronikají lipidovými vrstvami membrán [PAGANGA, 1996].

Obr. 5. Strukturální vzorec katechinu:

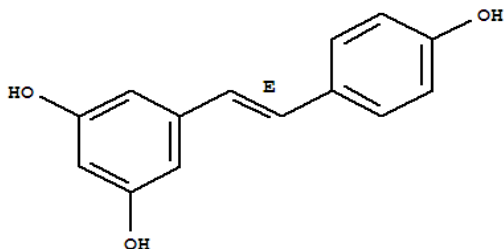


Základním fenolem, obsaženým v této rostlině je katechin, který obsahuje dva benzenové (tzv. A- a B-) kruhy a C-kruh s hydroxylovou skupinou na 3. uhlíku. Jelikož má dvě chirální centra v molekule (na uhlících 2 a 3), existují čtyři diastereoisomery. Dva z isomerů jsou v *-trans* konfiguraci a nazývají se katechiny a zbývající dva jsou v konfiguraci *-cis* a nesou název epikatechiny. Nejběžnějším katechinem je izomer (+)-katechin [SAUCIER, 1999].

1.1.3.4 Fytoestrogeny

Do této skupiny řadíme isoflavony, stilbeny a ligniny. Obecně tyto látky mají chemickou strukturu molekuly velmi podobnou estrogeneru. Jsou to vícesytné fenoly, strukturou podobné steroidním hormonům, které lze nalézt například v sojových bobech [DOSTÁL, 2003]. Z této skupiny je nejvýznamnějším zástupcem stilben zvaný resveratrol (3,5,4-trihydroxystilben), který se objevuje v izomerech *-trans*, *-cis* a *-transcis*.

Obr. 6. Strukturální vzorec resveratrolu:



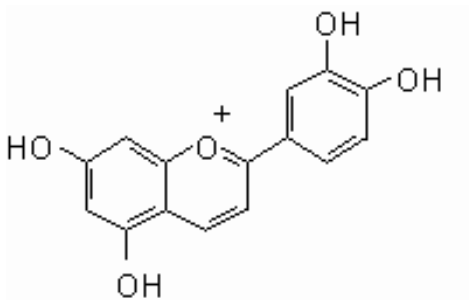
Jakožto účinný antioxidant, zneškodňuje aktivní formy kyslíku a má celou řadu pozitivních účinků. Vzhledem ke značnému významu tohoto polyfenolu, bylo vyvinuto několik analy-

tických metod umožňujících stanovení poměrného zastoupení *cis*- a *trans*- formy resveratrolu v rostlinách jednak na bázi kapilární elektroforézy [IBOLIA, 2005] nebo na bázi HPLC (kapalinové chromatografie) [ROMERO-PÉREZ, 2001].

1.1.3.5 Anthokyanidiny

Anthokyanidiny jsou méně stabilní aglykonovou formou anthokyanů, jež bylo v přírodě identifikováno přes 300 [KYZLINK, 1968].

Obr. 7. Strukturální vzorec kyanidinu:



Jsou to rostlinná barviva, která způsobují červené až modré zbarvení květů a lze je nalézt i v plodech a listech. Zástupci jsou např. kyanidin (Obr. 7.) barvící květ chrpy, petunidin (petunie) a pelargonidin - červené barvivo pelargoní. Tyto anthokyanové pigmenty doprovází řada dalších anthokyanů (bylo prokázáno 16 pigmentů), taninů, flavanolů, flavonolů, flavanonolů a jejich esterů [RODRÍGUEZ, 2009].

2 OBSAH POLYFENOLŮ VE VÍNĚ

Obsah fenolických látek ve víně závisí nejen na druhu a kultivaru rostliny, ale je ovlivněn také stupněm zralosti plodiny, vegetační dobou, umístěním svahu a také podmínkami zpracování a skladování. Chemické složení vína (obecně) je uvedeno v tabulce 2. Obsah celkových polyfenolů se pohybuje v bílých vínech mezi 150 - 250 mg/l, v červených vínech až do 4500 mg/l, podle způsobu zpracování [SAKKIADI, 2001]. Jednoduché fenolické látky se při zpracování vína váží na cukr a uvolňují se teprve během kvašení a skladování. Soubor fenolických látek je u vína důležitým předpokladem jeho dietetické hodnoty [MELZOCH, 2001]. Z fenolických kyselin obsahují hroznové mošty především kyselinu p-hydroxybenzoovou, vanilovou, gallovou, syringovou, salicylovou, p-kumarovou, kávovou a ferulovou. Vyskytují se volné, ale i vázané v různých sloučeninách, zejména s anthokyaniny, katechiny a kyselinou vinnou [HESS, 1983].

Koncentrace např. flavanolů v červených vínech je asi 30 krát vyšší, než ve vínech bílých [PAGANGA, 1996]. Resveratrol a další majoritní komponenty, jako jsou myrcetin (hexahydroxyflavon) a kvercetin (pentahydroxyflavon) [WATERHOUSE, 2002], obvykle představují 20-50% flavanolů 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, nebo s nimi interagují synergicky [RICE-EVANS, 1996]. V rostlinách jsou rozloženy do všech možných částí [BRAVO, 1998] a jejich ochranné účinky byly prokázány v mnoha *in vitro* a *in vivo* systémech [RECHNER, 2002].

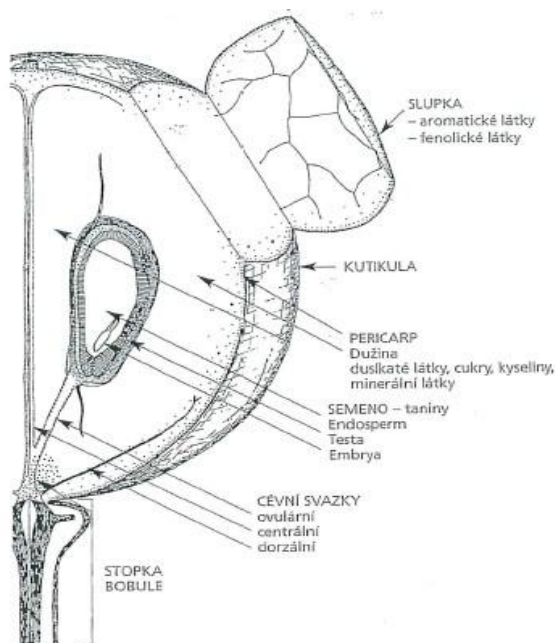
Tab. 2. Chemické složení vína:

Složka	Obsah v %
Voda	83
Alkohol	12
Cukr	1
Glycerin	1
Kyseliny	0,8
Dusíkaté látky	0,3
Ostatní (CO ₂ , vitamíny, aromatické a fenolické látky, barviva)	1,8

V plodech révy vinné a tím pádem i ve víně, jsou hlavními zástupci polyfenolických látek katechiny (flavan-3-oly) [SAUCIER, 1999]. Kromě vína obsahují katechiny ve vyšším množství také švestky, čaj (především zelený), jablka a drobné bobulové ovoce. Nejlépe prostudovány jsou katechiny právě v révě a zeleném čaji a jejich účinky na organismus člověka jsou velmi různorodé [SAKKIADI, 2001].

Jelikož zrníčka hroznů obsahují především epikatechin a katechin, lze si pak snadno odvodit, že čím více zrníček je v kilogramu hroznů, tím větší obsah flavanolů můžeme ve víně očekávat. Také platí, že odrůdy hroznů s malými plody dodávají vínu více polyfenolů, než ty větší [NIKFARDJAM, 2006]. Zatímco tyto monomery poskytují vínům hořkost, další skupina polyfenolů zvaná proantokyanidiny, je zodpovědná především za tříslovitost (tzv. adstringenci) vín [FUJITA, 2005]. Proantokyanidiny, neboli kondenzované taniny, jsou polymerní flavanoly zodpovědné za hořkost a tříslovitost hroznů a vín. Běžným zdrojem těchto polyfenolů jsou kromě vína, také jablka, hrušky, čaj, čokoláda a kakao [ČEPIČKA, 1995].

Obr. 8. Průřez bobulí révy vinné:



V modrých odrůdách révy dominují anthokyany, které patří mezi jejich nejdůležitější barviva. Jsou to červená barviva, která najdeme také v třešních, švestkách, nebo rybízu. Jejich obsah kolísá v rozmezí 0,15 – 4,5 mg/g u čerstvého ovoce (révy) [MINÁRIK, 1986] a průměrný obsah ve víně je pak 26 mg/l. Co je v modrých odrůdách ještě odlišné od bílých,

je obsah fenolkarboxylových kyselin, který je u červených vín obecně vyšší, než u bílých. Průměrně se ve víně jejich obsah pohybuje v rozpětí 30 – 100 mg/l, pro bílá vína však pouze 1 – 15 mg/l. V hroznech se nejčastěji vyskytují ve formě monoglykosidů a až 70 % antokyanů tvoří malvidin [SLANINA, 2004].

V hroznech jsou nejdůležitější tři flavonoly – kvercetin, myricetin a kemferol. Všechny tři pigmenty se nacházejí v hroznech modrých odrůd, zatímco u bílých odrůd se vyskytuje pouze kvercetin a kemferol. Množství kvercetinu v plodech révy vinné je přímo úměrné délce a intenzitě slunečního svitu během jejího vegetačního cyklu [SOUTO, 2001] u nás maximálně 1300 h/rok. V menším množství se tyto látky v hroznech nacházejí jako flavononoly (např. dihydrokvercetin, nebo-li taxifolin), které mají ve srovnání s flavonoly světlejší barvu [ODSTRČIL, 2006].

Obecně platí, že vína ze severnějších zemí, kam patří i naše vinařské oblasti, mají více jednoho flavonoidu, než vína ze zemí jižních. Tímto flavonoidem je resveratrol [KOHOUT, 1986]. Průměrně je jeho obsah ve víně 2-6 mg/l, ale existují výjimky. Například v Burgundských vínech je zastoupen až 7 mg/l, naproti tomu u vín z Austrálie, Jižní Ameriky a Kalifornie bylo tohoto antioxidantu méně než 1,5 mg/l vína. Je tomu tak proto, že ho réva vinná produkuje jako ochranu proti infekci. Nevyskytuje se jen v červených odrůdách, ale obsahují ho převážně odrůdy odolné proti plísním a hnilobám, zvláště pak hybridy některých bílých odrůd [KUTTELVAŠER, 2003].

Tab. 3. Obsah fenolických látek ve víně:

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

Je možné, že příznivý účinek resveratrolu ve víně souvisí s poměrem koncentrací jeho *cis-* a *trans-* formy. Stanovení těchto forem resveratrolu měřil kapilární elektroforézou Karel Melzoch (2001) s kolegy z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze a stanovil hladinu resveratrolu ve více jak stovce českých a moravských vín. Množství tohoto polyfenolu v českých odrůdách révy vinné bylo srovnatelné s vyhlášenými francouzskými víny z Burgundska a z Bordeaux, což je dáno především geografickou polohou. Kromě resveratrolu jsou ve víně obsaženy i další látky jako genistein, nebo procyanidin, který je nejvíce obsažen v semenech révy [NIKFARDJAM, 2006]. Využití procyanidinu v lékařství je pouze okrajové, více je používán v kosmetickém průmyslu [STAGOS, 2005].

Hygienicky sledovaným konzervantem, zvláště u bílých vín, je množství kyseliny sorbové [KUTTELVAŠER, 2003], která se dá simultánně stanovit elektroforetickou metodou [RYAN, 2002]. U výroby šumivých vín, která mají nižší obsah polyfenolů, se využívá toho, že lisováním celých hroznů bez narušení bobulí se získává světlý mošt z bílých, červených i modrých hroznů. Z modrých hroznů vytéká při vylisování bezbarvý mošt, protože červené barvivo se vyskytuje ve slupkách hroznů a pokud se s ním nefermentují, barviva do nich nepřejdou [SU, 1991]. Dobrým zdrojem těchto fytochemikálií jsou hroznová semena a slupky. Během zrání a stárnutí vín v nich dochází ke značným změnám obsahu polyfenolů, které mají vliv na chuť i barvu vína [HARRINGTON, 2008]. Pro odrůdový charakter vína mají velký význam terpeny, což jsou aromatické látky vážící se na cukr a teprve během kvašení a skladování, jsou uvolňovány a způsobují aroma vína. Jedním z produktů pyrolýzy fenolických kyselin na vzduchu (při 200°C) je vanilin, dávající vanilkové aroma barikovému vínu [RODRÍGUEZ, 2009].

3 VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÝ ORGANISMUS

Hrozny révy vinné a z nich vyrobené víno jsou bohatým zdrojem polyfenolů a představují důležitou složku stravy pro některé populace. V uplynulých letech vzniklo velké množství literatury věnované studiu potenciální, antikarcinogenní a chemopreventivní aktivity polyfenolů vína [HOLMES-McNARY, 2000]. Mnoho z těchto studií potvrdilo, že mírná konzumace vína (nebo jen červeného vína) je lidskému zdraví prospěšná [MIDDLETON, 2000]. Již ve starém Řecku a Římě byly vínu (a zvláště červenému) přisuzovány léčivé a posilující účinky a propojení mezi polyfenoly a nádorovými onemocněními, bylo studováno po mnoho let. Pozornost, pokud jde o protirakovinný efekt, byla věnována převážně vinným polyfenolům, nebo polyfenolům v čaji, ale najdeme je také v obilovinách, extra panenském olivovém oleji, sušených luštěninách, čokoládě a kakau [NEVILLE, 2008]. Jejich ochranný účinek byl potvrzen jak *in vitro*, tak *in vivo*. Polyfenolům byly přisouzeny různé biologické účinky, jako např. schopnost působit jako antioxidanty, selektivní estrogenové receptory, modifikátory, nebo antikarcinogenní a protizánětlivé látky [SLANINA, 2004].

V současnosti roste zájem o studium těchto přírodních látek, protože jejich příjem v potravě je obecně dáván do souvislosti se snížením výskytu závažných civilizačních onemocnění, jako je rakovina a kardiovaskulární choroby [HARRINGTON, 2008]. Extrakt z hroznů byl také úspěšně vyzkoušen v boji proti bakteriálním nákazám *Escherichia coli*, nebo *Staphylococcus aureus* [KOHOUT, 1986]. Mohou chránit lipoproteiny o nízké hustotě před oxidační modifikací, která je považována za jeden z klíčových dějů při rozvoji aterosklerózy. Mohou působit proti vzniku krevních sraženin a tím snižovat riziko infarktu myokardu [SCALBERT, 2005], nebo mozkové mrtvice [ŠVEJCAR, 1976] a mimo jiné mohou omezit riziko degenerativních onemocnění spojených s oxidačním stresem [RICE-EVANS, 1996], jako je diabetes typu II. [LIU, 2004]. Látky s tak širokou účinností, nízkou toxicitou a jen velmi málo nežádoucími vedlejšími účinky, se stávají potenciálně velmi vhodnými, pokud jde o tradiční chemoterapeutika [BODE, 2006].

V roce 1947 objevil Jack Masquelier z Univerzity v Bordeaux antioxidant OPC (oligomeric proanthocyanidins) a následně se mu podařilo v dalších letech izolovat ze semen révy procyanidin, který má 18 krát větší antioxidační schopnosti, než vitamín C a je 50 krát účinnější, než vitamín E [KALLITHRAKA, 2001]. Rostlinné fenoly mají důležitou roli v

řadě fyziologických procesů. Mohou vystupovat např. jako přenašeče elektronů, strukturní či impregnační látky, signální molekuly, mohou rostlinu chránit před UV zářením, nebo se podílet na lákání opylovačů apod. [LUŠTINEC, 2003].

O červených odrůdách vinných hroznů je známo, že mají baktericidní vlastnosti a užívají se při žaludečních a střevních potížích. Tzv. tříslovitá vína se dříve předepisovala při epidemiích tyfu, cholery a úplavice [ŠÁRŠŮNOVÁ, 1990]. Málo je však známo o tom, zda a v jakém množství jsou rostlinné polyfenoly resorbovány z trávicího traktu člověka, jaké je rozpětí koncentrací v krevní plazmě, nebo jak jsou tyto látky metabolizovány a vylučovány z organismu. Rovněž znalosti o jejich množství v potravinách nejsou zdaleka kompletní [SLANINA, 2004]. Nejvýznamnější vlastností polyfenolů, které mohou mít vliv na karcinogenezi, je zachycení základních karcinogenů, inhibiční opatření proti nitrozační reakci, inhibice buněčné proliferace souvisejících s činností, indukce apoptózy buněk, zastavení buněčného cyklu, blokáda vazby mitotického signálu přes modulace receptoru pro růstový faktor, jaderná onkogenová exprese, inhibice syntézy DNA a modulace ze signálních drah podle změny exprese klíčových enzymů, jako jsou cyklooxygenázy a proteinkinázy [RECHNER, 2002].

Fenolické kyseliny v přírodě také vystupují jako fungicidy a bakteriostatika chránící rostlinu před různými chorobami. V rostlinách se tyto látky vyskytují hlavně v *trans*-formě, avšak působením UV záření mohou přecházet na *cis*-formu [BUCHANAN, 2000]. Mohou chránit buňky před nádorovou přeměnou kolonocytů svým antiproliferativním účinkem a indukcí apoptózy [LIPSKÁ, 2009]. Apoptóza je geneticky kontrolovaná a evolučně konzervovaná podoba buněčné smrti, která má zásadní význam pro normální vývoj embrya a zachování homeostázy tkáně v dospělém organismu. Porucha strojní smrti může hrát hlavní úlohu při různých patologických procesech, protože příliš málo nebo příliš mnoho apoptózy, může vést k proliferativnímu či degenerativnímu onemocnění. Rakovinné buňky se vyznačují deregulací jaderného dělení a/nebo neschopností podstoupit programovanou buněčnou smrt [KHAN, 2007].

3.1 Kvercetin

Z konkrétních polyfenolických látek, které ovlivňují lidské zdraví, je jedním z nejvíce zkoumaných kvercetin. Jeho antioxidační schopnost je díky jeho chemické struktuře mimořádná a je účinnějším antioxidantem, než vitamíny C a E. Protože je silně hydrofobní, při-

jímá ho tělo lépe rozpuštěný v alkoholu, než v přirozené formě. Má schopnost rozpouštět krevní sraženiny (prevence trombózy) a působí protizánětlivě. Zabraňuje poškození buněčné DNA a inhibuje působení enzymů, které podněcují růst nádorů. Pomáhá v boji s aterosklerózou, působí proti zánětům a bakteriálním, myotickým a virovým infekcím [SUJAK, 2006]. Také usnadňuje absorpci a udržení hladiny vitamínu C [RICE-EVANS, 1996], zvyšuje pevnost kapilár a reguluje jejich prostupnost [SOUTO, 2001].

Na druhé straně je nutno říci, že některé flavonoidy, a mezi nimi i kvercetin, nevykazují jen aktivitu antioxidační, ale v některých případech také prooxidační. Nejnovější výzkumy ukazují, že alkylace hydroxyskupiny v poloze 7 zvyšuje záchyt radikálů a naopak kvercetin a jeho deriváty s volnými hydroxyskupinami, mající v části molekuly strukturu pyrokatechinolu s volnou hydroxyskupinou v poloze 3, mohou za určitých okolností vykazovat prooxidační aktivitu [DELAGO, 2002].

3.2 Katechiny

Katechiny mají, stejně jako kvercetin, schopnost omezovat agregaci trombocytů (shlukování krevních destiček), čímž působí na snižování rizika vzniku krevní sraženiny uvnitř cévy vedoucí k náhlé příhodě cévní (infarkt myokardu, mozková mrtvice) [LEE, 2000]. Obecně jde o inhibici enzymů odpovědných za metabolismus prostaglandinů a leukotrienů, tedy látek stupňujících zánětlivé procesy v organizmu. Po chemické stránce mají redukční a antioxidační vlastnosti, což je schopnost zneškodňovat tzv. volné radikály. Výzkumy prokazují vliv katechinů na růst a dělení nádorových buněk, konkrétně rakoviny zažívacího traktu [FUJITA, 2005] a mechanismus tohoto účinku se intenzivně zkoumá. Podílí se také na akumulaci vitamínů C, B1, B2 a B6 v lidském těle [NIKFARDJAM, 2006].

3.3 Flavony

Flavony mají antioxidační účinky, kterými zastavují růst nádorových buněk prostřednictvím inhibice replikace DNA a snížením aktivity různých enzymů [ČEPIČKA, 1995]. V posledních letech enormně vzrostl vědecký i veřejný zájem o flavony díky jejich prospěšnému účinku nejen proti ateroskleróze, ale také proti osteoporóze, cukrovce a některým druhům karcinogenních onemocnění [SOUTO, 2001]. Z této skupiny, je největší pozornost věnována resveratrolu.

3.3.1 Resveratrol

Resveratrol působí proti srážlivosti krve a potlačuje aktivitu cyklooxygenázy-1 (COX-1) a hyperoxydáz. Ovšem k prevenci rakoviny stopová množství resveratrolu v běžné potravě nestačí. Při testech na laboratorních zvířatech byla zjištěna účinná denní dávka k prevenci rakoviny cca 500 µg. Pro člověka by to tedy bylo (úměrně hmotnosti) cca 500 mg/den [MELZUCH, 2001]. Objevují se vědecké práce, které prokazují příznivé působení resveratrolu na útlum dělení nádorových buněk a podporu jejich zániku, apoptózou (sebezničení zhoubné buňky). Tyto účinky byly prokázány *in vitro* i *in vivo*. Přítomnost tohoto polyfenuolu zvyšuje koncentraci enzymu chinonreduktázy, která metabolicky detoxikuje karcinogeny [ŠMIDRKA, 2001]. V roce 1997 přišel B. Gehm z Lékařské fakulty Severovýchodní univerzity v Chicagu se zajímavým vysvětlením protirakovinného působení resveratrolu. Všiml si, že vzorec resveratrolu nápadně připomíná diethylstilbestrol – syntetický analog estrogenu, který se používá, mimo jiné, při studiu rakovinného procesu. Vzhledem k této podobné struktuře zjistil, že resveratrol může zasahovat do činnosti estrogenu např. vázat se na stejné estrogenové receptory na buňkách a tím regulovat množství estrogenu, nebo snižovat příznaky menopauzy [GEHM, 1997]. Laboratorní testy tuto hypotézu potvrdily.

Z dalších účinků je dokázáno, že resveratrol pomáhá léčit chronickou bronchitidu, [NIKFARDJAM, 2006] rozedmu plic [TOTUŠEK, 2000], snižuje riziko zápalu plic [ROMERO-PÉREZ, 2001] pomáhá z těla odstraňovat škodlivé látky vznikající jako následek uvedených onemocnění a zpomaluje poškození organismu spojené se stárnutím. Příčinou stárnutí buněk a jejich ničení jsou volné radikály, které vznikají při energetických přeměnách v buňkách. Současné výzkumy prokazují zásadní vliv resveratrolu na inhibici změn DNA, způsobené stárnutím u kvasinek, hmyzu a myší [KHENNOUF, 2003].

3.4 Proanthokyanidiny

Proanthokyanidiny vykazují adstringentní účinky (stahují dásně – u tříslovin, zubní pasty), [De RIDDER, 1978] a výskytem jsou obvykle asociovány s flavanolovými katechiny. Mají schopnost inaktivovat kyslíkové radikály a chelátovat ionty kovů, a proto mohou hrát významnou roli v prevenci před různými degenerativními onemocněními, zapříčiněnými oxidativním stresem [ROP, 2009].

3.5 Francouzský paradox

Označení „Francouzský paradox“ zná dnes již široká laická veřejnost a je používán takřka desítky let. Hlavní podstatou tohoto jevu je, že přestože si Francouzi jídlo vychutnávají a nedovedou si ho představit bez čerstvého ovoce, zeleniny a ryb, prokládají svůj jídelníček vysoce tučnými pokrmy [ŠEVČIK, 1999]. K tomu faktu je navíc francouzský národ známý častým ponocováním a vysokou spotřebou cigaret a alkoholu. Přes všechna tyto negativa mají ve Francii nejnižší výskyt infarktů a cévních onemocnění u obyvatel ve věkové skupině 55 až 64 let (počítáno na 1000 obyvatel), kde je riziko těchto onemocnění nejvyšší. To je přisuzováno faktu, že k jídlu popíjejí sklenici kvalitního vína. Francouzská medicína léčebných vlastností révových vín využívá již po dlouhá staletí.

Zjistilo se, že při pravidelném užívání mírného množství vína (alkoholu), a to hlavně spolu s jídlem, se snižuje výskyt kardiovaskulárních chorob [KRAUS, 2008]. Strava, ke které se víno připíjí, by však měla být bohatá na vitamíny, protože alkohol způsobuje vyplavování vitamínů z krve, a proto se musejí neustále doplňovat. Dlouhodobým pozorováním se prokázalo, že účinek vína není zapříčiněn alkoholem v něm obsaženým, nýbrž souvisí s obsahem minoritních složek vína [MELZUCH, 2001]. Zvýšený příjem červeného vína, které je zvláště bohaté na polyfenoly, je jedním z pravděpodobných vysvětlení francouzského paradoxu. Epidemiologická data informují o korelaci mezi množstvím flavonoidů v potravě a snížením rizika kardiovaskulárních onemocnění, v některých provedených klinických studiích o více než 50% [LACHMAN:online]. Nižší pravděpodobnost nádorových onemocnění u osob, které konzumují více potravin bohatých na polyfenoly, není tak zřejmá a akceptovaná u odborné veřejnosti, jako je tomu u kardiovaskulárních onemocnění [PLANAS-SILVA, 1997].

Přesto jsou studie, které naznačují, že příjem potravin obsahující určité polyfenoly, mohou chránit organismus před některými formami rakoviny, především rakoviny plic, trávicího traktu, rakoviny prostaty u mužů a rakoviny prsu u žen [KYSELÁKOVÁ, 2003]. Rovněž řada experimentů na laboratorních zvířatech a nádorových buňkách prokázala antikarcinogenní účinky těchto látek [SLANINA, 2004]. Předpokládá se, že na protektivním (ochranném) účinku se podílí schopnost rostlinných polyfenolů zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály [PREISSMANN, 1997].

4 BUNĚČNÉ KULTURY

Abychom pochopili vliv polyfenolických látek na buňky, je třeba znát buněčné procesy, jako je růst, dělení, rozmnožování apod. Pro kultivaci v laboratorních podmínkách je vyvíjena snaha poskytnout buňkám ideální podmínky (složení média, teplota, pH) a sledovat jejich chování za těchto podmínek, aby byly výsledky co nejlépe převeditelné do reálné léčby. Následující kapitoly proto budou věnovány právě této problematice [TOZER, 1964].

4.1 Buněčný cyklus

Životní cyklus buněk se skládá ze čtyř fází. Ve fázi M (mitóza) chromatin kondenzuje do chromozomů a dvou jednotlivých chromatid, které tvoří chromozom. Cílem je tyto dvě individuální chromatidy tvořící chromozóm oddělit tak, aby byla každá dceřiná buňka samostatná. V G1 fázi buňka postupuje k syntéze DNA a k dalšímu dělení buněčného cyklu. Během této fáze prochází buňka řadou kontrolních bodů, které určují, zda buňka bude opětovně vstupovat do cyklu, odstoupí z něj, nebo ho ukončí a rozdělí se. Po G1 fázi následuje fáze S, ve které se buňka připravuje na opakovaný vstup do mitózy [ŠÁRŠŮNOVÁ, 1990]. Kontrolní bod na počátku syntézy DNA a G2 fáze stanoví integritu DNA a zastaví buněčný cyklus, aby se DNA opravila, nebo uvedla do apoptózy, pokud oprava není možná. Apoptóza, nebo-li programovaná buněčná smrt, je regulovaný fyziologický proces, kterým může buňka být odstraněna z populace [FRESHNEY, 2005].

Vstup do buněčného cyklu je regulován signály z prostředí. Nízká hustota buněk umožňuje jejich vstup do cyklu za přítomnosti mitogenních růstových faktorů, jako epidermální růstový faktor (EGF), faktory fibroplastického růstu (FGFs), nebo krevní destičky odvozené od růstového faktoru (PDGF) interagující s receptory povrchových buněk. Vysoká hustota buněk inhibuje proliferaci normálních buněk (i když ne transformovaných buněk). Inhibice proliferace buněk je iniciována kontaktem, zdůrazněna shlukováním a výsledkem je změna tvaru buněk, která snižuje jejich schopnost šíření a přežití [PLANAS-SILVA, 1997].

4.2 Růstový cyklus

Pokaždé, když je buněčná linie přeočkována, bude se následně snažit rozrůst zpět na hustotu buněk, která existovala před zásahem (v mezích její omezené životnosti). Tento proces

je dobře popsitelný vynesemím růstové křivky ze vzorků odebraných v časových intervalech v průběhu vegetačního cyklu, kde je dobře viditelné, jak dlouho buňkám vstupujícím v latentním období trvá se opět rozmnožit na původní počet (od několika málo hodin až do 48 h, ale obvykle je to v průměru 12-24h) [TROWELL, 1959]. Tento proces jim umožňuje zotavit se z tripsinizace, rekonstruovat své cytoskelety a vyloučit matrix s cílem zabránit přilnutí na podklad. Tato doba se označuje jako „Population Doubling Time“ a je specifická pro každou linii. A umožní jim znovu vstoupit do buněčného cyklu. Jelikož se následně buněčná populace stává příliš hustou, buňky se zabalí, aby se méně rozšířily na plochu média a nakonec úplně odstoupí z buněčného cyklu. Buňky následně vystoupí na povrch nebo stacionární fázi, kde růst klesne téměř na nulu [STOKER, 1973]. Obecná diferenciací buněk v tkáních má omezenou schopnost množení. Nicméně, diferencované buňky nepřispívají k tvorbě primárních kultur, pokud nejsou dodrženy zvláštní podmínky na podporu jejich udržení a zachování jejich rozdílného postavení [BUTLER, 1994].

4.3 Stanovení viability buněk

Analýza viability (životnosti) a apoptózy se stanovuje na základě testů založených na kompaktnosti zdravé buňky a jejím „správném“ chování, nebo na stanovení biochemických a molekulárně biologických parametrů [ALBERTS, 1998]. U testů prvně zmíněných, se sledují morfologické změny (apoptická tělíska, výběžky), schopnost vylučovat barviva živými buňkami (eosin, bromfenolová modř pro detekci ve VIS spektru, propidium iodid pro fluorescenci, aj.) a jejich enzymatická aktivita, nejčastěji esterázy [FRESHNEY, 2002].

U adherentních buněk lze hodnotit počet adherovaných a plovoucích buněk (mrtvých / apoptických). Mezi testy založenými na stanovení biochemických a molekulárně biologických parametrů je fragmentace DNA (elektroforetický = tzv. apop. žebříček DNA), aktivita specifických proteáz tzv. kaspázy, detekce fragmentace substrátů kaspas, výška hladiny pro- a anti-apoptických proteinů Bcl-2 a kompaktnost mitochondrií, založená na změně v polarizaci mitochondriální membrány [SAMBROOK, 1989].

4.4 Buněčné linie

Buněčná kultivace 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. Buněčné linie se dají rozdělit dvěma způsoby. Podle

původu a vlastností kultury linie se dělí na primokultury a permanentní linie. Podle způsobu kultivace jsou buňky adherentní nebo suspenzní [HAM, 1965].

Všechny postupy používané při sběru materiálu pro lidské kultury musí být předány příslušnému etickému výboru nemocnice. Formulář podepsaný pacientem povoluje použití tkáně pro výzkum a ten se pokud možno vzdává vlastnictví jakéhokoliv materiálu získaného z tkáně. Formulář by měl být stručný, laického popisu cílů, práce a měl by obsahovat jméno vedoucího vědce, který na projektu pracuje. Dárci by měla být poskytnuta kopie tohoto formuláře [FRESHNEY, 2005]. Zdrojem buněčné kultury může být tkáňová banka, nebo lze získat tkáň darem např. American Tissue Culture Collection (www.atcc.com). Příprava kmenů (populace) nebo klonů (z jednotlivé buňky) z nádorů začíná izolací nádoru. Následuje enzymatická disociace na buněčnou suspenzi, kultivace buněk ve vhodných podmínkách, selekce zajímavých kmenů (klonů) a nakonec jejich charakterizace. V průběhu kultivace musí linie vykazovat dostatečnou stabilitu, aby byla zachována reprodukovatelnost výsledků. Popis nově získané linie by měl obsahovat co nejvíce jejích charakteristik: původ, typ nádoru, věk a pohlaví dárce, způsob získání, počet pasáží od jejího ustanovení, atd. [AUSUBEL, 2002].

Růst buněk v médiu může probíhat tak, že se buňky v kultuře nedělí a je třeba periodicky měnit kultivační médium (terminálně diferencované, postmitotické buňky), nebo se buňky v kultuře dělí (tzv. proliferují) a je třeba je pasážovat. Do této skupiny spadá většina buněk (primokultur i permanentních linií) [BODE, 2006]. Pasážování je periodické ředění buněk, obecně spojené i s výměnou média. Z enzymů se zde používá nejčastěji trypsin a kolagenáza, ale dá se použít také inaktivace speciálními inhibitory, vyředěním, nebo nadbytkem proteinů (např. sérem) a přidávají se také látky podpůrné (např. EDTA, zejména na vychytávání Ca^{2+}) [WESTERMARK, 1975].

4.4.1 Primokultury

První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu (primokulturu), jenž obsahuje buňky čerstvě izolované z organismu. Poté, co se buňky namnoží, nařadí se a přenesou do kultivačních nádob. Tento postup obvykle označujeme jako pasáž a vzniká jím tzv. sekundární kultura, čili subkultura. Buňky se v sekundární kultuře pěstují tak dlouho, dokud se nezíská dostatečné množství materiálu pro práci s nimi [PARKER, 1957]. Primokultury jsou buňky izolované většinou ze zdravé tkáně, nebo-li obecně zdravého genomu,

který však má většinou omezené možnosti kultivace. Pokud jde o zakládání primokultury, mohou se buňky rozlišit na buňky pocházející ze zdravé tkáně a na ty z nádorové tkáně. Nádorové buňky se svými vlastnostmi od normálních buněk liší [MORGAN, 1950]. Zpravidla se lépe množí a obecně se snáze kultivují. Kultury normálních buněk mají omezenou životnost. Po několika pasážích dochází k tzv. zestárnutí kultury, kdy buňky změní své vlastnosti a přestanou se dělit. Nádorové buňky většinou stárnutí nepodléhají. Po převedení do kultivačního média přežijí pouze ty buňky, které byly lépe přizpůsobeny daným podmínkám. Existují zpravidla jen několik dní a pak je nutné je převést do nového média [TOZER, 1964].

4.4.2 Permanentní linie

Permanentní linie jsou nejčastěji tvořeny z buněk izolovaných z nádorů, ale mohou být i ze zdravé tkáně, případně z tkáně imortalizované (většinou obsahují chyby v genomu a jsou nestabilní, ale nesmrtelné) s následnou adaptací na podmínky *in vitro* [ALBERTS, 1998]. Pokud jsou buňky plně adaptovány na tyto podmínky, dělí se neomezeně a lze je přechovávat libovonně dlouho [McKEEHEN, 1976].

4.4.3 Adherentní buňky

Jsou-li buňky adherentní znamená to, že většina těchto buněk roste přichycena k podkladu. K uvolnění buněk se používá trypsin / EDTA [MATHER, 1998]. Ve většině případů je u adherentních linií nutno počítat s jejich zvýšenými nároky na kvalitu podkladu, na kterém rostou. Běžně se používá ošetření 0,01 – 0,1 % roztokem želatiny (prasečí nebo hovězí) v destilované vodě a podle potřeby a typu buněk se používají také ostatní proteiny extracelulárních matrix [CELIS, 1994]. Kultivace se provádí v monovrstvě v plastových nádobách, nebo na kultivačních destičkách. K adherenci je důležitý substrát, který často tvoří kolagen, laminin, elastin a také speciálně upravené plastové povrchy (např. elektricky nabité). Ke kultivaci se používají pouze definovaná kultivační média, která mají přesný obsah živin, solí, hormonů, kofaktorů, séra, atd. Buňky jsou obvykle kultivovány při teplotě 37°C v atmosféře 5-10% CO₂. Využívá se jich při nejrůznějších studiích např. metabolismu a toxicity xenobiotik [KARMIOL, 2000].

4.4.4 Suspenzní buňky

Suspenzní linie vznikají na rozdíl od primokultur prostým ředěním. Jsou jimi obvykle krevní buňky, které lze kultivovat i dlouhodobě a jsou to buňky proliferující. Provádí se s nimi studie toxicity, molekulárních mechanismů a proliferace. Tvoří je buňky izolované z orgánů (např. hepatocyty), které prochází krátkodobou kultivací (řádově hodiny) [FRESHNEY, 2002].

5 KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

Provozování tkáňových kultur spočívá v zajištění optimálních podmínek pro růst a přežívání kultivovaných buněk (tkání). Podmínky dělíme na fyzikální, chemické a biologické a tyto faktory je třeba regulovat i za běžných laboratorních podmínek. Důležitými faktory jsou teplota, osmotický tlak, hodnota pH, množství kyslíku, oxidu uhličitého a další parametry. Buňky se kultivují při optimální teplotě pro daný organismus, ze kterého byly izolovány [LESKO, 1975].

5.1 Teplota

Optimální teplota pro buněčné kultury je závislá nejen na tělesné teplotě organismu, z nichž byly buňky získány, ale také na jakémkoliv anatomickém rozdílu v teplotě (např. teplota kůže jedné části těla může být nižší, než na zbytku těla), a také na začlenění bezpečnostního faktoru, umožňujícího drobné chyby v regulaci inkubátoru [SU, 1991]. Doporučená teplota pro většinu linií odvozených z buněk teplokrevných živočichů (myš, krysa, makak, pes, člověk) je 37°C. Vzhledem k vyšší tělesné teplotě u ptáků by se ptačí buňky měly udržovat při teplotě 38,5°C pro maximální růst, ale i při 37°C buňky vykazují růst uspokojivý, pouze pomalejší. Pro buněčné linie odvozené od poikilotermních živočichů (ryby, hmyz, háďátko - *Caenorhabditis*) se doporučuje teplota 10 - 25°C.

Savčí buňky tolerují značné poklesy teplot. Mohou přežít několik dní při 4°C a lze je zmrazit až na teplotu -196°C, ale delší dobu při > 40°C nevydrží a poměrně rychle odumírají. Pozornost musí být věnována nejen výšce, ale také stabilitě teploty (v rozsahu $\pm 0,5^\circ\text{C}$) k zajištění reprodukovatelných výsledků [FOSTER, 1992].

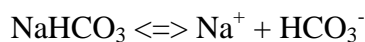
5.2 pH a atmosféra CO₂

Pro hodnotu pH bylo stanoveno optimum 7,4, při kterém roste většina buněčných linií optimálně. Ačkoliv je optimum ve většině případů konstantní, ne vždy je ideální. Některé fibroblastové linie dosahují nejlepších výsledků při pH 7,4 - 7,7 a transformované buňky mohou růst lépe při pH 7,0 - 7,4. Byla také stanovena hodnota pH 5,5, při které by měly být epidermální buňky udržovány [EISINGER, 1979], avšak tato úroveň nebyla všeobecně přijata. Ve zvláštních případech je výhodné udělat krátký experimentální růst k potvrzení účinnosti testu, nebo může být určena speciální analýza, určující optimální pH

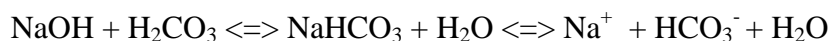
[FRESHNEY, 2002]. Jako indikátoru při určování pH se běžně používá fenolové červeně. Ta je červená při pH 7,4 a stává se oranžovou při pH 7,0. Při poklesu na pH 6,5 se barví do žluta a citronově žlutá je pod pH 6,5. Růžovou barvu má při pH 7,6 a fialovou u pH 7,8 [EAGLE, 1973]. Protože hodnocení barev je velmi subjektivní, je vhodné využít soubor norem za použití sterilního vyváženého solného roztoku (BSS) s fenolovou červení na určení správné barvy při stejné koncentraci, ve stejném typu láhve a se stejným obsahem vzduchu, který se běžně používá k přípravě médií. Z plynů je důležitý především CO₂ a hydrogenuhličitan. Oxid uhličitý v plynné fázi se rozpouští ve střední stavové rovnováze s HCO₃⁻ ionty a snižuje pH. Vzhledem k tomu, že rozpuštěný CO₂ a HCO₃⁻ jsou s pH vzájemně provázané, je obtížné určit hlavní přímý účinek CO₂. Atmosférický CO₂ je přímo závislý na teplotě a toto pravidlo brání tvorbě H₂CO₃, který oddělí závislost na reakci.



HCO₃⁻ má poměrně nízkou disociační konstantu s více dostupnými kationty, tudíž inklinuje k obnově asociace vylučování kyselého média. Výsledkem zvýšení atmosférického CO₂ je pak snižování pH, tudíž efekt zvýšeného CO₂ se neutralizuje zvýšením koncentrace hydrogenuhličitanu:



zvýšená koncentrace HCO₃⁻ posouvá rovnici doleva, dokud se nedosáhne rovnováhy při pH 7,4. Pokud je používáno jiné alkalické činidlo (např. NaOH), zůstává konečný výsledek stejný.



Kultury v otevřených nádobách je nutno inkubovat v atmosféře CO₂, jehož koncentrace je v rovnováze s hydrogenuhličitanem sodným v médiu [FRESHNEY, 2005]. Buňky se středně vysokou koncentrací ($\geq 1 \times 10^5$ buněk/ml) a pěstované v uzavřených nádobách, nemusí mít CO₂ přidáný do plynné fáze za předpokladu, že koncentrace hydrogenuhličitanu je udržována na nízké úrovni (4mm) a to zejména v případě, že buňky jsou producenty vy-

sokého obsahu kyselých metabolitů. Při nízkých koncentracích buněk (např. při klonování) je u některých primárních kultur však nutné doplnit CO₂ do plynné fáze uzavřených nádob. Je-li nutné odvětrávání, ponechá se víčko povolené, nebo lze použít uzávěr propustný pro CO₂ [GOOD, 1966].

Při přípravě média se jeho pH pufruje pomocí roztoků HCl (1M) a NaOH (1M). Hodnota pH v kultuře se mění v důsledku metabolismu buněk, zejména produkcí laktátu, CO₂ a dalších metabolitů. V průběhu kultivace je pH udržováno přítomnými ionty - zejména fosfátovými, proteiny s pufracími schopnostmi a velmi často systémem H₂CO₃ / CO₂, nebo také alternativně silně pufrujícími látkami jako HEPES, BES nebo TES [LESKO, 1975]. Kultivace může probíhat jako otevřená (s výměnou plynů - zejména přísun CO₂ z vnějšího prostředí), nebo uzavřená (bez výměny plynů - používá se přibližně polovina množství NaHCO₃). Při otevřeném systému kultivace se nejčastěji udržuje atmosféra s vyšším obsahem CO₂ - standardně 5% CO₂ (regulovaným přísunem ze zásobní bomby) a 95% vody regulovaným přísunem, nebo častěji spontánním odparem ze zásobníku [YAMADA, 1997].

5.3 Kyslík

Další významnou složkou plynné fáze je kyslík. Zatímco většina buněk potřebuje kyslík k dýchání *in vivo*, kultivované buňky jsou často vysokým podílem závislé především na glykolýze, která stejně jako v transformovaných buňkách, může být anaerobní. I když byly provedeny pokusy začlenit do procesu O₂ nosiče (obdobně jako hemoglobin v krvi), dosud tato praxe není ve veřejném používání a buňky se spoléhají hlavně na rozpuštěný O₂, který může být jedovatý, kvůli vysokému obsahu volných radikálů [BALIN, 1976]. Poskytnutí správného O₂ tlaku je tedy vždy kompromisem mezi požadavkem splnění dýchání a cílem vyhnout se toxicitě. Strategie zahrnující zvýšení a snížení hladiny O₂, byly zapojeny dle toho, jaké bylo začlenění volných radikálů, jako je glutathion, 2-merkaptóetanol nebo ditritiothreitol, aj., do média. Většina těchto strategií byla odvozena empiricky [FRESHNEY, 2005]. Kultury se v požadavcích na kyslík liší a hlavní rozdíl je mezi orgány a buněčnými kulturami [TROWELL, 1959]. Přestože atmosférický kyslík nebo nízký tlak jsou vhodnější pro většinu buněčných kultur, některé orgánové kultury, zvláště odvozené od pozdního stádia embrya novorozenců nebo dospělých, vyžadují až 95% O₂ v plynné fázi [De RIDDER, 1978]. Difúzně se mohou stát také omezující na porézní mikronosiče [PREISSMANN, 1997], protože nejvíce rozptýlené buněčné kultury preferují nižší tlak

kyslíku a některé systémy (např. lidské nádorové buňky v klonogenním testu [COURTENAY, 1978] a lidské embryonální plicní fibroplasty), žijí lépe v nižším tlaku atmosférického kyslíku, než je běžná úroveň. McKeehan (1976) např. uvádí, že s kyslíkem souvisí požadavek na selen v médiu, protože ten je kofaktorem v syntéze glutathionu [FRESHNEY, 2002].

5.4 Osmolalita

Osmolalita je koncentrace osmoticky aktivních látek v jednotce hmotnosti rozpouštědla. Obvykle se vyjadřuje v osm/kg nebo ve zlomcích této jednotky. Na rozdíl od osmolarity se jedná o množství látek v objemu rozpouštědla tj. bez rozpuštěných látek [HEELDT, 1997]. Nejčastěji kultivované buňky mají poměrně širokou toleranci pro osmotický tlak. Vzhledem k tomu, že osmolalita plazmy je asi 290 mosmol/kg, je rozumné předpokládat, že tato úroveň je optimální pro lidské buňky *in vitro*, ačkoli může být různá pro další druhy (např. kolem 310 mosmol/kg, nebo nad 320 mosmol/kg). I když jsou v podstatě přijatelné pro většinu buněk, jednou zvolená hodnota by měla zůstat konstantní na ± 10 mosmol/kg [WAYMOUTH, 1970]. Osmolalita je obvykle měřena poklesem uvolnění místa, nebo zvýšením tlaku par na médium. Měření osmolality je užitečným regulačním stupněm kvality, když si tvoříme média sami, protože pomáhá chránit před chybami ve vážení, ředění atd. To je zvláště důležité pro sledování osmolarity, pokud jsou nějaké alternace v konstrukci média. Přidání HEPES a léků rozpuštěných v silné kyselině nebo zásadě a následná neutralizace, mohou osmolaritu výrazně ovlivnit [FRESHNEY, 2005].

5.5 Média a séra

Na chemické faktory obecně lze nahlížet jako na média a jejich komponenty, v kterých buňky rostou a plyny, které tato média obklopují (případně jsou v nich rozpuštěny). Složení médií je velmi variabilní a vysoce specifické. Veškeré komponenty použité pro přípravu médií musí být vysoké kvality s minimem nežádoucích příměsí (minimální chemická čistota p.a. – pro analýzu) [WAYMOUTH, 1970]. Základem je voda a v ní rozpuštěné anorganické soli. Ty jsou zdrojem nezbytných iontů a hrají významnou úlohu v zajištění vhodného pH (optimum většinou 7.2 - 7.4) a osmotického tlaku (optimum většinou 280 - 320 mosmol/l). Osmotický tlak je roven koncentracím rozpuštěných iontů a nejzákladnější ionty obsažené v médiích jsou Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} a HCO_3^- [YAMADA,

1997]. Esenciální látky nutné pro růst buněk musí média obsahovat v dostatečném množství. Jsou jimi především sacharidy (většinou glukóza, jako zdroj energie), aminokyseliny (esenciální i neesenciální), vitaminy a stopové prvky [BUTLER, 1994].

Většina zejména savčích buněk, vyžaduje insulin (příjem glukózy), transferin (příjem železa), selen [ISCOVE, 1978] (nezbytný pro funkci oxidačně-redukčních enzymů) a další doplňky jako lipidy (mastné kyseliny), steroidní látky, hormony, peptidy, proteiny [BARNES, 1980], (ECM) extracelulární matrix a nukleosidy [CELIS, 1994]. Mnohé z těchto látek jsou zastupovány přidavkem tzv. séra (5 - 10 - 20%), v některých případech i jinými zdroji málo charakterizovaných směsí proteinů a dalších látek. Významnými doplňky jsou látky ochranné, jako např. 2- β -merkapt ethanol snižující oxidativní stres, nebo zdroj síry a antibiotik pro ochranu proti mikroorganismům, případně selekční agens [TOZER, 1964]. Z enzymů se používá nejčastěji trypsin a kolagenáza, ale také se využívá inaktivace speciálními inhibitory nebo vyředěním, nadbytkem proteinů (např. sérem) a přidávají se také podpůrné látky např. EDTA, zejména na vychytávání Ca^{2+} [McCORMICK, 1995].

Séra nejsou stejné kvality a mají různé stupně. Provádí se testy na přítomnost endotoxinů, testy na snášenlivost konkrétním typem buněk, na přítomnost virů, apod. Jsou také různého původu (USA, Austrálie), různé šarže, normální a inaktivní séra (inaktivace séra je jeho vystavení teplotě 56°C po cca 30-45 minut) a jsou také séra novorozenecká a dospělá [ALBERTS, 1998]. Nejčastěji se používá bovinní (fetální) sérum získané z plodů skotu, které obsahuje nízkou hladinu nízkoafinitních imunoglobulinů (protilátek), ale existují séra také z jiných zdrojů např. lidské, koňské, kozí, nebo myší [HYVONEN, 1988].

V některých speciálních případech je vhodné použít polotekutá až pevná média. Takové médium se připraví přidavkem agaru (je však třeba dávat pozor na přehřátí složek média během přípravy, která by neměla být mít více než 40°C), [KAMINSKA, 1990] methylcelulósy a fibrinogenu (po aktivaci fibrinu vzniká fibrinová síť). Je možné použít i čistě syntetické polymery např. metakryláty (tzv. hydrogely). Trvanlivost a uchování médií a jejich doplňků je vždy podle doporučení výrobce. Solné roztoky jsou stabilní i při R. T. (room temperature) 20°C [LESKO, 1975].

Většina složek média (aminokyseliny, vitaminy, sacharidy) je stabilní po dobu jednoho roku při 4°C při uchování ve tmě. Glutamin v roztoku se nejpozději po 3 měsících začne rozkládat, a proto je třeba ho přidávat samostatně ze zmrazeného zásobníku. Jeden rok při

4°C je stále považován za akceptovatelný, ale je možno jej nahradit médií s glutamaxem, apod. Sérum je použitelné při 4°C až 2 měsíce a při -20°C až 3 roky [SPECTOR, 1998]. Obecně platí, že při teplotách pod -70°C je vše stabilní minimálně 1 rok. Stabilita je závislá na tekutosti, alias kvalitě zmrazení roztoku, což je ovlivněno složením a koncentrací v něm rozpuštěných komponent. Např. soli a glycerol posouvají bod tuhnutí k nižším teplotám (při -20°C není 10% roztok glycerolu úplně zmrzlý) a DMSO (dimethylsulfoxidu) k vyšším teplotám (tuhne již při 6°C) [CELIS, 1994].

Termínem kompletní média se označují ta média, která mají všechny své složky a doplňky obsaženy v ideálním poměru a jsou dostačující pro specifikované použití. To je obvykle tvořeno od nějaké definované složky v médiu, např. glutamin, který je přidán těsně před použitím a různé jiné doplňky, jako je sérum, růstové faktory nebo hormony. Definovaný rozsah médií obsahuje od relativně jednoduchého MEM Eagle [EAGLE, 1959], které obsahuje esenciální aminokyseliny, vitaminy a soli, až po složitá média typu 199 (M199, [MORGAN, 1950], CMRL 1066 [PARKER, 1957], MB752/1 [WAYMOUTH, 1970], RPMI 1640 [MOORE, 1967] a F12 [HAM, 1965] a širokou škálu séra volného složení.

Součástí komplexních médií je větší množství různých aminokyselin včetně neesenciálních aminokyselin a vitaminů, které jsou často doplněny dalšími složkami (např. nukleosidy, trikarboxylovými meziprodukty cyklu, kyselinami, lipidy) a také minerály. V médiu F12 jsou koncentrace živin v celku nízké (bylo optimalizováno klonováním) a vysoké v modifikaci Dulbeccova MEM Eagle (DMEM) [DULBECCO, 1959], které je optimalizováno při vyšších hustotách buněk na virové množení. Barnes a Sato (1980) používali směs DMEM a F12 v poměru 1:1, jako základ pro jejich sérum, aby kombinovali bohatství F12 a vyšší koncentraci živin z DMEM. I když to není vždy úplně racionální, tato kombinace poskytuje empirický vzorec, který je vhodný jako základní médium k doplňování speciálními aditivami pro mnoho různých typů buněk [ALBERTS, 1998]. Protože hloubka kultivačního média může mít vliv na rychlost šíření kyslíku do buněk, je vhodné ponechat hloubku média v rozmezí 2-5 mm, ve statické kultuře. Některé typy buněk, např. bronchiální epitel a keratinocyty se dají rozlišovat lépe, když jsou umístěny na rozhraní vzduch - kapalina [McKEEHAN, 1976].

5.6 Antibiotika

Významným prevenčním agens v médiích jsou antibiotika. Mají svá kritéria pro použití, kterými jsou např., že nesmí inhibovat růst ani ovlivňovat metabolismus buněk, musí ochraňovat kulturu po celou dobu experimentu, musí být netoxická a bezpečná pro uživatele, kompatibilní s ostatními složkami média a rozpustná v netoxických rozpouštědlech. Funkcí antibiotik v médiu je ochrana proti mikroorganismům [HAM, 1978]. Nejčastěji se používá Penicilin/Streptomycin, nebo Gentamycin, příležitostně Tetracyklin, selekční Neomycin (G418, geneticin), Hygromycin, Puromycin, nebo speciální antibiotikum např.) mitomycin C [STAGOS, 2005]. Nejběžnější selekční antibiotika pro savčí buňky jsou G418 / Neomycin, Hygromycin B a Puromycin [DAMIANAKI, 2000]. Adherentní buňky pod selekčním antibiotikem u selekce buněčných klonů (při dostatečně nízké účinnosti transfekce nebo jejich influenci), tvoří samostatné kolonie, které lze mechanicky, případně za pomoci proteázy (trypsin, kolagenáza), oddělit. Suspenzní buňky pod selekčním antibiotikem, zejména buňky krve a jejich deriváty, které se volně vznášejí v médiu, je třeba rozklonovat mezním ředěním (někdy potřeba i u adherentních), nebo růstem ve viskózním médiu (agar apod.) [LESKO, 1975].

5.7 Práce s kulturami

Čisté materiály se podle svých vlastností a odolnosti sterilizují autoklávováním (120°C, po dobu 20-30 minut). Jsou to především různé solné roztoky, některé pufry, agar, želatina (kolagen) apod. Suchým teplem (na 180°C, po dobu 3-4h) se sterilizuje sklo, vzácně některé plasty (do 120°C). Zářením gama (vzácně i UV – jen povrchy) sklo, filtrováním vzduch (HEPA filtry s póry 0,3 µm) a roztoky (hlavně média a séra) se běžně čistí přes filtry s póry 0,2 µm [AUSUBEL, 2002]. Omytím (2-5% aldehydy, 70% EtOH, 2-5% fenol, 5-10% peroxid vodíku) lze sterilizovat nástroje, pracovní plochy, některé plasty a sklo (celkově může být málo účinné a poškozující čišťený materiál). Také plamenem (kovy, sklo), parami alkylačních činidel někdy v kombinaci s autoklávováním (etylén oxid) a speciálními aplikacemi, jako je dekontaminace filtrů flow-boxů, nebo dekontaminace místností formaldehydem, což je vždy problémem pro obsluhu [SPECTOR, 1998].

Všechny lidské materiály je nutno přepravovat jako potenciálně infikované a mělo se s nimi zacházet s opatrností. Vzorky by měly být přepravovány bezpečně zabalené ve dvou

vodotěsných kontejnerech [SAMBROOK, 1989]. Sekundární kultury by měly být řešeny v oblasti biologické bezpečnosti třídy II. a všechny vyřazené materiály autoklávovány, spáleny, nebo chemicky dezinfikovány. Každá laboratoř má vlastní biologické předpisy, které by měly být dodržovány, a kdokoliv by měl pochyby o nevhodné manipulaci, měl by kontaktovat místní bezpečnostní organizaci (pokud žádná není, vytvořit ji). Pravidla nelze zobecnit, jelikož se předpisy liší mezi jednotlivými institucemi a krajinami, ale dobrý základ lze získat v Caputo. (1996).

Při práci s kulturami by dveře inkubátorů, nebo horké místnosti neměly zůstat otevřené déle, než je nezbytně nutné a velké kusy nebo objemy kapalin umístěné v teplé místnosti by neměly být v blízkosti kultur. Prostorové rozložení teploty v inkubátoru, nebo horké místnosti, musí být rovněž jednotné. Neměla by existovat "chladná místa" a vzduch by měl proudit volně [LESKO, 1975]. To znamená, že při prvním uskladnění v inkubátoru, nebo v horké místnosti nesmí být velký počet nádob uskladněn spolu a musí mezi nimi být prostor pro cirkulaci vzduchu. Vzhledem k tomu, že plynná fáze do nádoby expanduje při teplotě 37°C, musí být odvětráván krátkým uvolněním uzávěru (od ½h - 1h po umístění nádob v inkubátoru), zvláště když jsou naskládány na husto [WYLLIE, 1992].

5.7.1 Zchlazování a zamrazování buněk

Zchlazování buněk se provádí pomalu a postupně v lázni s isopropylalkoholem (R.T.). Následuje přenos přímo do hlubokomrazicího boxu (-80°C), kde teplota klesá rychlostí 1°C/1 min a nakonec se kultury zanořují do par tekutého N₂. V termoizolačním materiálu (např. pěnový polystyren) se buňky dávají přímo do hlubokomrazicího boxu a po 1-3 dnech se uskladní k trvalému uchování [CELIS, 1994]. Zamrazování buněk probíhá v kultivačním médiu se zvýšeným obsahem séra (20-100%), nebo se sérem (10-20-50%) s přídavkem DMSO (5-10%). Vzácně se používá zamrazování se sérem (10-20-50%) a přídavkem glycerolu (10%). Buňky je třeba zchlazovat postupně, nejprve na 80°C a poté se přenesou do ultra-hlubokomrazicího boxu (-185°C), nebo do tekutého N₂ (-196°C) k trvalému uchování. Je vhodné pro zmrazení používat vysoké koncentrace buněk (>107 buněk/ml média) [SAMBROOK, 1989].

5.7.2 Rozmrazování buněk

Rozmrazování buněk je naopak třeba provádět rychle. Buňky je potřeba co nejrychleji převést na kultivační teplotu, odstranit zmrazovací médium (centrifugací) a provést výsev k další kultivaci. Druhý den po vysetí je vhodné vyměnit kultivační médium za nové a odstranit tak zbytky buněk, které zamrazení (rozmrazení) nepřežily [ALBERTS, 1998].

5.7.3 Přeprava buněk

Přeprava buněk může probíhat několika způsoby. V termosce (lokální přeprava), zmražené 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 kultivační nádobce s nadbytkem média (v závislosti na buněčném typu 1 – 3 dny). Tkáně (s výjimkou krve) se přepravují podchlazené (ne zmrzlé) ve výživných médiích, často s přidanými kryo-protektivy, což jsou látky přidávané k biologickému materiálu při kryokonzervaci chránící buňky před účinky nízkých teplot a po rozmrazení je obvykle nutné je odstranit, např. DMSO [SPECTOR, 1998].

5.7.4 Monitorování infekce

Kultury je třeba průběžně monitorovat kvůli růstu nežádoucích mikroorganismů, ať už jsou to chomáčky plísní, pučící buňky kvasinek nebo řetízky bakterií. Pokud v kultuře nebo v zásobních roztocích roste něco, co tam nemá být, dochází k rychlému vyčerpání média a to změní jeho barvu z červené na žlutou, díky poklesu pH [EAGLE, 1973]. Buňky špatně rostou, jsou citlivější ke stresu, nemají správný tvar, adherentní buňky se pouštějí podkladu a to zkresluje výsledky experimentu. Proto se provádí tzv. mikroskopické barvení na celkovou DNA, což je zviditelnění mikroorganismů, zejména endoparazitů. Následuje stanovení specifických antigenů - imunocytochemie, nebo western-blot. Tato metoda umožňuje detekci specifických bílkovin v biologickém materiálu a zajišťuje přenos proteinů pomocí elektrického pole kolmého na původní směr separace. Výhodou je dlouhodobá fixace proteinů a možnost analýzy i po několika letech. Nevýhodou – časová a finanční náročnost. Detekce specifických sekvencí pro jednotlivé organismy se provádí metodou PCR a kontrolní kultivací médií samotných, nebo po přidavku specifických substrátů [YAMADA, 1997].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 METODIKA

Cílem práce bylo zjistit vliv polyfenolů extrahovaných z révy vinné na proliferaci nádorových buněk. V první fázi bylo nutné polyfenoly z vína extrahovat a upravit jejich koncentraci. Tyto koncentrované roztoky byly přidány k buňkám a nechaly se kultivovat za vhodných podmínek. Následně se proliferace vyhodnotila pomocí MTT a provedla se fotodokumentace výsledků.

6.1 Materiál

K práci byly použity dva druhy buněk HaCaT (lidské keratocyty) a HepG2 (hepatocyty). Pro extrakci polyfenolů byly vybrány tři odrůdy révy vinné a byly izolovány z bobulí, slupky a pozdního sběru hroznů (tzv. botritických, napadených ušlechtilou plísní šedou - *Botrytis cinerea*).

Tab. 4. Testované odrůdy vína:

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

Životaschopnost buněk byla vyjádřena jako absolutní hodnota buněk přítomných v příslušném ředění, popřípadě na buňky pěstované v čistém ředění média bez polyfenolů. Všechny testy byly provedeny ve čtyřech opakováních. Morfologie buněk byla hodnocena po dobu 24 hodin při pěstování ve zředěném stavu. Buňky byly pozorovány ve fázovém mikroskopu Olympus (typ CKX41). Rozdíly mezi pozorovanými absorbancemi byly stanoveny T-testem s použitím statistiky pro Windows. Schopnost buněk reagovat na cytotoxické látky byla ověřena Dodecyl sulfátem sodným (SDS, Sigma) s konečnou koncentrací 1, 10, a 20 $\mu\text{g/ml}$ v modifikovaném Dulbecc Eagle's Medium.

6.2 Přístrojové vybavení

Pro zobrazení buněk ve fázovém kontrastu a pořízení fotografické dokumentace byl použit Invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem (Olympus CKX41; Olympus, Japan). K vy-

hodnocení MTT testu byl použit Elisa reader Sunrise od firmy Tecan (Švýcarsko), umožňující měření 96 jamkových testovacích plátů. Veškeré práce byly provedeny v laminárním boxu Biological Safety Cabinets HERAsafe KSP (Thermo Electron LED GmbH, Německo). Buňky byly kultivovány v inkubátoru s řízenou atmosférou CO₂ Heracell 150i (Thermo Scientific, USA).

6.3 Extrakce polyfenolů

Z rozmrazených hroznů byly odstraněny třapiny a bobule byly homogenizovány v 90 % metanolu. Poté se nechaly vyluhovat po dobu 30 minut a při protřepávání měly pouze 4°C. Bylo nutné si odděleně od zbytku směsi předpřipravit kvasinky v malé kádince. K 3,5 ml vzorku se přidaly kvasinky (granulované) a stejný poměr destilované vody (3,5 ml). Nechaly se 20 minut rozkvasit a poté se přidaly ke zbytku směsi (kvasinky spotřebovaly glukózu a vznikl CO₂). Po smíchání se vše převedlo do Erlen-Mayerových baněk s objemem 500 ml tak, aby u uzávěru zůstalo co nejméně volného prostoru pro vzduch. Zazátkovaly se uzávěrem propustným pro plyny, aby CO₂ mohl unikat ven a baňky se uložily ve tmě, na dobu 3-5 dní.

V centrifuze se množství 1990 g materiálu odstředilo po dobu 10 minut. Po dalších 30 minutách se provedla druhá extrakce a opětovné odstředování. Sediment se opláchnul 90% metanolem a znovu odstředil. Supernatanty se sloučily a celkový objem byl zaznamenán. Methanolvý extrakt byl odpařen ve vakuové odparce při 40°C a zbytky byly rozpuštěny ve stejném objemu (DMSO) dimethylsulfoxidu. (Je snaha za DMSO najít takovou náhražku rozpouštějící polyfenoly, která by nebyla tak toxická. Prozatím je řešením vysušený extrakt rozpouštět přímo v médiu a uchovávat ho sušený - 200 mg původního materiálu odpovídá 100 µl). Výsledný roztok byl zředěn 2x, 5x, 10x, a 20x na 100 µl a jednotlivé koncentrace se nanosly pipetou na testovací pláty [TOTUŠEK, 2008].

6.4 Stanovení obsahu polyfenolů

Metoda stanovení celkových polyfenolů je založena na principu spektrofotometrického měření barevných produktů reakce hydroxidových skupin fenolických sloučenin s činidlem Folin – Ciocalteu. Ze standardního roztoku taninu bylo odpipetováno do 6 ti 50ml odměrných baněk 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ml roztoku. Současně se do sedmé 50ml odměrné

baňky odpipetoval 1 ml čirého roztoku vína (při obsahu polyfenolů vyšším, než 1000 mg/litr vína, se pipetuje pouze 0,5 ml) zředěného destilovanou vodou v poměru 1:5 (20%). Do všech odměrných baněk se přidalo cca 20 ml destilované vody, 1 ml Folin – Ciocalteu činidla a obsah se promíchal. Po třech minutách se přidalo 5 ml 20% roztoku Na_2CO_3 , obsah se opět promíchal a doplnil destilovanou vodou po rysku. Po 30 minutách se změřila intenzita zbarvení v 10 mm kyvetě při 700nm proti slepému pokusu (nulový obsah taninu) [SAMBROOK, 1989]. Tuto část praktického měření jsem neprováděla osobně, protože stanovení obsahu polyfenolů ve víně, nebylo cílem mé práce.

Tab. 5. Chemikálie a roztoky:

Standartní roztok: 50 mg taninu ve 100ml roztoku

Činidlo Folin – Ciocalteu

Filtrovaný 20% roztok Na_2CO_3

Destilovaná voda

Stanovení jednotlivých polyfenolů bylo provedeno s použitím Dionex Ultimate 3000 vysoce účinného kapalinového chromatografického (HPLC) systému. Pro stanovení byla použita extrakční metoda popsaná Lee a Ong (2000). Prezentovanými údaji jsou průměrné hodnoty vypočtené ze tří měření.

Tab. 6. Navážky révy vinné:

Odrůda	Bobule (g)	Slupky (g) + destil.voda
Burgunda modrá	657,5	196,5 + 393
Frankovka (p.s)	581,4	177,5 + 380,9
Muškát moravský (p.s.)	598,0	190,5 + 381

p.s – pozdní sběr

Bobule révy vinné byly rozmixovány na kaši a dále se již neupravovaly. Ke slupkám bylo třeba přidat destilovanou vodu v poměru 1:2 (slupky : voda), aby bylo možné s tímto materiálem pracovat. Změřila se hodnota pH vzorku, která by měla být 3,7. Pokud bylo pH jiné (většinou vyšší), přidala se pro jeho úpravu kyselina sírová (okyselí se). V našich vzorcích bylo potřeba hodnotu pH upravit pouze u vzorku z odrůdy Muškátu moravského. U slupek

této odrůdy bylo naměřeno původní pH 4,12 a proto bylo přidáno 7 ml kyseliny sírové pro změnu pH na 3,72. Hrozny Muškátu moravského měly pH 3,89 a přidal se pouze 1 ml kyseliny na změnu pH k hodnotě 3,71. Ostatní odrůdy měly pH v normě.

6.5 Kultivace buněk

Ke kultivaci byly použity dvě různé buněčné linie [BOUKAMP, 1988]. První linií byly lidské keratinocyty - HaCaT, které poskytl k použití Cell Lines Service (Catalog No. 300493, Germany). Jako médium bylo použito kultivační Dulbecco's Modified Eagle Medium se zvýšeným obsahem glukózy, přísadkou 10% fetálního séra skotu a Penicilinu/Streptomycinu, 100 U/ml (100) $\mu\text{g/ml}$, (PAA Laboratories GmbH, Austria). Druhá buněčná linie byla HepG2 (hepatocyty) - buňky z ATCC (HB-8065). HepG2 byly kultivovány médiu, které tvořilo Eagl's Minimum Essential Medium CC, přísadkou 10% fetálního séra skotu, 2 mM L-glutaminu a 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamycinu (PAA laboratoře GmbH, Rakousko). V inkubátoru byla atmosféra upravena na 5% CO_2 [FRESHNEY, 2002]. Vzorby byly dezinfikovány vystavením zdroji UV záření (257,7 nm), UV-C s 30 W/G30TB, Phillips, Holandsko. Vzorby polyfenolů byly zředěny v kultivačním médiu (DMEM) a získaly roztoky s koncentracemi 100, 75, 50 a 25 $\mu\text{g/ml}$. Všechny tyto roztoky byly použity do 24 hodin od naředění. Buňky byly předkultivovány (24 hodin) a kultivační médium bylo následně nahrazeno připravenými roztoky. Jako kontrolní experiment čisté extrakce byl použit kontrolní pokus (blank) bez přísadky polyfenolů. Pro posouzení vlivu na zastavení růstu HaCaT a HepG2 byla použita kolorimetrická metoda stanovení Vybrant[®] MTT cell proliferation Assay Kit (Invitrogen Corporation, USA) [SPECTOR, 1998].

Inkubace touto metodou probíhá 3 dny při 37°C v 5% atmosféře CO_2 . Proliferace buněk se vyhodnocuje na základě spektrofotometrie. Tato metoda 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 a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky Microtitration Sumise Sensor (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 540 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk). Princip konverze byl popsán v roce 1954 Blackem a kol., a metoda byla zavedena do laboratorní praxe Mosmanem v roce 1983 (tzv. kolorimetrický test stanovení životnosti buněk) [BLACK, 1954].

7 VÝSLEDKY

Z každého vzorku jsou v grafu čtyři záznamy (sloupce) dle koncentrace extraktu, který byl použit. U odrůdy Burgundy modré byly použity slupky, bobule i pozdní sběr, u Frankovky jen slupky a pozdní sběr a u Muškátu moravského byl extrakt získán ze slupek a bobulí.

Tab. 7. Obsah celkových polyfenolů v jednotlivých odrůdách révy vinné

Odrůda	Obsah polyfenolů		Před úpravou ředěním
	[µg/ml]	[µg/0,1 ml]	[mg/l]
Burgunda modrá-slupky	1 402,50	140,25	5,61
Bugrunda modrá - bobule	951,4	95,4	4,36
Burgunda modrá-p.s.	1 302,50	130,25	5,21
Frankovka-slupky	747,5	74,75	2,99
Frankovka- p.s.	905,0	90,50	3,62
Muškát moravský-slupky	807,5	80,75	3,23
Muškát moravský-bobule	730,0	73,00	2,92

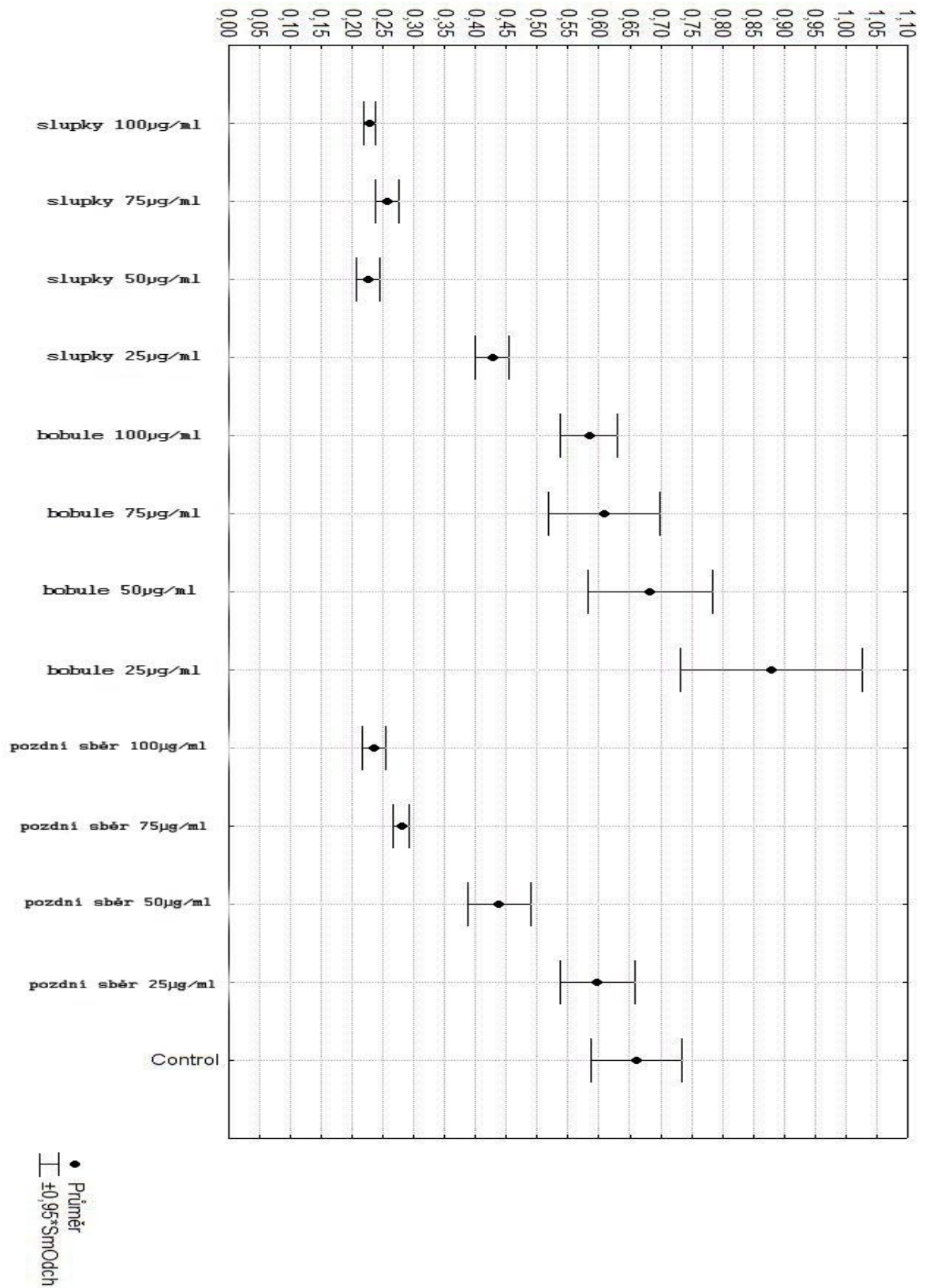
p.s.- pozdní sběr

7.1 Vliv polyfenolů na lidské keratinocyty

Grafy vlivu polyfenolů extrahovaných z daných odrůd révy vinné na (HaCaT) linie keratinocytů (Graf 1. – Graf 3.), ukazují absorbanci MTT vyjadřující počet buněk, v porovnání s kontrolním měřením, na kterém je vidět volný růst buněk. Míra absorbance zároveň vyjadřuje míru proliferace. U výsledků HepG2 jsou přiloženy také fotografie, které dokládají účinek polyfenolů a doplňují výsledky grafů. Pro HaCaT fotografie přiloženy nejsou z důvodu rozsahu diplomové práce.

7.1.1 Burgunda modrá

V grafu 1. jsou zaznamenány výsledky působení polyfenolů extrahovaných z odrůdy Burgunda modrá ve slupkách (sloupec 1-4), bobulích (sloupec 5-8) a hroznech pozdního sběru

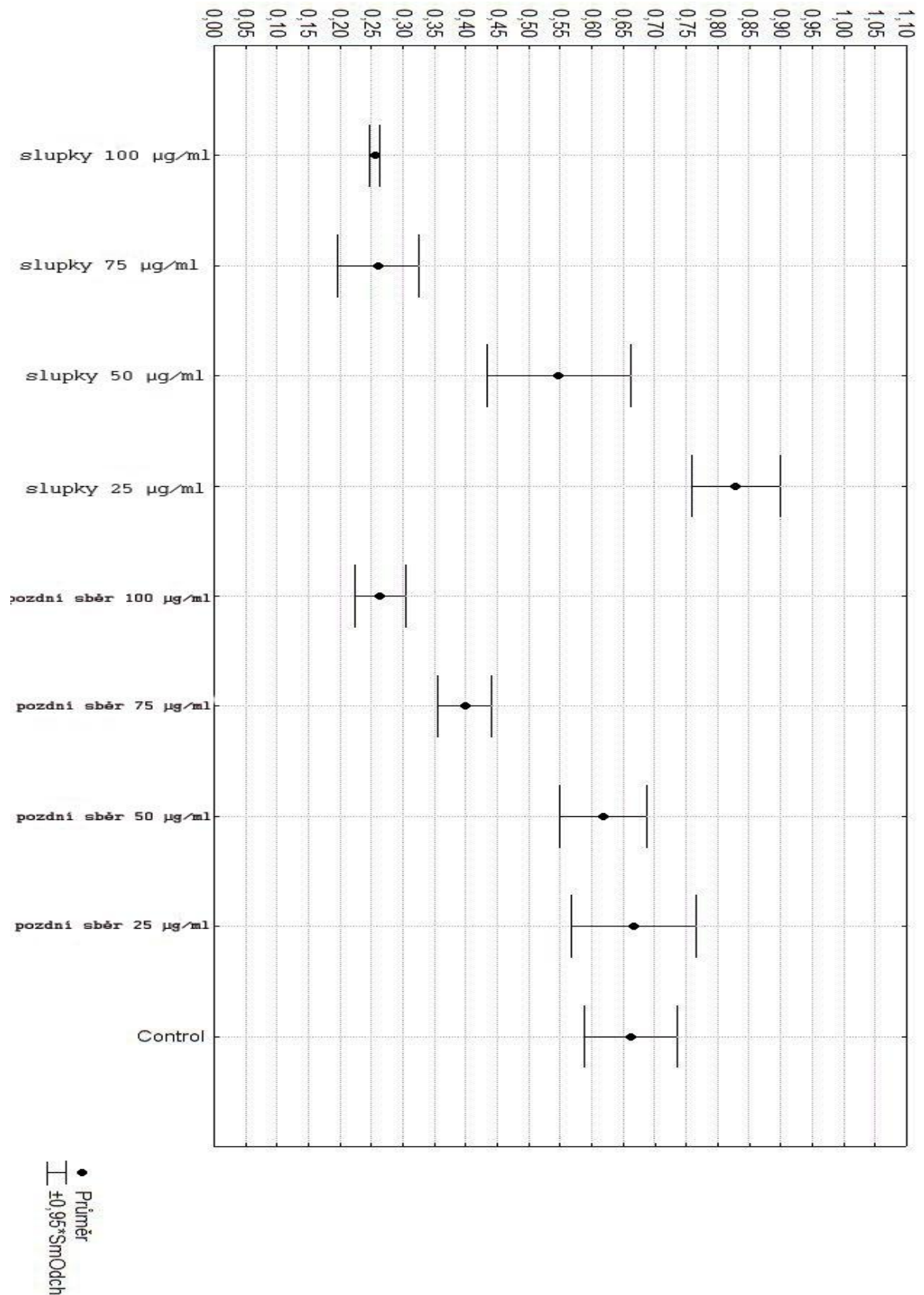


Graf 1. Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Burgundy modré.

(sloupec 9-12) na HaCaT. Byly použity koncentrace polyfenolických látek 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml a 25 µg/ml. V grafu je vždy kontrolní měření, které je znázorněno jako poslední. V měření pro HaCaT je zaznamenána průměrná hodnota absorbance 0,66 se směrodatnou odchylkou měření 0,58 - 0,74. U polyfenolů extrahovaných ze slupek je viditelný největší rozdíl v proliferaci u této odrůdy, a to ve všech měřených koncentracích. Při koncentraci 100 µg/ml polyfenolů klesla absorbance oproti kontrolnímu měření z 0,66 na téměř třetinovou hodnotu 0,23 v rozmezí pouze 0,22 - 0,24. U druhé nejvyšší koncentrace 75 µg/ml, byla průměrná hodnota absorbance jen o 0,02 vyšší (0,26) a u 50 µg/ml klesla její hodnota na 0,23 v průměru, se směrodatnou odchylkou 0,21 - 0,25. Při nejnižší použité koncentraci (25 µg/ml) klesla průměrná hodnota absorbance na 0,43, což bylo nejméně ze slupek Burgundy modré, avšak jeho účinnost byla také velmi dobrá a i tento rozdíl byl statisticky významný. Jelikož všechny výsledky měly velmi malé odchylky, jsou průměrné hodnoty velmi přesné. Z výsledků vyplývá pozitivní účinek polyfenolů této odrůdy na snižování proliferace buněk.

Výsledek stejného měření pouze s extraktem z bobulí je od slupek diametrálně odlišný. U 100 µg/ml koncentrace byla naměřena průměrná hodnota 0,59 s velkou směrodatnou odchylkou 0,54 - 0,63. Tato odchylka se pohybuje v rozmezí kontrolního pokusu, a tudíž se tento účinek nepovažuje za statisticky významný. Stejně tak měření s koncentrací 75 µg/ml nedosáhlo statisticky významných hodnot. Absorbance poklesla na průměrnou hodnotu 0,61 a u koncentrace 50 µg/ml se průměrná absorbance dokonce mírně zvýšila na 0,68 v průměru, se směrodatnou odchylkou měření 0,57 až 0,78. U nejnižší koncentrace polyfenolů (25 µg/ml) byl místo poklesu zaznamenán nárůst. Průměrná hodnota absorbance činila 0,88 s širokým rozptylem hodnot 0,73 – 1,03. Celkově byly směrodatné odchylky u měření bobulí Burgundy modré, velké u všech koncentrací.

Posledním měřením u této odrůdy na HaCaT byl extrakt z pozdního sběru. Zde se zvyšující se koncentrací hodnoty úměrně klesaly. I koncentrace 25 µg/ml stačila na mírný pokles absorbance z 0,66 na 0,60 průměrné hodnoty a koncentrace 50 µg/ml způsobila pokles absorbance na 0,44 se směrodatnou odchylkou 0,39 - 0,49. Obě hodnoty se daly považovat za statisticky významné. Další dva výsledky byly srovnatelné.



Graf 2. Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Frankovky.

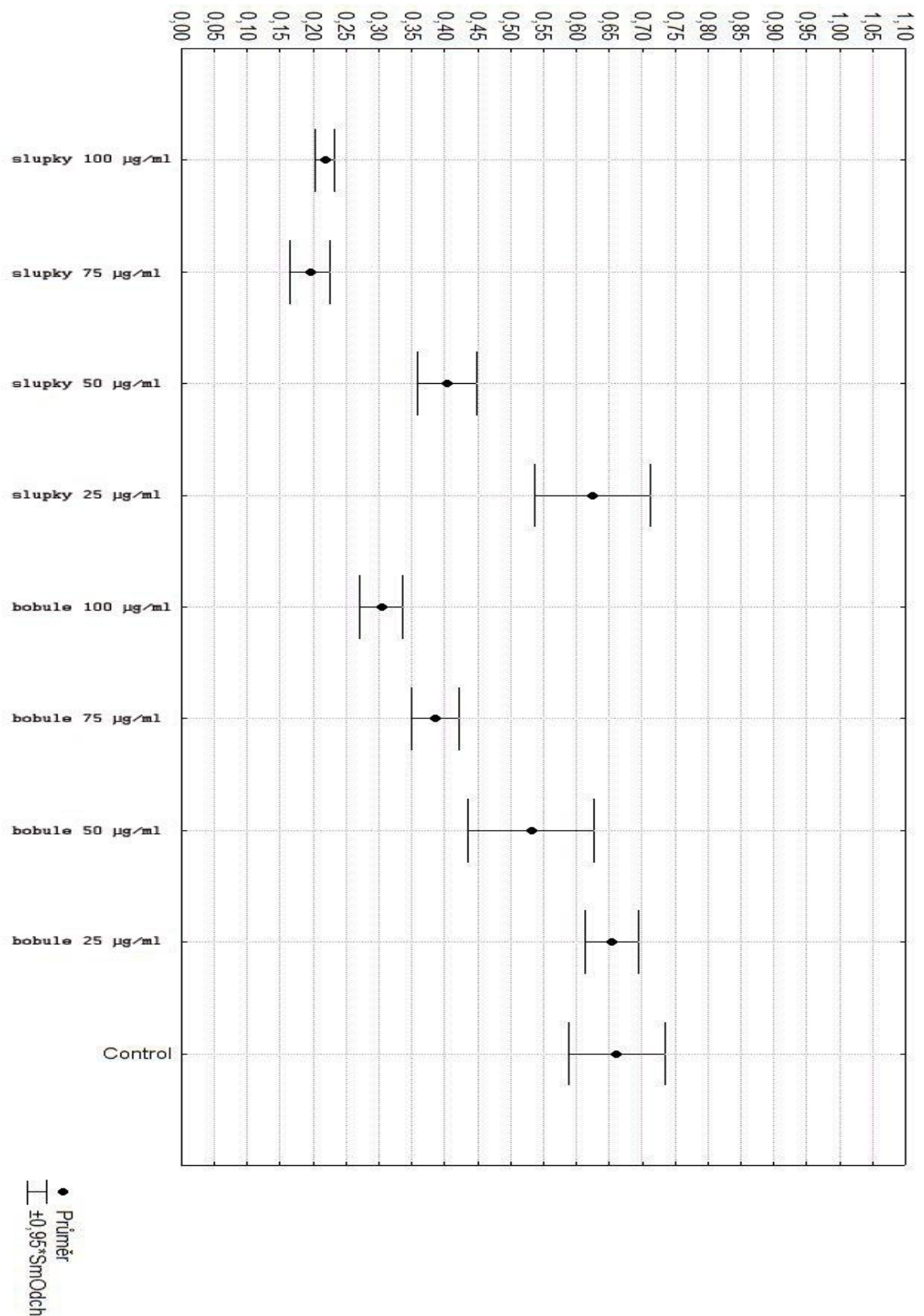
Kultivace za přítomnosti 75 µg/ml polyfenolů snížila hodnotu absorbance od kontrolního měření (0,66) na 0,27 a 100 µg/ml na průměrnou hodnotu 0,24 (0,22-0,25). Tyto výsledky byly statisticky významné. Vyhodnotí-li se totéž procentuálně, byl zde zaznamenán pokles proliferace o 59% u koncentrace 75 µg/ml a 64% při kultivaci s nejvyšším množstvím přidaných polyfenolů.

7.1.2 Frankovka

Graf č. 2 ukazuje výsledky měření HaCaT pro červené víno odrůdy Frankovka u slupek a bobulí pozdního sběru. Kontrolní měření bylo stejné, jako u předchozí odrůdy Burgundy modré, tedy opět se porovnávalo s průměrnou hodnotou absorbance 0,66 a směrodatnou odchylkou 0,58 - 0,74.

Extrakt ze slupek s nejnižší koncentrací (25 µg/ml) nenabyl statisticky významných hodnot. Průměrná absorbance vzrostla na 0,83 a celkově se toto měření pohybovalo v rozmezí 0,76 až 0,90. U koncentrace 50 µg/ml zůstaly hodnoty téměř stejné, jako u kontrolního pokusu. Směřovaná odchylka se pohybovala od 0,44 do 0,66 s průměrem 0,55. Vyšší koncentrace již měly pozitivní účinek a poměrně značně hodnoty ovlivnily. Pro extrakt s koncentrací 75 µg/ml polyfenolů byla průměrná hodnota absorbance 0,27 se směrodatnou odchylkou 0,20 - 0,33. Nejvyšší koncentrace 100 µg/ml snížila absorbanci nejvíce a to na 0,26 v průměru, avšak s mnohem menší směrodatnou odchylkou (0,25 - 0,27).

Obecně lze u slupek vyjádřit statisticky významnou účinnost na proliferaci při koncentraci polyfenolů nad 50 µg/ml. Polyfenoly extrahované z hroznů pozdního sběru Frankovky nedosáhly u nejnižší přidané koncentrace (25 µg/ml) statisticky významných výsledků. Průměrnou hodnotu 0,67 s odchylkou 0,57 – 0,77 nelze považovat za statisticky významný pokles proliferace. Ani účinnost vyšší koncentrace (50 µg/ml) u které byla změřena absorbance v průměru 0,62 s odchylkou 0,55 - 0,68, nebyla významná. Mírného zlepšení bylo dosaženo u přidaného extraktu s koncentrací 75 µg/ml s průměrnou absorbancí 0,40 pohybujícím se mezi hodnotami 0,35 - 0,44. Kultivace s nejvyšší koncentrací (100 µg/ml) polyfenolů snížila průměrnou absorbanci na statisticky významný výsledek 0,27 s malou směrodatnou odchylkou 0,23 - 0,30. Výsledky kultivace buněk s polyfenoly extrahovanými z hroznů pozdního sběru Frankovky byly u HaCaT statisticky významné pouze u 50%, a to v koncentracích vyšších než 50 µg/ml.



Graf 3. Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorpance, za přítomnosti extraktů z Muškátu moravského.

7.1.3 Muškát moravský

Poslední vybranou odrůdou révy vinné byla bílá odrůda - Muškát moravský (Graf 3.). Hodnoty měření účinnosti polyfenolů ze slupek Muškátu moravského v koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$ na HaCaT se pohybovaly v rozmezí 0,54 - 0,72 s průměrem 0,63 tedy téměř v průměru kontrolního pokusu. Již koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ vykazovala nižší proliferaci a to na úrovni průměru 0,40 se směrodatnou odchylkou 0,35 - 0,45. Statisticky nejvýznamnějšího rozdílu dosáhla koncentrace 75 $\mu\text{g/ml}$, jejíž průměrná hodnota absorbance dosáhla hodnoty 0,20 se směrodatnou odchylkou 0,17 - 0,23. Tato hodnota byla nejnižší z měření HaCaT všech vín. U nejvyšší koncentrace (100 $\mu\text{g/ml}$) již tak významného výsledku dosaženo nebylo. Účinek tohoto extraktu byl o dvě setiny vyšší (průměr 0,22), než u 75 $\mu\text{g/ml}$.

Měření proliferace za použití extraktu z bobulí Muškátu moravského přineslo tyto výsledky. Přidáním 25 $\mu\text{g/ml}$ polyfenolů k HaCaT zůstala hodnota absorbance téměř konstantní s kontrolním pokusem. Klesla z průměrné hodnoty 0,66 na 0,65 se směrodatnou odchylkou 0,61 - 0,70, což není statisticky významný rozdíl. U 50 $\mu\text{g/ml}$ polyfenolů byla průměrná hodnota opět v rozpětí kontrolního pokusu (0,43 - 0,63) s průměrem 0,53. Buňky reagovaly pozitivně až na koncentraci 75 $\mu\text{g/ml}$ snížením průměrné absorbance na 0,38 s odchylkou měření (0,35 - 0,42) a u 100 $\mu\text{g/ml}$ klesla absorbance na 0,30 (0,27 - 0,34) tedy o více než 50%.

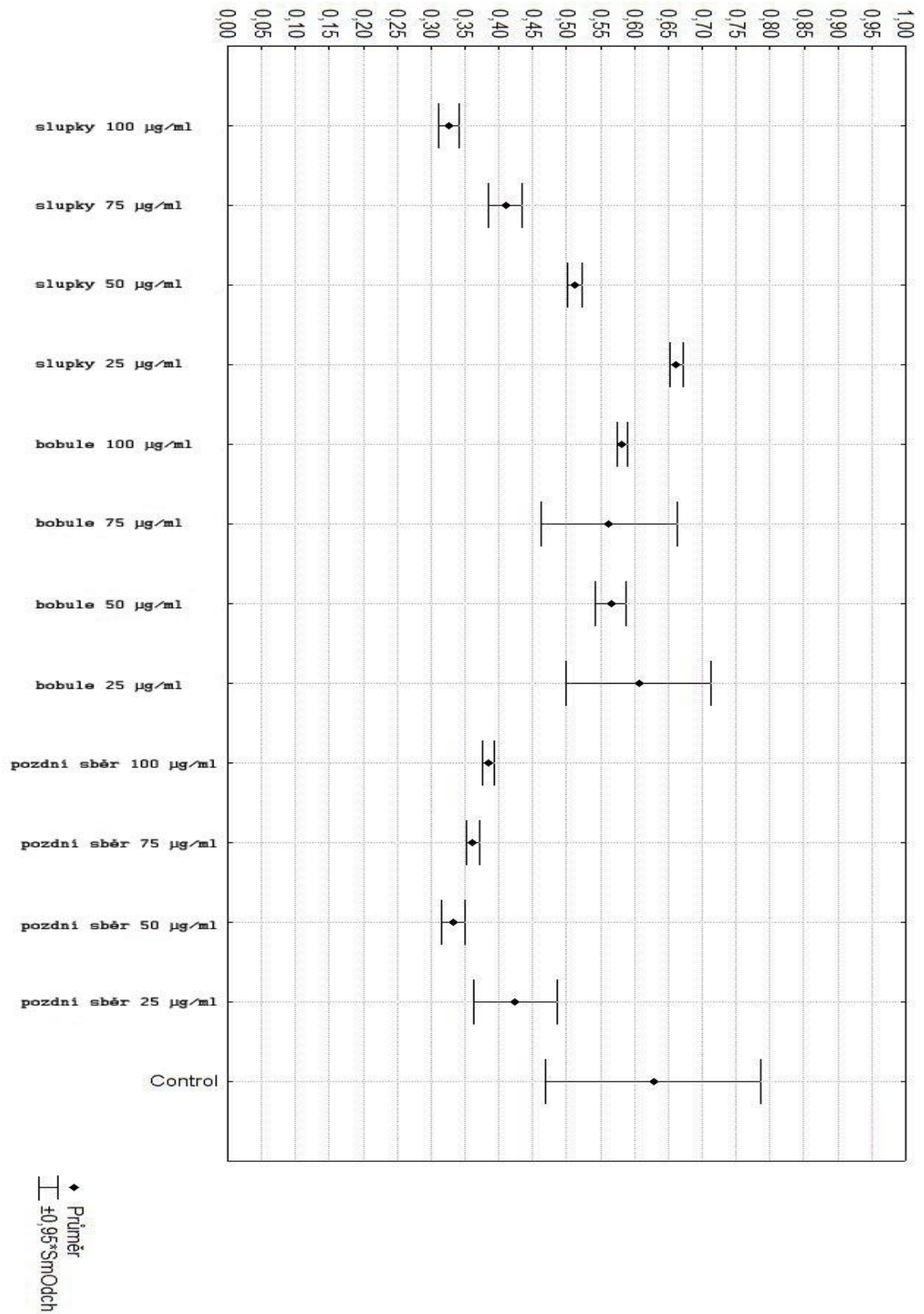
7.2 Vliv polyfenolů na lidské hepatocyty

V následujících grafech (Graf 4. – Graf 6.) byly posuzovány stejné odrůdy vín, jako u HaCaT, pouze tentokrát byly použity hepatocyty (HepG2). Extrakty byly připraveny ze slupek, bobulí a z hroznů pozdního sběru vybraných vín. Z každého vzorku jsou v grafu čtyři záznamy podle koncentrace extraktu, který byl k testu použit. U Frankovky byly použity slupky a pozdní sběr, u Muškátu moravského slupky a bobule a u odrůdy Burgundy modré všechny tři materiály. Koncentrace polyfenolických látek v extraktu jsou stejné, jako u HaCaT: 100 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ a 25 $\mu\text{g/ml}$. Kontrolní hodnota (Obr. C) pro HepG2 byla naměřena v průměrné hodnotě 0,63 v širokém rozmezí 0,47 - 0,78. V této části jsou přiloženy fotografie se zvětšením 200x. V příloze jsou fotografie stejných výsledků se zvětšením 400x.

7.2.1 Burgunda modrá

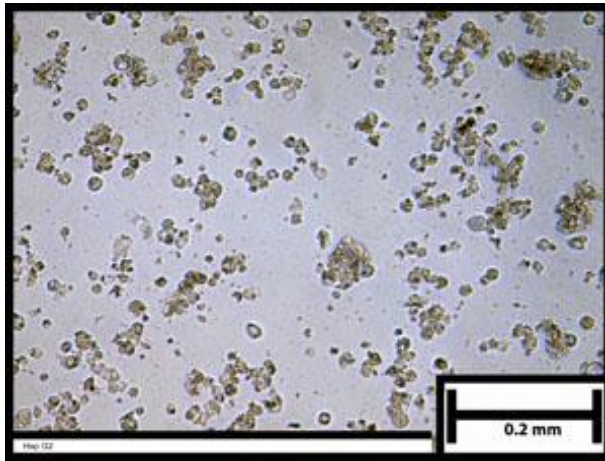
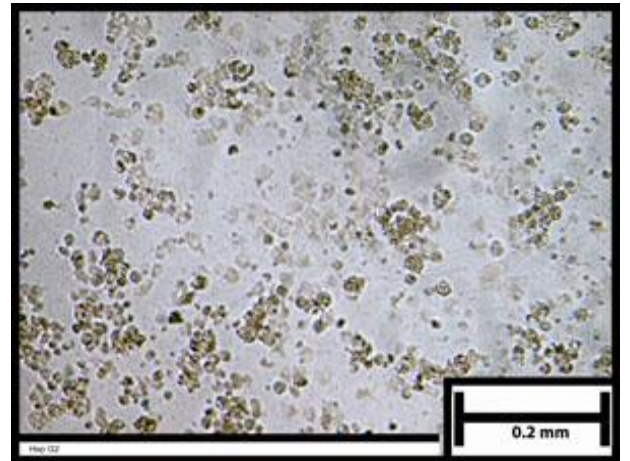
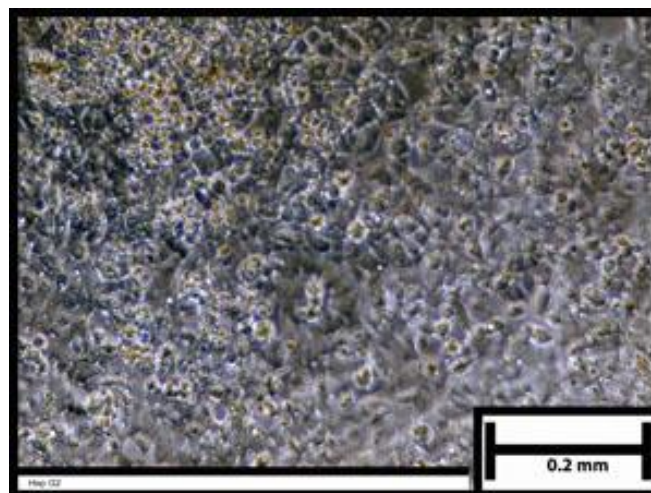
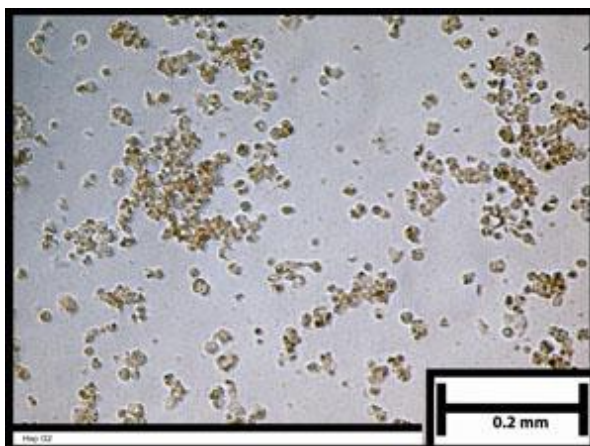
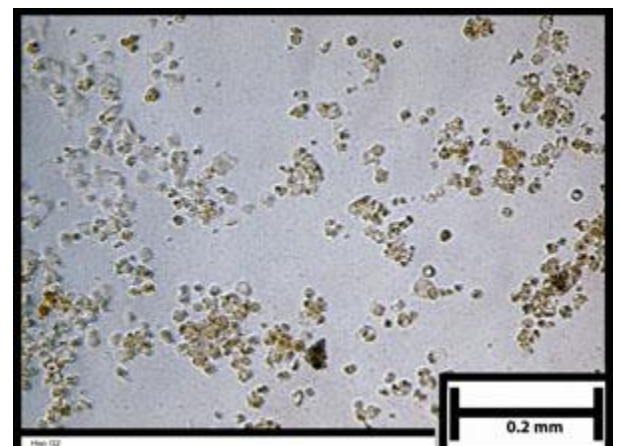
Výsledky Burgundy modré na HepG2 uvádí Graf 4. Ve srovnání s kontrolní hodnotou měla statisticky významný výsledek použitá koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ polyfenolů ze slupek s průměrným výsledkem absorbance o polovinu nižším 0,33 (směrodatná odchylka 0,31 - 0,34), než u kontrolního vzorku. Při kultivaci HepG2 s 75 $\mu\text{g/ml}$ polyfenolů se její absorbance se snížila na 0,41 s odchylkou 0,37 - 0,43. U přidavku 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentrace polyfenolů se výsledky pohybovaly v mezích kontrolního pokusu 0,50 - 0,52 s průměrnou hodnotou 0,51. Bylo však velmi dobře viditelné (Obr. 9.), že polyfenoly ovlivnily morfologii převážné části buněk. Tyto buňky neměly stejný tvar, jako u kontrolního pokusu. Byly porušené a nejevily známky životaschopnosti. Nejnižší koncentrace (25 $\mu\text{g/ml}$) polyfenolů pro HepG2 neměla statisticky významný pokles. Hodnoty (0,65 - 0,67) s průměrem 0,66 byly srovnatelné s kontrolním pokusem, pouze v menším rozmezí.

Oproti slupkám neměly bobule žádný statisticky významný výsledek (Obr. 10). I když se absorbance při použití nejvyšší koncentrace (100 $\mu\text{g/ml}$) polyfenolů blížila spíše spodní hranici kontrolního pokusu (0,57 – 0,59), neovlivnila ho natolik, aby se mohl považovat za statisticky významný. Je však opět viditelný rozdíl v morfologii buněk. Mnoho z nich ztratilo původní tvar a jsou z velké části poškozeny. Absorbance polyfenolů z bobulí Burgundy modré pro 75 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$ dosáhla stejné průměrné hodnoty absorbance 0,56. Rozdíl byl pouze u směrodatné odchylky, která byla u 75 $\mu\text{g/ml}$ větší (0,46 – 0,66), než u 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,54 – 0,58).



Graf 4. Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Burgundy modré.

Obr. 9. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Burgundy modré: A - 25 $\mu\text{g/ml}$, B - 50 $\mu\text{g/ml}$, C - kontrola, D- 75 $\mu\text{g/ml}$, E - 100 $\mu\text{g/ml}$.

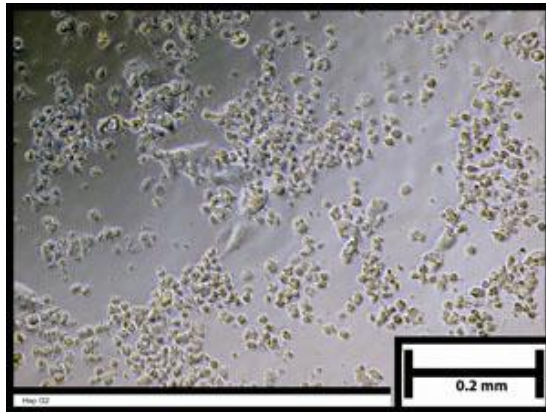
A**B****C****D****E**

Vzorek kultivovaný s nejnižším obsahem polyfenolů (25 µg/ml) neprokázal účinek významně se lišící od kontrolního růstu. Absorbance ustala mezi hodnotami 0,50 - 0,72 s průměrem 0,61 a byla téměř shodná s kontrolním měřením, tedy statisticky nevýznamná. Přestože přidavek extraktů všech koncentrací z klasických bobulí révy vinné ovlivnil výsledek velmi málo, pozdní sběr této odrůdy, měl srovnatelně lepší výsledky.

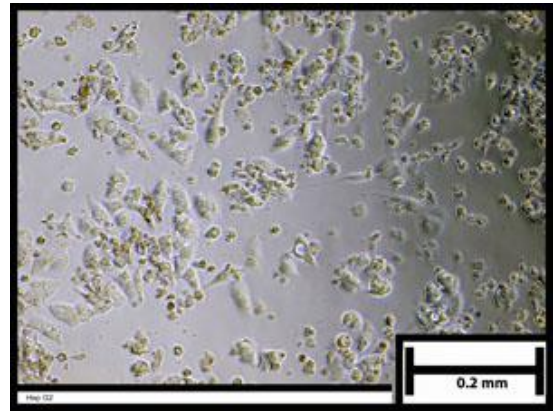
U extraktů z pozdního sběru (Obr. 11) o koncentraci 25 µg/ml, nebyly polyfenoly příliš účinné. Absorbance dosáhla průměru 0,43 v rozmezí 0,36 - 0,49. Bylo však viditelné, že polyfenoly poškodily buněčnou membránu řady buněk. Od 50 µg/ml obsahu polyfenolických látek, klesla absorbance na průměrnou hodnotu 0,33, což byl téměř 50% pokles a tedy významný rozdíl. Za přidavku polyfenolů o koncentraci 75 µg/ml klesla absorbance na hodnotu 0,36. Tato hodnota je velmi přesná, jelikož směrodatná odchylka byla velmi malá (0,35 - 0,37). Přidavkem dalších 25 µg/ml polyfenolů na konečných 100 µg/ml se již rozdíl dále neprohluboval a absorbance dosáhla průměru 0,38 s opět velmi malou odchylkou měření (0,37 - 0,39). Výsledky pro pozdní sběr Burgundy modré tedy zaznamenaly statisticky významné změny od koncentrace 50 µg/ml polyfenolů.

Obr. 10. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z bobulí Burgundy modré: A - 25 $\mu\text{g/ml}$, B - 50 $\mu\text{g/ml}$, C - kontrola, D- 75 $\mu\text{g/ml}$, E - 100 $\mu\text{g/ml}$.

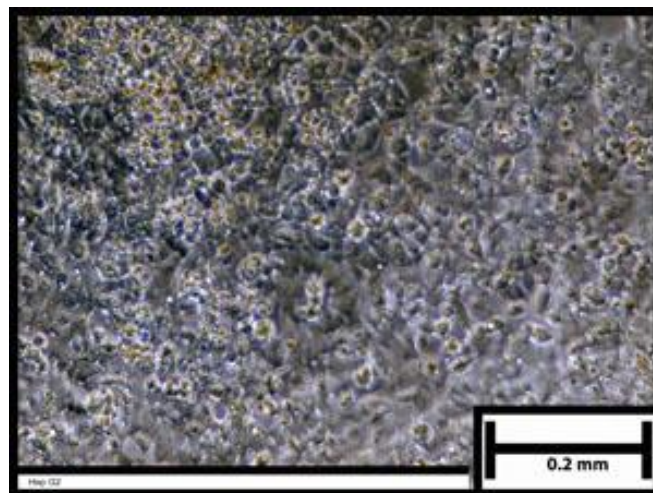
A



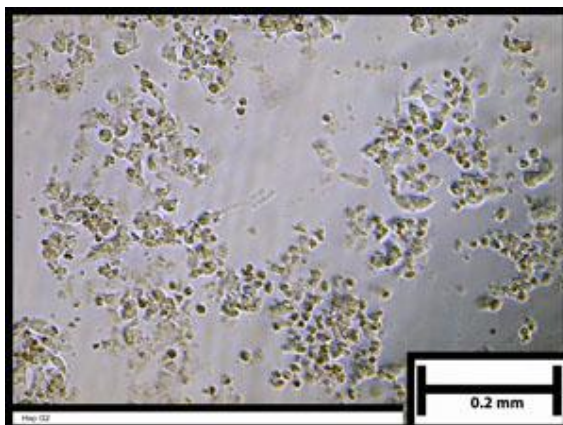
B



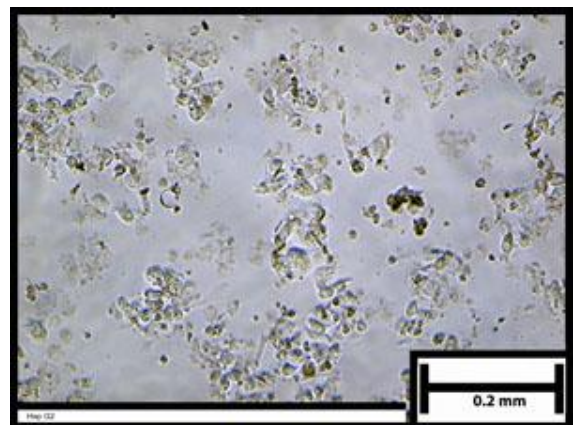
C



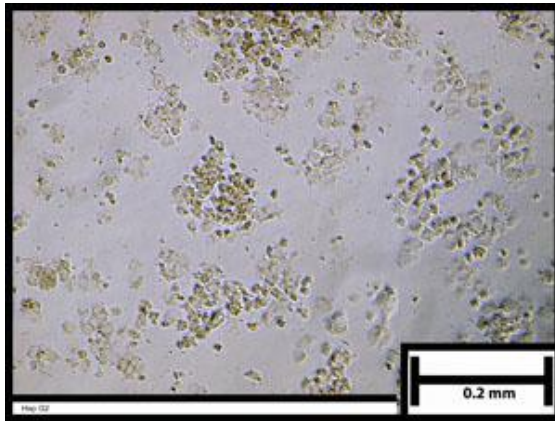
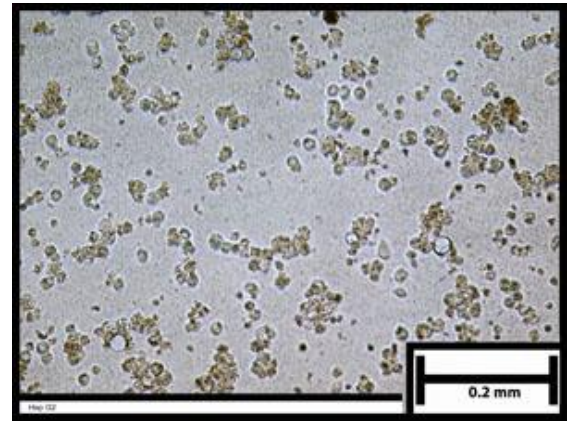
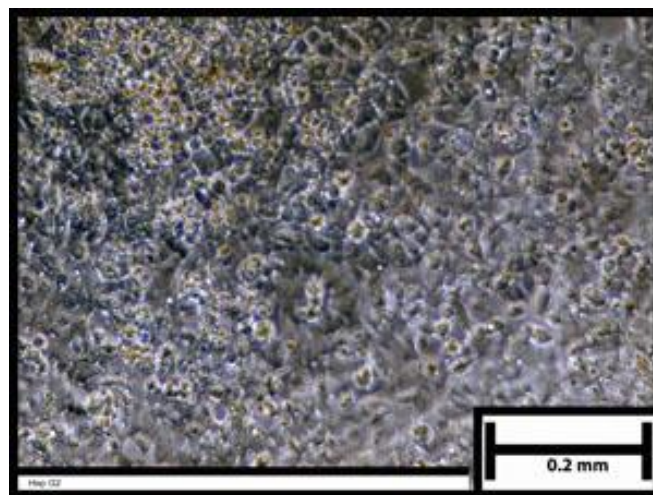
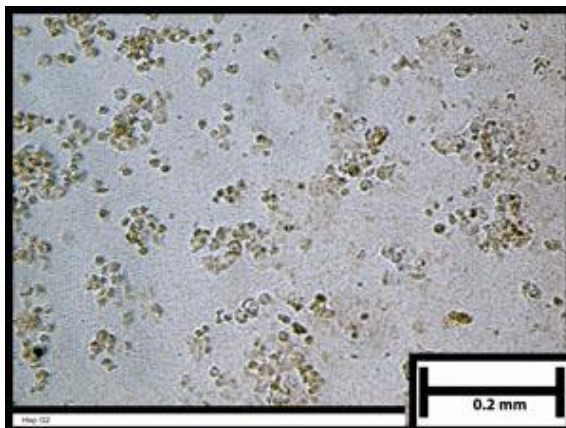
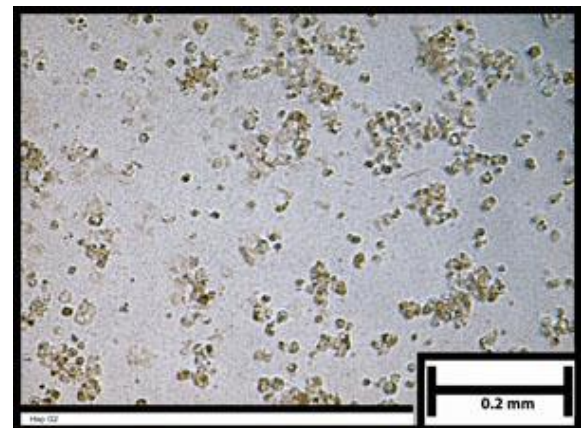
D



E



Obr. 11. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z pozdního sběru Burgundy modré: A - 25 $\mu\text{g/ml}$, B - 50 $\mu\text{g/ml}$, C - kontrola, D- 75 $\mu\text{g/ml}$, E - 100 $\mu\text{g/ml}$.

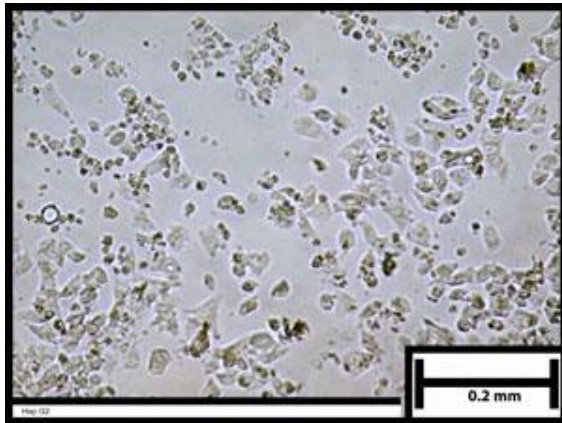
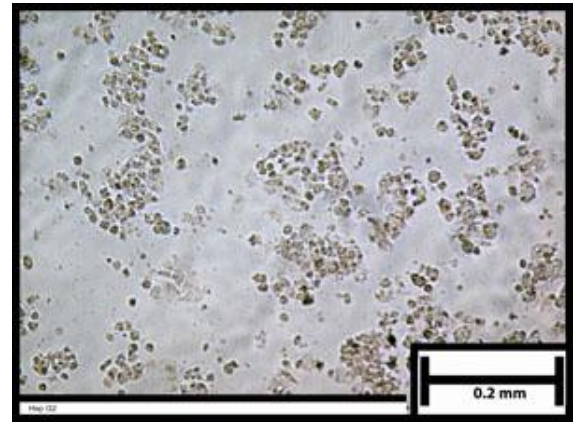
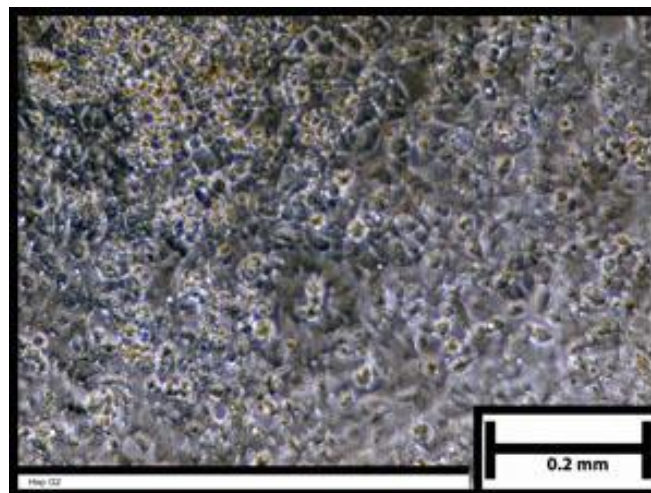
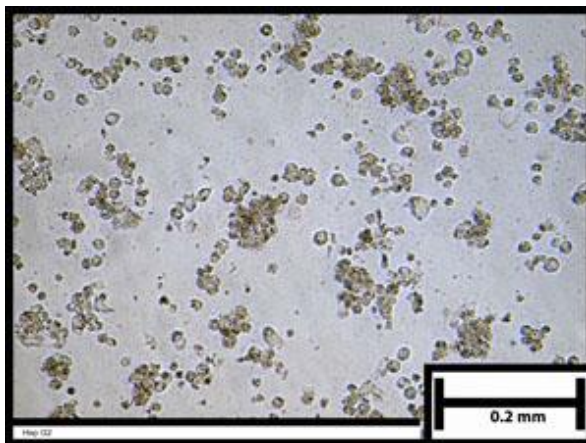
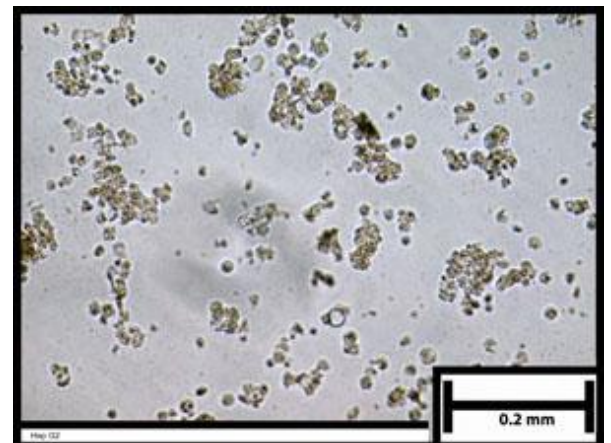
A**B****C****D****E**

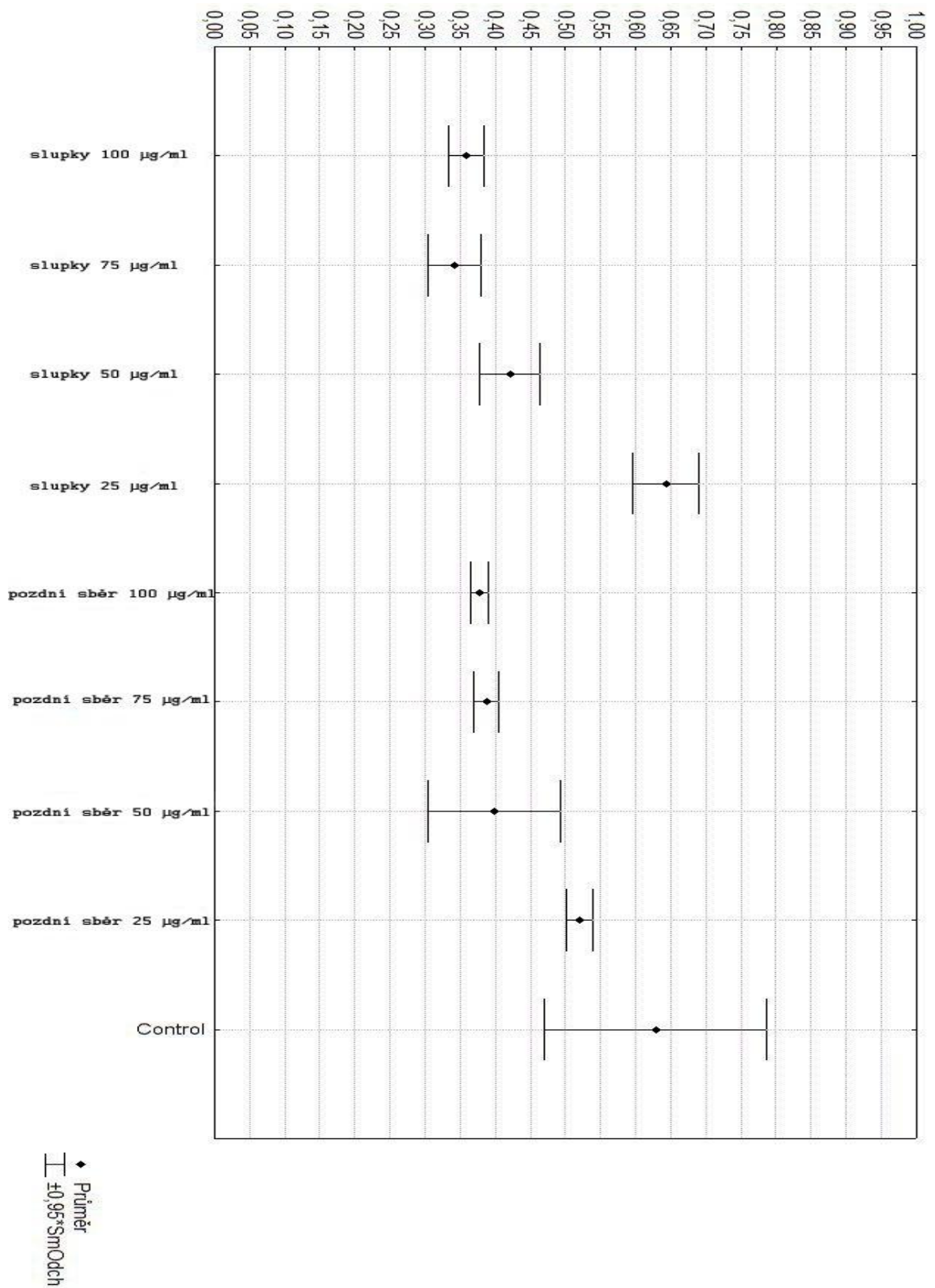
7.2.2 Frankovka

Výsledky měření vlivu polyfenolů Frankovky na HepG2 (Graf 5.) se u slupek a pozdního sběru příliš nelišily. Extrakt ze slupek v nejnižší použité koncentraci (25 µg/ml) průběh proliferace neovlivnil. Průměrná hodnota absorbance byla 0,64, což je o 0,01 vyšší, než průměr kontrolního měření s ještě širší směrodatnou odchylkou 0,43 - 0,84. Na Obrázku 12. je však opět vidět změna v morfologii buněk, vlivem polyfenolů ze slupek. Jejich počet významně neovlivnily, ale jejich morfologii ovlivnily významně. Mírný pokles proliferace se ukázal u této odrůdy po přidání 50 µg/ml polyfenolů. Absorbance v tomto případě klesla na 0,43 se směrodatnou odchylkou 0,37 - 0,47. U 100 µg/ml extraktu byl zaznamenán pokles na 0,36 v menším rozpětí 0,33 - 0,38. O něco nižší koncentrace polyfenolů (75 µg/ml) snížila počet buněk ještě více a to na 0,34. Směrodatná odchylka klesla na 0,30 – 0,37, což byla vůbec nejnižší hodnota absorbance u HepG2.

Přídavek polyfenolů extrahovaných z bobulí pozdního sběru Frankovky (Obr. 13) měl výsledky méně výrazné, než při kultivaci, při které byly použity slupky. V případě koncentrace 25 µg/ml byl výsledek výraznější, než u slupek a to průměrnou hodnotou absorbance 0,52. Tento malý rozdíl však nebyl statisticky významný. Velká odchylka hodnot byla zaznamenána u 50 µg/ml koncentrace polyfenolů z bobulí Frankovky a to 0,30 - 0,50 s průměrem 0,40, kdy se horní hranice měření částečně kryla s kontrolním růstem HepG2. S rostoucí koncentrací dále klesala absorbance velmi mírně. Při kultivaci s polyfenoly o koncentraci 75 µg/m byly naměřeny hodnoty od 0,37 - 0,40 s průměrem 0,39 a u poslední měřené koncentrace (100 µg/ml) byl výsledek v průměru jen o 0,01 nižší, tedy 0,38, avšak s velmi malou odchylkou měření 0,37 - 0,39.

Obr. 12. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Frankovky: A - 25 $\mu\text{g/ml}$, B - 50 $\mu\text{g/ml}$, C - kontrola, D- 75 $\mu\text{g/ml}$, E - 100 $\mu\text{g/ml}$

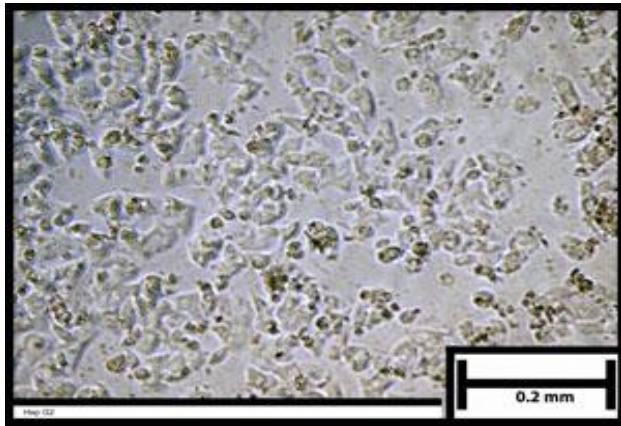
A**B****C****D****E**



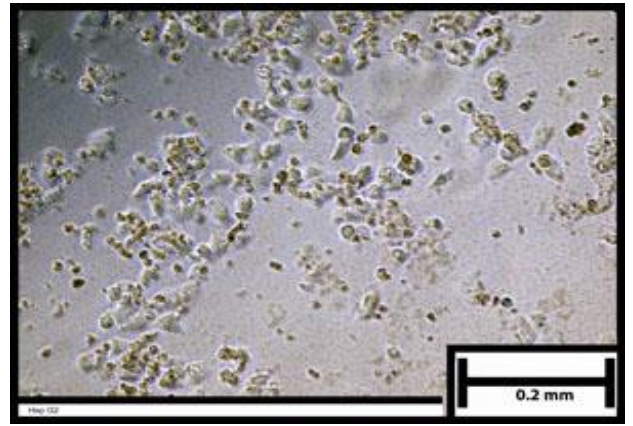
Graf 5. Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Frankovky

Obr. 13. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z pozdního sběru Frankovky: A - 25 $\mu\text{g/ml}$, B - 50 $\mu\text{g/ml}$, C - kontrola, D- 75 $\mu\text{g/ml}$, E - 100 $\mu\text{g/ml}$

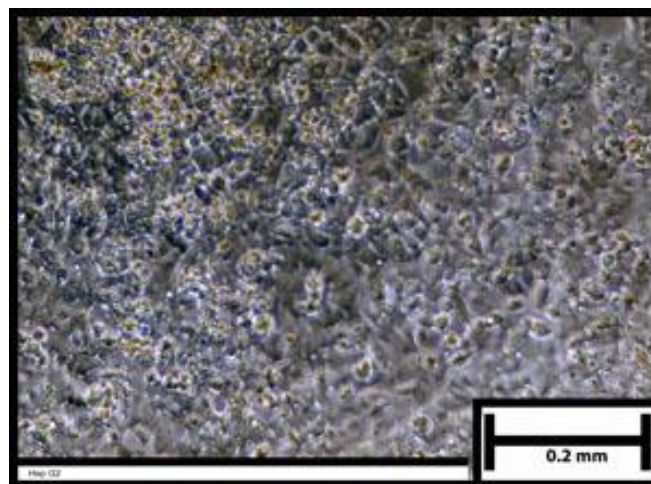
A



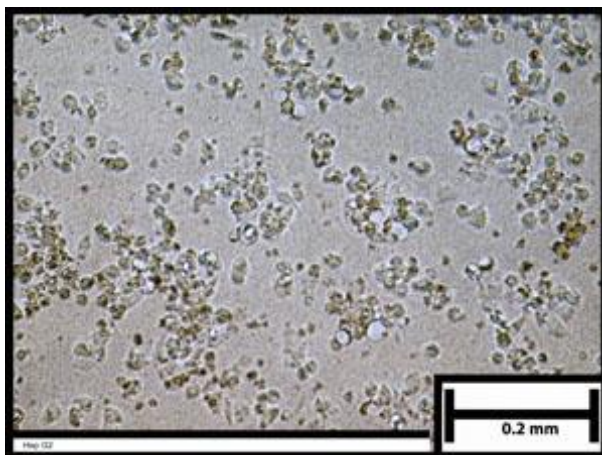
B



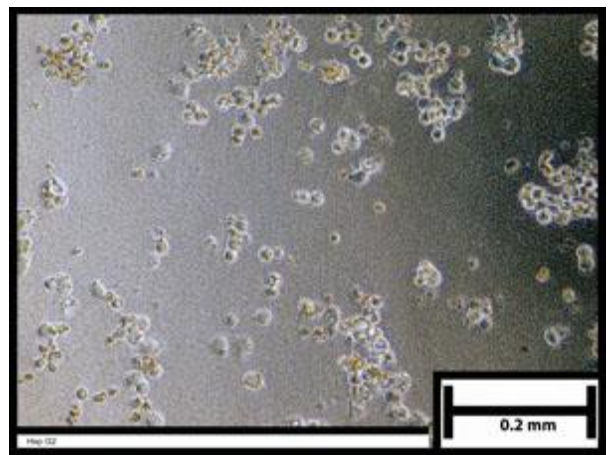
C



D



E

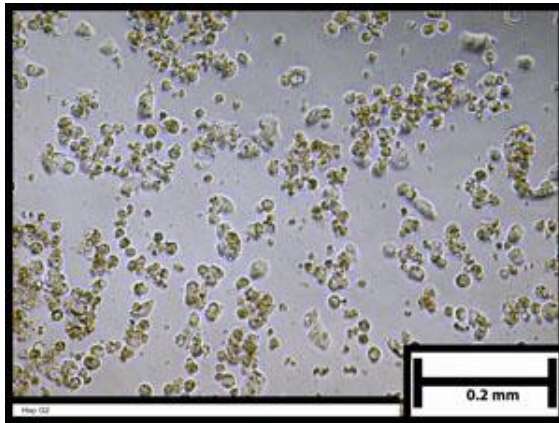
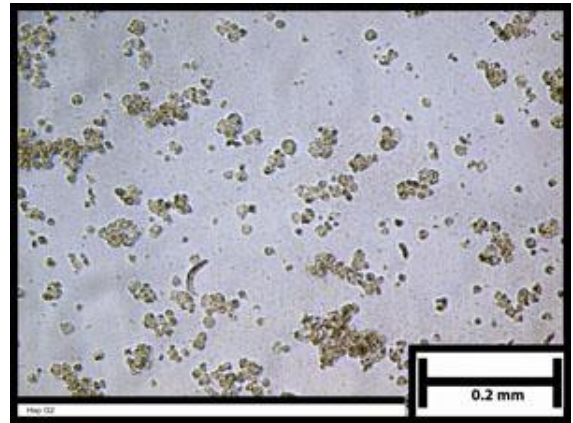
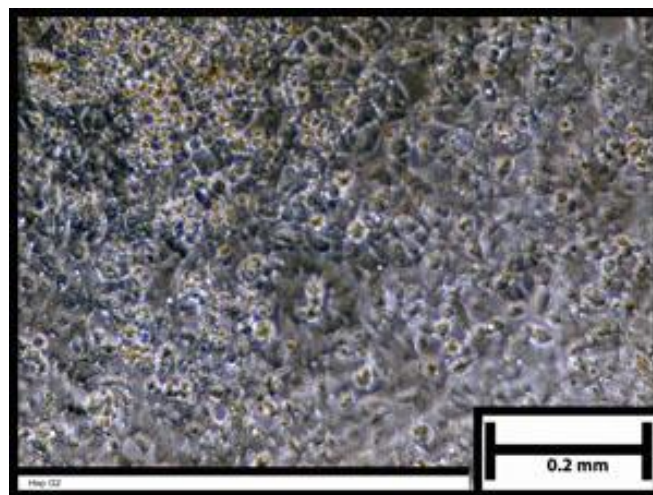
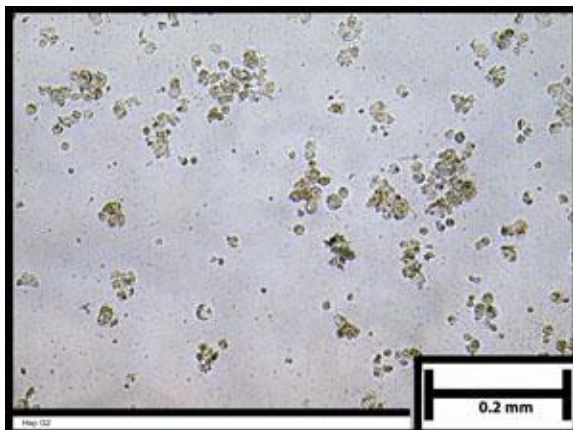
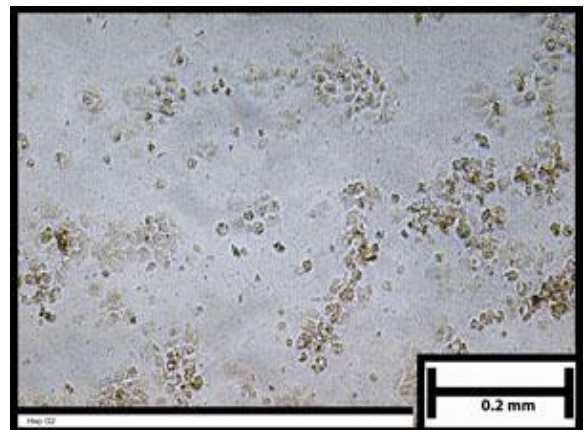


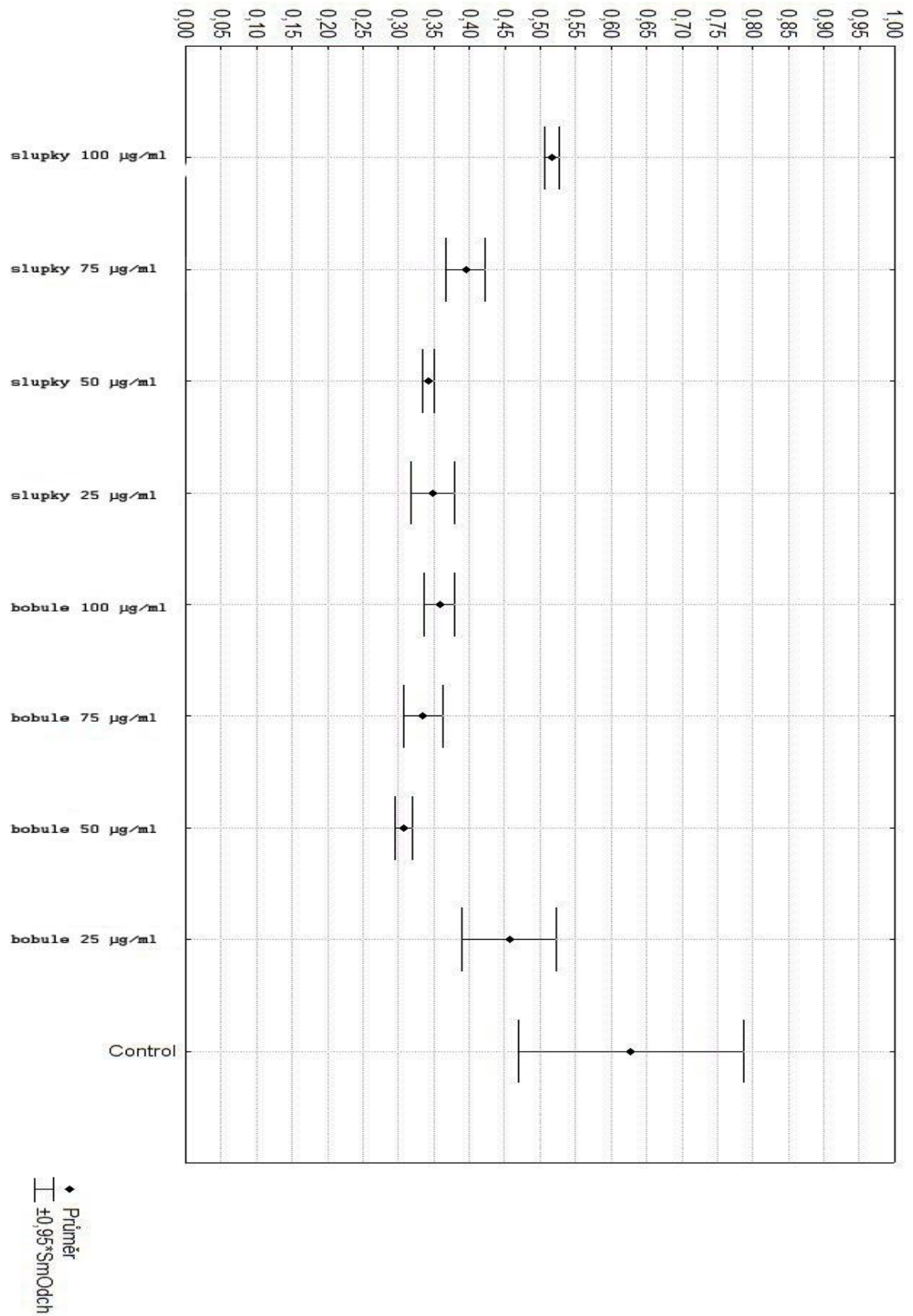
7.2.3 Muškát moravský

Měření absorbance s přidávanými polyfenoly ze slupek Muškátu moravského byla pro HepG2 překvapivá (Graf 6). Se zvyšující se koncentrací polyfenolů by se očekávalo, že bude platit nepřímá úměra jako u ostatních extraktů a proliferace se bude se zvyšující koncentrací polyfenolů snižovat. V tomto případě se buňky chovaly přesně opačně a s rostoucí koncentrací polyfenolů, hodnoty absorbance také rostly.

V koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$ polyfenolů ze slupek Muškátu moravského (Obr. 14) byla průměrná absorbance 0,46 se směrodatnou odchylkou 0,39 - 0,52, která vyjadřovala jisté snížení oproti kontrole, ne však statisticky významné. Ve vyšší koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ polyfenolů byly výsledky velmi přesné, protože měly odchylku pouze 0,33 – 0,35 (průměr 0,34). U 75 $\mu\text{g/ml}$ koncentrace byla průměrná hodnota 0,40, ale velkou odchylkou měření (0,30 - 0,50), která se shodovala s kontrolním pokusem, a proto nebyla statisticky významným výsledkem. Ačkoliv se posledním vzorkem k HepG2 přidalo největší množství polyfenolů (100 $\mu\text{g/ml}$) průměr absorbance byl 0,52 (0,51 – 0,53) a proliferaci buněk tato koncentrace významně neovlivnila. Je však viditelné na Obr. 14, že morfologie jen mála buněk, zůstala nepoškozená. Polyfenoly extrahované z bobulí Muškátu moravského již měly účinek na HepG2 přímo úměrný (Obr. 15). Nejvíce se snížila absorbance přidáním extraktu o koncentraci polyfenolů 50 $\mu\text{g/ml}$, a to na průměrnou hodnotu 0,31 s velmi malým rozptylem 0,30 - 0,32, který byl pro HepG2 vůbec nejnižší dosaženou hodnotou ze všech odrůd a měření. U 25 $\mu\text{g/ml}$ nebyly hodnoty absorbance tak výrazné a pohybovaly se na rozhraní 0,39 - 0,52. Průměrná hodnota tohoto vzorku byla 0,46 a na proliferaci působil tento obsah polyfenolů minimálně. Dobrých výsledků dosáhla koncentrace 75 $\mu\text{g/ml}$, kdy se hodnota absorbance zredukovala přesně na polovinu hodnoty kontrolního měření o průměru 0,34. Poslední měření již nepřineslo velké skoky. Kultivace s přidavkem 100 $\mu\text{g/ml}$ snížila absorbanci na 0,36 z původních 0,63, což je výsledek statisticky významný.

Obr. 14. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Muškátu moravského: A - 25 $\mu\text{g/ml}$, B - 50 $\mu\text{g/ml}$, C - kontrola, D- 75 $\mu\text{g/ml}$, E - 100 $\mu\text{g/ml}$

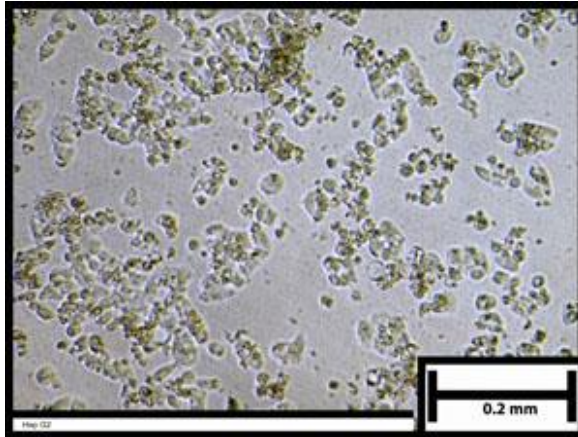
A**B****C****D****E**



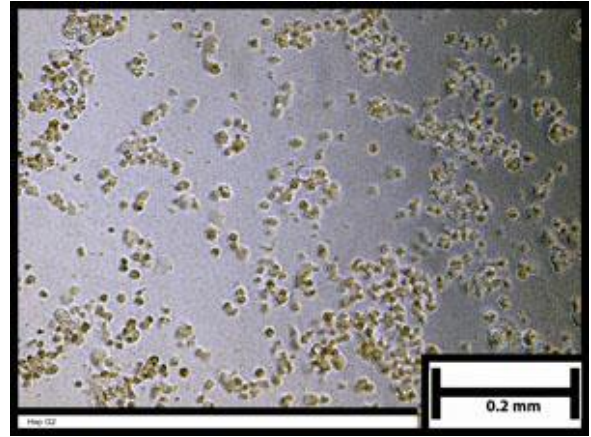
Graf 6. Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Muškátu moravského

Obr. 15. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z bobulí Muškátu moravského: A - 25 $\mu\text{g/ml}$, B - 50 $\mu\text{g/ml}$, C - kontrola, D- 75 $\mu\text{g/ml}$, E - 100 $\mu\text{g/ml}$

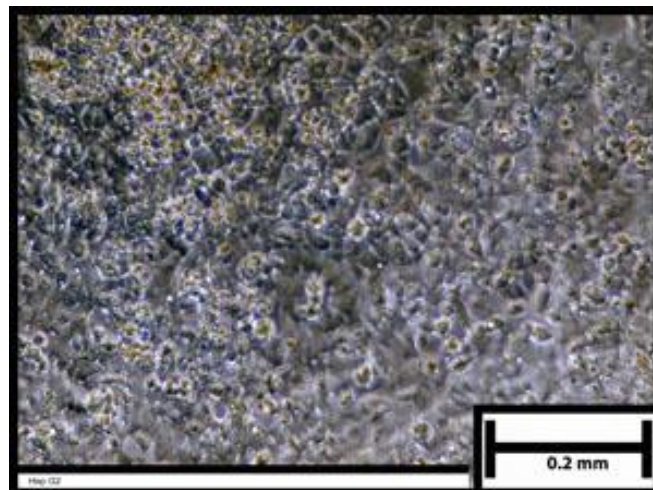
A



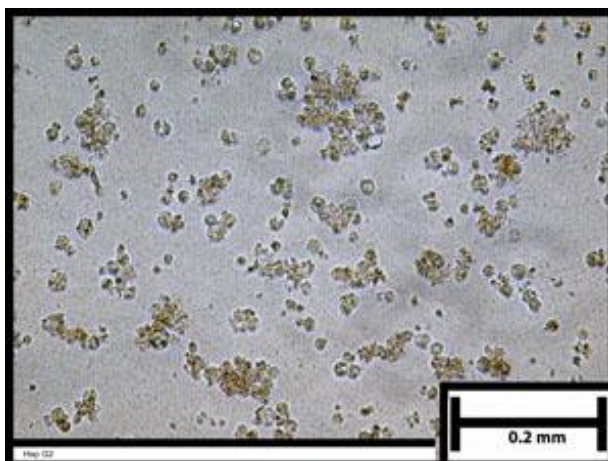
B



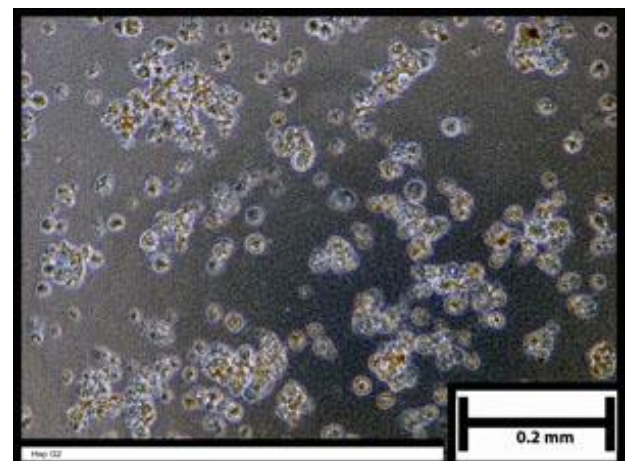
C



D



E



7.3 Diskuse

V této diplomové práci byl sledován vliv polyfenolů extrahovaných ze tří různých odrůd révy vinné a různých částí této rostliny na dva typy nádorových buněk. Pro extrakci byly použity z červených vín slupky, bobule a pozdní sběr odrůdy Burgundy modré a slupky a pozdní sběr odrůdy Frankovka. Zástupcem bílých vín byl Muškát moravský, ze kterého byly použity slupky a bobule. Z každého vzorku byly naředěny čtyři koncentrace polyfenolů (100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml a 25 µg/ml), které jsme následně nechali působit na buněčné linie lidských keratinocytů (HaCaT) a hepatocytů (HepG2).

Bylo zjištěno, že nejvyšší celkové množství polyfenolů nemusí mít vždy nejvýraznější účinek. Ačkoliv měla odrůda Muškátu moravského celkový obsah polyfenolických látek nejnížší, působení extraktů právě z této odrůdy bylo velmi účinné. Naopak nejvyšší obsah polyfenolů měla Burgunda modrá, která se však v působení na buňky dělí o druhé místo s Frankovkou, která měla obsah polyfenolů o 1/3 nižší. Je tedy zřejmé, že více než celkový obsah polyfenolů ve vínu má větší vliv jednotlivé zastoupení dílčích polyfenolů ve směsi. Zkoumání vlivu polyfenolů na různé druhy rakovinové tkáně se již v minulosti týkalo mnoho studií. Výzkumná skupina Caderni a kolektivu (2000) sledovala vliv hmotnosti vysoko molekulárních polyfenolů (HMWP), nízkomolekulárních polyfenolů (LMWP) a celkových polyfenolických extraktů (směsí) z červeného vína (WE) na karcinom tlustého střeva. Jejich výsledky ukázaly, že celková směs polyfenolických látek (WE) měla lepší inhibiční vliv na proces karcinogeneze tlustého střeva, než HMWP nebo LMWP samostatně [CADERNI, 2000]. Tyto závěry byly v souladu s předchozími pozorováními [FEMIA, 2005], a proto zkonstatovali, že ochranný účinek vína polyfenolů na rakovinové buňky, je lepší zkoumat v komplexních směsích. K tomuto závěru dospěli také ve studii Hakimuddin a kolektiv (2008), kteří zkoumali vliv polyfenolů vína Merlot ve vztahu k jejich schopnosti modulovat expresi genů v rozvoji nádorů na MDA a MB231 u holých myší. Ukázalo se, že celkové polyfenoly dosáhly až 50% a 60% snížení růstu nádoru, oproti kontrolnímu pokusu. Z celkových polyfenolů Merlotu, zaujímal největší podíl Malvidin 3-OO glykosid, kterému se také přičítá největší podíl účinku. Na závěr své studie shrnují skutečnost, že aby polyfenoly mohly v jejich přirozené formě ukázat prospěšnost působení na klinický materi-

ál, musí zůstat ve směsi, kvůli kombinovanému efektu různých částí a jejich působení na vícenásobných cílech. Také navrhuji, aby bylo vynaloženo úsilí využít hroznových a vinných polyfenolů pro prevenci a léčbu široké škály efektů v expresi genů, zejména u prsních rakovinových buněk [HAKIMUDDIN, 2008].

V léčbě nádorových buněk však záleží na velkém množství faktorů. Mnoho studií dokazuje, že je také důležité, v jaké formě se ve směsi jednotlivé polyfenoly vyskytují a jaký je typ buněk, které jsou jejich působení vystaveny [HIDA, 1998]. Mimo jiné výsledek experimentu ovlivní také výskyt různých izomerů [HASTÜRK, 2002], použití různých technik analýzy genové exprese a jednotlivých interpretací výsledků [ERMERT, 2003]. Odlišnosti ve výsledcích pro zkoumané geny proto mohou být důsledkem těchto rozdílů [FANG 2003]. Objevují se studie, ze kterých se dá vyčíst, že některé polyfenoly mohou ovlivňovat proliferaci pouze v nízkých koncentracích [MELZOCH, 2001]. V mé práci dosáhla nejvyššího antiproliferačního účinku odrůda bílého vína Muškátu moravského, který právě působil lépe v nižších koncentracích, než ve vysokých. Tento výsledek se objevil také ve studii Totušek (2008), ve které použili kmeny TA98 a TA100 ke kultivaci s polyfenoly, jenž vykazovaly vyšší inhibici ve zředěném stavu, a to zejména u botritických bobulí. Tento jev vysvětluje tak, že směs polyfenolů, měla vyšší obsah některých antioxidantů – zejména resveratrolu, který si rostlina vytváří, stejně jako fytoalexin, jako obranou látku v bobulích napadených houbou [LANDRAULT, 2002]. Toto zjištění je v souladu s výsledky stanovení polyfenolických látek včetně stilbenů, ve vzorcích ze stejných materiálů [TOTUŠEK, 2008] a také s našimi výsledky. I když se v těchto studiích pracovalo s polyfenoly získanými z jiných odrůd révy vinné (Chardonnay, Ryzlink vlašský a Rulandské šedé), dal by se jimi vysvětlit náš výsledek.

Stratil et al. (2008) 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]. Liu a kolektiv (2004) zjistili, že polyfenoly červeného vína polyfenolů mají selektivní toxicitu na MCF-7 (buněk rakoviny prsu), ovlivněním homeostázy vápníku a na vápníku závislých procesů, jako je funkce mitochondrií a progresu buněčného cyklu. Proto mohou polyfenoly červeného vína uplatňovat synergický nebo doplňkový účinek tím, že modulují funkci více cílů, které jsou

potenciálně aktivní v nádorových buňkách. Výsledky z této studie argumentují pro roli polyfenolů v potravě jako signální molekuly a poskytovatele užitečných pokynů pro rozvoj preventivních strategií a produktů, které by byly cílené na rakovinné buňky a současně s minimálními toxickými účinky na normální buňky. Modulace genů v buněčném cyklu signalizuje, že hroznové a vinné polyfenoly by mohly ovlivňovat buněčnou proliferaci také v živém organismu. Pro ošetření polyfenoly však musí být stanoveno přesně kvantifikované množství [LIU, 2004].

Studie Fen (2009) zkoumala vliv resveratrolu (3,5,40-trans-trihydroxystilben) na buňky lidské leukémie (HL-60). Aby bylo možné najít více aktivních antioxidantů resveratrolu, byl jako hlavní sloučenina syntetizován 4,40-dihydroxy-trans-stilben (4,40-DHS). Antioxidační aktivity resveratrolu a 4,40-DHS byly hodnoceny inhibičními účinky proti volným radikálům na lidské erytrocyty. Bylo zjištěno, že 4,40-DHS vykazuje výrazně vyšší antioxidační aktivitu než resveratrol. Jelikož je resveratrol nejčastěji a v největší míře přítomným polyfenolem v hroznech a červeném víně, byl označen hlavním protagonistou jevu, zvaného Francouzský paradox (z medicinal), o němž již byla zmínka v kapitole 3.5. Výzkumů na vliv resveratrolu je mnoho, protože je mu přisuzováno nejvíce blahodárných účinků a jednu z prvních studií, zabývající se resveratrolem publikoval Šmidrkal et al. (2001). Možné chemopreventivní účinky vína byly uvedeny také ve studii Kopec (1999). V současné době existují stovky studií týkajících se tohoto tématu z různých úhlů pohledu a na různé úrovni odborných znalostí, dle možností nálezů ve světové literatuře. Přehled těchto studií ve své práci předložil Zendulka (2006).

Jelikož jsem ve své práci nedělala rozbor dílčích polyfenolů, ale zkoumala jsem jen celkovou směs polyfenolů extrahovanou z daných odrůd, mohlo by být toto odlišné složení nejpravděpodobnějším vysvětlením toho, že jsme zjistili odlišný obsah polyfenolických látek ve slupkách a v bobulích révy a tím pádem mnohem vyšší účinnosti extraktů ze slupek oproti extraktům z hroznů révy vinné. Moje domněnka se opírá o podobné studie, kde např. Melzoch et al. (2001) zjistili výrazně vyšší hladiny trans-resveratrolu (209 a 440 mg / kg) ve stoncích než v listech (3,6 a 9,9 mg / kg), a to zejména s odrůdami "Teinturier". Bobule obsahovaly 0,7 - 5,8 mg/kg *trans*-resveratrolu, který byl produkován přednostně, v porovnání s *cis*-izomerem [MONAGAS, 2006]. Moreno et al. (2008) zkoumal distribuci resveratrolu uvnitř bobulí. Při této studii byly však použity jiné druhy vín: tři bílé odrůdy (Chardonnay, Ryzlink vlašský, a Pinot gris) a tři modré odrůdy (Saint Laurent, André a

Modrý Portugal) *Vitis vinifera* L. pocházející z vinné révy regionu Mikulov (jižní Morava, ČR). Zkoumali zdravé vzorky a vzorky listů vína, mladé boční výhony, hroznové stopky a bobule napadené *Botritis* nad úrovní 40%. Z výsledků této studie plyne, že většina *trans*-resveratrolu byla přítomna ve slupce bobulí a v bobulích samotných v menší míře v semenech, zatímco obsah *cis*-resveratrolu byl celkově 10 krát nižší. Také ve slupkách námi zkoumaných odrůd mohlo být zastoupeno vyšší množství resveratrolu, které způsobilo apoptózu buněk ve větší míře, než extrakty z jiných částí révy vinné. Slupky všech tří odrůd dosahovaly lepších výsledků, než bobule, nebo pozdní sběr hroznů. Třapiny, které jsou odpadem při výrobě vína, mohou být v některých odrůdách významným zdrojem *trans*-resveratrolu [MELZOH, 2001]. Totéž platí pro slupky révy vinné, které jsou potencionálním zdrojem polyfenolických látek pro lékařství či farmacii, ale při výrobě vína jsou prozatím pouze odpadem [ROMERO-PÉREZ, 2001].

V práci Zendulka (2006) byla studována mimo jiné závislost činnosti *trans*-resveratrolu na pohlaví jedinců. Bylo zjištěno, že u samic potkanů je tato forma polyfenolu metabolizována rychleji, než u samců. Možné vysvětlení spočívá v estrogením účinku *trans*-resveratrolu, který je schopen navázat se na estrogení receptory a tím se rychleji vstřebávat. Epidemiologické důkazy naznačují, že červené víno může obsahovat směs fenolických sloučenin, které chrání proti onemocnění srdce. Účinek červeného vína a jeho komponent na růst a proliferaci lidského karcinomu dlaždicových buněk studoval Elattar a Virji (1999). Chan a Delucchi (2000) vyšetřovali mechanismus založený na inaktivaci cytochromu (P450 3A4) resveratrolem izolovaným z červeného vína. Studie o antimitogenní aktivitě polyfenolických frakcí z hroznových semen a výtažků z hroznů odrůd *Vitis vinifera*, byly publikovány také u autorů Agarwal et al. (2000) a Stagos et al. (2005). Analýza exprese genu v S100A2 NSCLC jsou poněkud rozporuplné. Studie [FENG, 2001] naznačuje, že karcinogeneze plic (S100A2) může být potlačena v raném stádiu, ale později údaje naznačují, že by to mohlo dojít k silné expresi u většiny NSCLC nádorů [SMITH, 2004]. Možnost využití spočívá v identifikaci pacientů s NSCLC v raném stádiu [WANG, 2005], nebo dokonce jako prediktor (předpověď) vzdálených metastáz [DIEDERICHS, 2004]. K tomuto výzkumu byly všechny karcinomy ve stadiu I-III. Pozitivní genová exprese byla významně spojena s horším přežitím buněk [STRAŽIŠAR, 2009].

Z dalších studií vychází, že např. kvercetin blokuje buněčný cyklus u G1/S v žaludku a u leukemických buněk [YOSHIDA, 1992] způsobuje ve fázi G2/M blok u nádorových bu-

něčných linií v prsní tkáni a hrtanu [FERRANDINA, 1998]. Genistein ovlivňuje G1 i G2 u melanomu myši [KUZUMAKI, 1998]. V nedávné studii specifických polyfenolů frakce z brusinek se ukázalo, že dokáže indukovat apoptózu v několika lidských buněčných liniích karcinomu prsu a brzdí progresi buněčného cyklu [FERGUSON, 2004]. Již zmíněný resveratrol z hroznů a vína, indukoval enzymy fáze II. a inhiboval I. kappa B-kinázy činnosti, klíčovým regulátorem NF-kappa B aktivace a signalizační enzymy, jako proteinkinázy C v U-937 myeloidní a HeLa H4 a epitelové buňky [HOLMES-McNARY, 2000]. To potvrzuje také obdobná studie Middleton (2000), která píše, že fytochemikálie, jako jsou terpeny, polyfenoly, karotenoidy, a sulfurcontaining sloučeniny, mají potenciál snížení výskytu rakoviny rozvoj.

Srovnání obsahu polyfenolů a jejich antioxidační aktivita poskytovanou různými metodami v červeném, bílém a sherry víně zkoumal Fernández-Pachón et al. (2006) a Stratil et al. (2008), který také zkoumal antioxidační účinek vybraných polyfenolů na celkovou antioxidační aktivitu. Hlavním chemoprotektivním polyfenolických látek v bobulích, třapínách a stopkách z deseti kultivarů *Vitis vinifera L.*, rostoucí v jižních viničích Moravy, studoval Mikeš et al. (2008). Ukázalo se, že při působení polyfenolů na gen LATS2 (large tumor suppressor) způsobily regulaci u nádorů varlat, prsu a leukémie [JAMINÉZ-VELASCO, 2005]. Polyfenoly červeného vína (v koncentraci 50 mg/kg tělesná hmotnost) vpravovány s dietou pro krysy po 16 týdnů, potlačily střevní vývoj rakoviny indukované dimethylhydrazinem [DOLARA, 2003]. V další studii Chen et. al. (1998) demonstroval prevenci prsní rakoviny působením hroznové šťávy na modelu nahých myši používáním na MCF. V myších krmených výživou žaludeční sondou s 0,5 mL hroznové šťávy za den po dobu 5 týdnů, byla velikost nádorů redukována o 70%, ve srovnání s velikostí nádoru ve zvířatech, která hroznovou šťávou krmena nebyla. Toto může iniciovat k názoru, že by lidé, kteří konzumují polyfenoly, by mohly mít podobnou odezvu, potenciálně vedoucí k prevenci rakoviny prsu [BELTZ, 2006]. Z dalších studií týkajících se polyfenolů extrahovaných ať z čajů, nebo jiných rostlinných materiálů, se výsledky účinků polyfenolů shodují. Většina autorů však dodává, že experimenty byly provedeny s kulturami v podmínkách *in vitro* a u použití stejných metod s živými organismy, nebo celými orgány, nemusí souhlasit s jejich výsledky.

Z těchto závěrů vyplývá, že potencionální využití polyfenolických látek z vína pro léčbu nádorových onemocnění je možné. Výsledky potvrzují, že i nízká koncentrace polyfenolů

může potlačit proliferaci nádorových buněk významnou měrou. Ukazují také na další možné využití révy vinné v lékařství i farmacii. Především slupky, které jsou při výrobě vína pouze odpadním materiálem a dále se nevyužívají, dosahovaly velmi dobrých výsledků. Dalo by se jich proto využít k prevenci a léčbě řady nemocí.

ZÁVĚR

V diplomové práci bylo cílem popsat vliv polyfenolů extrahovaných z různých odrůd révy vinné a porovnat výsledky s jinými výzkumy. Obsah polyfenolů byl stanoven metodou HPLC (kapalinová chromatografie) a výsledky byly detekovány MTT testem. Byly použity tři odrůdy vína. Burgunda modrá a Frankovka byly zástupci červených vín a jedinou bílou odrůdu zastoupil Muškát moravský. Byly také porovnávány rozdíly mezi účinkem polyfenolů z celých bobulí, ze slupek jednotlivých odrůd a také z botritických hroznů. Vliv těchto polyfenolů byl testován na dvou buněčných kulturách HaCaT a HepG2.

Celkový obsah polyfenolů v nativním stavu byl nejvyšší v odrůdě Burgundy modré a Muškát moravský, měl naopak obsah nejnižší. Přesto zaznamenaly extrakty z Muškátu moravského lepší výsledky. Je tedy pravděpodobné, že se z pohledu výzkumu, nejedná pouze o celkové množství polyfenolů v rostlinách, ale také o dílčí složení polyfenolických látek. Účinnost polyfenolů na zmírnění proliferace v měřeních se dá hodnotit z několika pohledů. První je na úrovni použitých částí rostliny (materiálu), ze kterého byly polyfenoly extrahovány. Druhým kritériem je koncentrace a v neposlední řadě typ buněk, které byly ke kultivaci použity. Komplexně se pak dá vyhodnotit odrůda, která měla nejlepší celkový výsledek. Podle materiálu použitého k extrakci polyfenolů byly nejméně účinné bobule révy vinné, následně pozdní sběr hroznů a neúčinněji působily vzorky ze slupek vína. Většina extraktů působila na zmírnění proliferace od koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ a nejvíce pozitivních výsledků bylo zaznamenáno u koncentrace 75 $\mu\text{g/ml}$. Z pohledu použité koncentrace polyfenolů vyšla jako neúčinnější odrůda Muškátu moravského, který významně působil již v malých koncentracích a také působil největší měrou. Druhá byla Burgunda modrá, jejíž výsledky byly statisticky významné v polovině měření. Frankovka proliferaci také ovlivnila, ale pouze v nejvyšších koncentracích a nepříliš významně. Pro posouzení neúčinnější odrůdy je třeba hodnocení rozdělit na HaCaT a HepG2. U HaCaT byly výsledky srovnatelné u Muškátu moravského i Burgundy modré. Obě odrůdy vykazovaly příznivý antiproliferační účinek již od nízkých koncentrací přidaných polyfenolů. U HepG2 ovlivnil proliferaci nejvíce Muškát moravský s největší účinností i nejnižší koncentrací pro danou účinnost. Ačkoliv většina studií tvrdí, že červená vína by měla mít polyfenolů více a na proliferaci působit lépe, tato práce dokazuje, že tomu tak nemusí být. V celkovém hodnocení antiproliferační účinnosti na nádorové buňky z vybraných vín, účinkovaly nejvíce polyfenoly extrahované z bílého vína odrůdy Muškátu moravského.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J. *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky.* Ústí nad Labem, *Esp. Pub.* (1998) 630 s., ISBN: 978-0-8153-2045-6.

AGARWAL, C., SHARMA Y., ZHAO, J. F., AGARWAL R. A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen-activated protein kinases activation and inducing G (1) arrest and differentiation. *Clinical Cancer Res.*, (2000) 6: 2921–2930.

AUSUBEL, F. M, KINGSTONE, R., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH J. A., STRUHL, K. *Short Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons Inc., (2002) NY, USA. pp. 102 - 109. 728 s.

BALIN, A. K., GOODMAN B. P., RASMUSSEN, H., & CRISTOFALO, V. J., The effect of oxygen tension on The growth and metabolism of WI-38 cells. (1976) *J. Cell Physiol.* 89: 235-250.

BARNES, D., & SATO, G. Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. *Anal. Biochem.* (1980) 102: 255-270.

BELTZ, A., KAY, BAYER L. D., LYN, MOSS, A. MICHELL S. I., Mechanisms of cancer prevention by green tea and black tea polyphenols. *Anti-Cancer, Agents Med. Chem.* (2006) 6: 389-406.

BLACK, M. M., OPLER, S. R. AND SPEER, F. D: Microscopic structure of gastric carcinoma and their regional lymph nodes in relation to survival. *Surg. Gynec. Obstet.*, (1954) 98, 725.

BODE, A. M.; DONG, Z. Molecular and cellular targets. *Mol Carcinog.* (2006) 45, 422-30; DOI 110.1002/mc.20222.

BOUKAMP, B. A., VINKE, I. C., SESHAN, K., VRIES de K. J., and BUGGRAAF, A. J. *Influence of electrode geometry and NLLS fit analysis of I-V measurements in a three-electrode cell.* *Solid State Ionics*, (1988) 28-30 (Part 2) pp. 1187-1191. ISSN 0167-2738

BRAVO L. (1998): Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rew.*, 56: 317–333.

- BUCHANAN, B., B., GRUISSEM W., JONES R. L.: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *Am. Soc. of Pl. Physiol.*, Rockville (2000) 852s. ISBN: 978-0-943088-37-2.
- BUTLER, M., & CHRISTIE, A. Adaptation of mammalian cells to non-ammoniaogenic media. *Cytotechnology* (1994) 15: 87-94-
- CADERNI, G.; De FILIPPO, C.; LUCERI, C.; SALVADORI, M.; GIANNANA, A.; BIGGERI, A.; REMY, S., CHEYNIER, V.; DOLARA, P. Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis* (2000) 21: 1965-1969.
- CAPUTO, J. L. Safety Procedures. In Freshney, R. I., Freshney, M. G., Culture of Immortalized Cells. NY, *Wiley-Liss*, (1996) pp. 25–51. ISBN: 978-0-471-12134-3.
- CATTANI, P.; PIENNELLI, M.; SCAMBIA, G.; RANELLETTI, F. O. Growth inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type II. estrogen binding sites in human laryngeal cancer cell lines and primary laryngeal tumors. *Int. J. Cancer* (1998) 77:747-754.
- CELIS, J. E.; RASMUSSEN, H. H.; OLSEN, E.; MADSEN, P.; LEFFERS, H.; HONORÉ, B.; DEJGAARD, K.; GROMOV, P.; VORUM, H.; VASSILEV, A.; BASKIN, Y.; LIU, X.; CELIS, A.; The human keratinocyte two-dimensional gel protein database :Towards an integrated approach to the study of cell proliferation, differentiation and skin diseases. *Electrophoresis*; (1994) 15: 1349-1458.
- COURTENAY, V. D., SELBY, P. I., SMITH, I. E. MILLS, J., & PECKHAM, M. J. Growth of human tumor cell colonies from biopsies using two soft-agar techniques. *Br. J. Cancer* (1978) 38: 77-81.
- ČEPIČKA, J. Obecná potravinářská technologie, 1.vyd. Praha: Vyd. VŠCHT (1995) 246 s. ISBN 80-7080-239-1.
- DAMIANAKI, A., BAKOGEOROU E., KAMPA, M., NOTAS, G., HATZOGLUOU, A., PANAGIOTOU, S., GEMETZI, C., KOUROUMALIS, E., MARTIN, P. M., & CANSTANAS, E. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J.Cell. Biochem.* (2000) 78, 439-441.
- De RIDDER, L., & MAREEL, M. Morphology and concentration of embryonic Chin thyroids cultured in an atmosphere of oxygen. *Cell Biol. Int. Rep.* (1978) 2: 189-194.
- DELGADO, M. A. R., HERMÁNDEZ, G. G., GONZÁLES, J. E. C., & TRUJILLO, J. P. P., Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines, (2002) p. 523-532, sv. 4, 78 s. ISBN: 978-0-7425-6300-1.

- DIEDERICHS, S., BULK, E., STEFFEN, B., JI, P., TICKENBROCK, L., LANG, K., ZÄNKER, K. S., METZGER, R., SCHEIDER, P. M., GERKE, V., TOMAS, M., BERDEL, W. E., SERVE, H. & MÜLLER-TIDOW, C. S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* (2004) 64 :5564-5569.
- DOLARA, P.; LUCERI, C.; De FILIPPO, C.; FEMIA, A. P.; GIOVANNELLI, L.; DOSTÁL, J., KAPLAN P., *Lékařská chemie II.*, 1.vyd., Masarykova univerzita v Brně (2003) Brno, 223 s. ISBN 80-210-2731-2.
- DULBECCO, R., & FREEMAN, G. Plaque formation by the polyoma virus. *Virology* (1959) 8: 396-397.
- EAGLE, H. The effect of enviromental pH on the growth of normal and malignit cells. *J. Cell Physiol.* (1973) 82: 1-8.
- EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures, *Science* (1959) 130: 423.
- EISINGER, M., LEE, J. S., HEFTON, J. M., DARZYKIEWICZ, A., CHIAO, J. W., & DEHARVER, E. Human epidermal cell cultures – growth and differentiation in the absence od dermal components or medium supplements. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, (1979) 76: 5340.
- ELATTAR, T. M. A., VIRJI, A. S. The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Research*, (1999) 19: 5407–5414.
- ERMERT, L., DIERKES, C. and ERMERT, M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors. *Clin. Cancer Res.* (2003) 9: 1604-1610.
- FANG, H.Y., LIN, T.S., LIN, J.P., WU, Y.C., CHOW, K.C. and WANG, L.S. Cyclooxygenase-2 in human non-small cell lung cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* (2003) 29: 171-177.
- FENG, G., XU, X., YOUSSEF, E. M., LOTAN, R. Diminished expression of S100A2, a putative tumor suppressor, at early stage of human lung carcinogenesis. *Cancer Res.* (2001) 61: 7999-8004.
- FERGUSON, P. J., KUROWSKA, E., FREEDMAN, D. J., CHAMBERS, A. F., KOROPATNICK, D. J., A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *J. Nutr.* (2004) 134:1529-35.

- FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S., VILLAÑO, D., TRONCOSO A. M., GARCÍA-PARRILLA M. C. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Anal. Chem. Act.*, (2006) 563: 101–108.
- FERRANDINA, G.; ALMADORI, G.; MAGGIANO, N.; LANZA, P.; FERLINI, C.; Growth-inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type II. estrogen binding sites in human laryngeal tumors (1998). *Int. J. Cancer*, 11, 747-754.
- FOSTER, R., & MARTIN, G. S. A mutation in the catalytic domain of pp60v-src is responsible for the host- and temperature- dependent phenotype of the Rous sarcoma virus mutant tsLA33-1. *Virology* (1992) 187: 145-155.
- FRESHNEY, R. I. & FRESHNEY M. G. culture of epithelial cells. 2nd ed., Hoboken, NJ, Wiley-liss, (2002) Chapters 6,10, 11, 12, 13. ISBN: 978-0-471-22120-3.
- 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.
- FUJITA, A., NORIKO S., GOTO-YAMAMOTO N., HITOSHI S., KAKUTA T., KOIZUMI T. and HASHIZUME K. Anthocyanidin Reductase Gene Expression and Accumulation of Flavan-3-ols in Grape Berry. *Amer. Jour. of Enol. and Vitic.*, (2005) 56, 4. s. 336 – 337. ISBN: 981-2-4205-8228-5 .
- GEHM, B. D., McANDREWS, J. M., CHIEN, P.Y., JAMESON, J. L., Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94: 14138–14143.
- GOOD, N. E., WINGET, G. D., WINNTER, W., CONNOLLY, T. N., IWAZA, S., & SINGH, R. M. M., Hydrogen ion buffers and biological research. *Biochem.* (1966) 5: 467-477.
- HAKIMUDDIN A. F., TIWARIB K., GOPINADHAN P., MECKLINGC K. Grape and wine polyphenols down-regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor-negative MDA-MB231 tumors in nu/nu mouse xenografts, *Sci. Dir.* 28 (2008) 702–713 DOI :10.1016/j.nutres.2008.06.009.
- HAM, R. G., Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1965) 53: 288.

HAM, R.G., McKEEHAN, W. L. Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells. *In Vitro* (1978) 14: 11–22.

HARRINGTON, R. J., Food and wine pairing a sensory experience, *John Wiley & Sons*, New Jersey (2008), ISBN: 978-0-471-79407-3.

HASTÜRK, S., KEMP, B., KALAPURAKAL, S. K., KURIE, J. M., HONG W. K. and LEE, J. S. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* (2002) 94: 1023-1031.

HESS, D.: Fyziologie rostlin. Praha: 1.vyd., Academia, (1983) 341 s, ISBN: 978-80-200-0586-1.

HIDA, T., YATABE, Y., ACHIWA, H., MURAMATSU, H., KOZAKI, K., NAKAMURA, S., OGAWA, M., MITSUDOMI, T., SUGIRUA, T. and TAKAHASHI, T. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res.* (1998) 58: 3761-3764.

HEELDT H., W.: Plant Biochemistry and Molecular Biology, *Oxford University Press*, 18 (1997) ISBN 0-19-850180-3.

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. (1998) 87: 117–131.

HOLMES-McNARY, M.; BALDWIN, A. S., Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of 1 kappa B kinase. *Cancer Res.* (2000) 60: 3477-3483.

HYVONEN, T., ALAKUIJALA, L., ANDERSSON, L., KHOMUTOV, A. R., KHOMUTOV, R. M., & ELORANTA, T. O.: 1-Amino-oxy-3-aminopropane reversibly prevents the proliferation of cultured baby hamster kidney cells by interfering with polyamine synthesis. *J. Biol. Chem.*, (1988) 263: 1138-1144.

CHAN, W. K., DELUCCHI, A. B. Resveratrol, a red wine constituent, is a mechanism-based inactivator of cytochrome P450 3A4. *L. Sci.* (2000) 67: 3103–3112.

CHEN, Z. P.; SCHELL, J. B.; HO, C. T.; CHEN K. Y. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett* (1998), 129 (2), 173-9; DOI 610.1016/S0304-3835(98)00108-6.

IBOLIA MOLNÁR-P., Quantitation of amino acids and amines by chromatography: Methods and protocols. *J. of Chrom. Libr.*, vol. 70 (2005).

ISCOVE, N. N., & MELCHERS, F. Complete replacement of serum by albumin, transferrin and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J. Exp. Med.* (1978) 147: 923-933.

JAMINÉZ-VELASCO, A., ROMÁN-GOMÉZ, J., AGIRRE, X., BARRIO, M., NAVARRO, G., VÁZQUEZ, I., PROSPÉR, F., TORRES, A. and HEINIGER, A.: Downregulation of the large tumor suppressor 2 (LATS2/KPM) gene is associated with poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 19 (2005) 2347-2350.

KAMINSKA, B., KACZMAREK, L., & GRZELAKOWSKA-SZABERT, B.: The regulation of G₀-S transition in mouse T lymphocytes by polyamines. *Exp. Cell Res.* (1990) 191: 239-245.

KALLITHRAKA, S.; ARVANITOYANNIS, I.; ELZAJOULI, A.; KEFALAS, P. The application of an improved method for *trans*-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chem.*, (2001) 75, p. 355-363.

KARMIOL, S. Development of serum-free media in masters, *Animal Cell Culture*, 3rd Ed., Oxford University Press, (2000) 105–121.

KHAN, N.; AFAG, F.; MUKHTAR, H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis* (2007), 28(2), 233-9; DOI: 110.1093/carcin/bgl243.

KHENNOUF, S., BENABDALLAH, H., GHARZOULI, K. Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *J. of Agric. and Food Chem.*, (2003). 51, 1469–1473.

KOHOUT F. *O víně*. 2. Vyd., Praha: *Merkur*, (1986) 265 s. ISBN: 51-573-8658-3.

KOPEC, K.: Resveratrol – chemoprotective komponent of grapes and wine. *Zahradnictví – Hort. Sci.*, Praha (1999). 26: 135–138.

KRAUS, V., FOFFOVÁ, Z., VURM, B., *Nová encyklopedie českého a moravského vína* 2. díl. 1.vyd. Praha: *Praga Mystica*, (2008) 311s. ISBN: 978-80-86767-09-3.

KUTTELVAŠER, Z. Abeceda vína. 1 vyd. Praha 3: *Radix*, (2003) 280 s. ISBN 80-86031-43-8.

KUZUMAKI, T.; KOBAYASHI, T.; ISHIKAWA, K., Genistein induces p21Cip1/WAF1 expression and blocks the G1 to S phase transitiv in mouse fibroblast and melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998), 251, 291-295.

KYSELÁKOVÁ M., BALÍK, J., VEVERKA J, TRÍSKA J., VRCHOLOVÁ N., TOTUŠEK J., LEFNEROVÁ D. Resveratrol v červených vínech. *Vinařský obzor*, (2003) 7–8: 357–358.

KYZLINK, V. Skladování a zpracování zahradnických plodin. Praha:, *SPN*, (1968) 443s. ISBN: 978-0-444-98844-7.

LACHMAN, J., PIVEC, V., ORSÁK, M. Polyphenols compounds - antioxidants influencing biological quality of seed [online].[cit. 2010-11-4]. Dostupné z: <http://www.agris.cz/vyzkum/detail.php?id=111118&iSub=566&PHPSESSID=a3>

LANDRAULT, N., LARRONDE, F., DELAUNAY, J. C., CASTAGNINO, C., VERCAUTEREN, J., MERILLON, J.M., GASC, F., CROS, F., TEISSEDRE, P.L. (2002): Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J. of Agric. and Food Chem.*, 50: 2046–2052.

LAMPART-SZCZAPA E., SINGER A., TROJANOWSKA K., NOGALA-KALUCKA M., MALECKA M., PACHOLEK B., Chemical composition and antibacterial activities of lupin seeds extracts. *Nahr. Food.*, (2003) 286 s.

LEE, B. L., ONG, C. N. Komparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* 881, 439-447. *Depart. of Com., Occupat. and Fam. Med.*, National University of Singapore, Singapore (2000) 117597, Vol. 881, Iss.1-2, DOI:10.1016/S0021-9673(00)00215-6.

LESKO, J.: Práce s tkanivovými kulturami, Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied Bratislava (1975) 212 s. ISBN: 937-90-3988-032-2.

LIPSKÁ, L.; VISKOKAI, V. *Recidiva kolorektálního karcinomu*. Vyd.1. Praha : *Grada*, (2009) 456 s. ISBN 978-80-247-3026-4.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention. Mechanism of action. *J. Nutr.* 2004, 134: 3479- 3485.

LUŠTINEC, J., ŽÁRSKÝ, V.: Úvod do fyziologie vyšších rostlin. *Nakl. Karolinum*, (2003) Praha, ISBN: 80-246-0563-5.

MACHOLÁN, L. Sekundární metabolity, Masarykova Univerzita Přírod. Fakulta, Brno (1998) ISBN: 80-210-1735-4.

MATHER, J. P. Making informed choices: medium, serum, and serum-free medium. How to choose the appropriate medium and culture system for the model you wish to create. *Methods Cell Biol.* (1998) 57: 19–30.

McCORMICK, C., FRESHNEY, R. I., & SPEIRS, V. Activity of interferon alpha, interleukin 6 and insulin in the regulation of differentiation in A549 alveolar carcinoma cells. *Br. J. Cancer* (1995) 71: 232-239.

McKEEHEN, W. L., & HAM, R. G. Simulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrate coated with basic polymers. *J. Cell Biol.* (1976) 71: 727-734.

MELZOCH, K., HANZLÍKOVÁ, I., FILIP, V., BUCKIOVÁ, D., ŠMIDRKAL, J. Resveratrol in parts of wine and wine originating from Bohemian and Moravian vineyard regions. *Agric. Consp. Scient.*, (2001) 66: 53–57.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOPHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. ReV.* (2000) 52: 673-751.

MIKEŠ, O., VRCHOTOVÁ, N., TRÍSKA J., KYSELÁKOVÁ M., ŠMIDRKAL J. Distribution of major polyphenolic compounds in vine grapes of different cultivars growing in South Moravian vineyards. *Cz. J. of Food Sci.*, (2008): 26: 182–189.

MINÁRIK, E., NAVARA, A. Chémia a mikrobiológia vína. Bratislava: *Príroda*, (1986) 426 s. ISBN: 978-80-247-3487-3.

MONAGAS, M., GARRIDO, I., BARTOLOME, B., GOMEZ-CORDOVES, C. Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Anal. Chem. Acta.*, (2006) 563: 401–410.

MOORE, G. E., GERNER, R. E., & FRANKLIN, H. A., Culture of normal human leukocytes. *J. Am. Med. Assoc.* (1967) 199: 519-524.

MORGAN, J. G., MORTON, H. J., & PARKER, R.C. Nutrition of animal cells in tissue culture, I: Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1950) 73:189.

- NEVILLE, V.: Polyphenols and health. *Nova Sci. Pub.* (2008) ISBN: 978-1-60456-349-8.
- NIKFARDJAM, M. S., LÁSZLÓ G., DIETRICH, H. Resveratrol-derivatives and antioxidative capacity in wines made from botrytized grapes, *Food. Chem.* (2006) 96: 74-79
- ODSTRČIL, J., ODSTRČILOVÁ, M. *Chemie potravin*. 1 vyd. Brno: *Mikadapress*, (2006) 164 s. ISBN: 80-7013-435-6.
- PAGANGA G., ALHASHIM H., KHODR H., SCOTY B. C., AROMA O. I., HIDER, R. C., HALLIWELL B., RICEEVANS C. A.: Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. *Redox Rep.*, (1996) 2: 359–364.
- PARKER, R. C., CASTOR, L. N., & McCULLOCH, E. A. Altered cell strains in continuous culture. *Special publications. NY Acad. Sci.* (1957) 5: 303-313.
- 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.*, (2000) 80: 985-1012.
- PLANAS-SILVA, M. D., WEINBERG, R. A. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* (1997) 9:768-772.
- PREISSMANN, A., WIESMANN, R., BUCHLOZ, R., WERNER, R. G., & NOE, W. Investigations on oxygen limitations of adherent cells growing on macroporous microcarriers. *Cytotech.* (1997) 24: 121-134.
- RICE-EVANS, C. A., MILLER N. J., PAGANGA G. Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. and Med.*, (1996) 20: 933–956.
- RECHNER A. R., KUHNLE G., BREMNER P., HUBBARD, G. P., MOORE K. P., RICE-EVANS C. A.: The metabolite fate of dietary polyphenols in humans. *Free Rad. Biol. and Med.*, (2002) 33: 220–235.
- RODRÍGUEZ – BERNALDO DE QUIRÓS, A.: HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay, p. 1018-1022, (2009) ISSN: 1438-2377
- ROP, O., HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1 vyd. Zlín: *UTB*, (2009) 129 s. ISBN: 978-80-7318-748-4.

ROMERO-PÉREZ A. I., IBERN-GÓMEZ M., LAMUELA-RAVENTÓS R. M., TORREBORONAT M. C. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins.: *J. Agric. Food Chem.* (2001) 49: 210-215.

RYAN, D.; ROBARDS, K.; PRENZLER, P.; ANTOLOVICH, M. TRAC. Applications of mass spectrometry to plant phenols. *Trends in Anal. Chem.* (2002) 18, 362-372.

SAKKIADI, A. V.: Direct HPLC Assay of Five Biologically Interesting Phenolic Antioxidants in Varietal Greek Red Wines, USA, (2001) p. 410-413, ISBN: 80-903201-0-4.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENES, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2005), 45(4), 287-306; DOI: 110.1080/1040869059096.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. Ed. *Col. Spr. Har. Lab.*, New York, (1989). 1832s.

SAUCIER C. T., WATERHOUSE A. L. Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *J. of Agric. and Food Chem.*, (1999), 47: 4491–4494.

SLANINA J., TÁBORSKÁ E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy* 98, (2004) 239-245.

SMITH, S. L., GUGGER, M., HOBAN, P., RATSCHILLER, D., WATSON, S. G., FIELD, J. K., BETTICHER, D. C. & HEIGHWAY, J.: S100A2 is strongly expressed in airway basal cells, preneoplastic bronchial lesions and primary non-small cell lung carcinomas. *Br. J. Cancer* (2004) 91:1515-1524.

SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K.: Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. *J. of Food Comp. and Anal.*, (2001) 14, n. 4, p. 441-445.

SPECTOR D. L., GOLDMAN R. D.: Basic methods in microscopy: Protocols and concepts from Cells : A laboratory manual, sv. 2, *CSHL Press* (1998), 382 s.

STOKER, M. G. P. Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. *Nature* (1973) 246: 200–203. doi:10.1038/246200a0

STAGOS, D., KAZANTZOGLOU, G., MAGIATIS, P., MITAKU, S., ANAGNOSTOPOULOS, K., KOURETANS, D. Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int. J. of Mol. Med.*, (2005) 15: 1013–1022.

- STEIDL, R. Sklepní hospodářství. 1.vyd.. *Valtice: Národní salon vín*, (2002) 307 s.
- STRATIL, P., KUBŇ V., FOJTOV J. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Cz. J. of Food Sci.*, (2008) 26: 242–253.
- STRAŽIŠAR M., MLAKAR V. & GLAVAČ D. The expression of COX-2, h-tert, MDM2, LATS2 and S100A2 in different types of non-small cell lung cancer (NSCLC) *Cel. Mol. Biol. Let.* Vol. 14 (2009) pp. 442-456, DOI: 10.2478/s11658-009-0011-7.
- SU, H. Y., BOS, T. J., MONTECARLO, F. S., & VOGT, P. K. Inhibits myogenic differentiation. *Oncogene* (1991) 6: 1759-1766.
- SUJAK A., KOTLARZ A., STROBELI W. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds.: *Food Chem.* (2006) 98, 711-719 .
- ŠEVČÍK L. Červená vína. Hledání pravdy o víně. GRADA (1999), 139s. ISBN: 978-80-7169-840-1.
- ŠÁRŠÚNOVÁ M., TÖLGYESSY : HPLC in Pharmacy and biochemistry, 3. Vyd.. A. *Húthing Buch Verlag*, Heidelberg (1990) 335s.
- ŠMIDRKAL, L., FILIP V., MELZUCH, K., HANZLÍKOVÁ, I., BUCKIOVA, D., KŘÍSA, B. :Resveratrol. *Chem. Listy*, (2001) 95: 602–609.
- ŠVEJCAR, V., MINÁRIK, E. Vinařství- Biochemie vína. 1. vyd. Brno: *Vysoká škola zemědělská*, (1976) 77s.
- TOTUŠEK, J., VRCHOTOVÁ, N., TRÍSKA J., MAREČKOVÁ L. Resveratrol v červených vínech z jihomoravských vinařských oblastí. *Chem. Listy*, (2000): 94: 973–974.
- TOTUŠEK, J, LEFNEROVÁ, D., KYSELÁKOVÁ M., BALÍK J., VEVERKA J., TRÍSKA J., VRCHOTOVÁ N. Antimutagenic activity of raw materials and by-products from production of grape wines. *Czech J.Food Sci*, (2008) 55 – 59s., ISSN: 1212-1800.
- TOZER, B. T., & PRIT, S. J. Suspensio culture of mammalian cells and macromolecular growth promoting fractions of calf serum. *Nature* (1964) 201: 375-378.
- TROWELL, O. A., The kulture of manure organs in a sythetic medium. *Exp. Cell.*, (1959) 216 s. ISBN: 3-7785-1699-X.
- VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 2.*, Vyd. 2., Tábor: *OSSIS* (2002) 304 s. ISBN 80-866-5901-1.

- WANG, H., ZHANG, Z., LI, R., ANG, K. K., ZHANG, H., CARAWAY, N. P., KATZ, R. L. and JIANG, F. Overexpression of S100A2 protein as a prognostic marker for patients with stage I non small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* (2005) 116:285-290.
- WATERHOUSE, A. L. Wine phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2002), 21-36: 957s.
- WAYMOUTH, C. Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells. *In Vitro* (1970) 6: 109-127.
- WESTERMARK, B., WASTESON, A. The response of cultured human normal glial cells to growth factors. *Adv. Metab. Disord.* (1975) 8: 85–100.
- WYLLIE, F. S., BOND, J. A., DAWSON, T., WHITE, D., DAVIES, R., & WYNFORD-THOMAS, D. A phenotypically and karyotypically stable human toroid epithelial line conditionally immortalized by SV40 large T-antigen. *Cancer Res.* (1992) 52: 2938-2945.
- YAMADA K. M., & GEIGER, B. Molekular interactions in cell adhesion complexes. *Cur. Opin. Cell Biol.* (1997) 9: 76-85.
- YOSHIDA, M.; YAMAMOTO, M.; NIKAIDO, T.: Quercetin arrests human leukemic T-cells in late G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res.* (1992) 52, 6676-6681.
- ZENDULKA O., ZAHRADNÍKOVÁ L., JUŘICA J. and TOTUŠEK J., The Influence of *Trans-resveratrol* and Quercetin on the Activity of CYP1A2 in Rat, *Vol. 26, Special Issue: S60–S64 Czech J. Food Sci.* (2006) GAČR 525/06/1757.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Atd.	A tak dále.
MTT	Master Technology Teacher. (test cytotoxicity)
µg	Mikrogram
HPLC	Kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
COX-1	Cyklooxygenáza-1
mg	Miligram
l	Litr
tzv.	Tak zvaný
h	Hodina
°C	Stupně Celsia
UV	Ultrafialové záření
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal growth factor (růstový faktor)
FGFs	Faktory fibroplastického růstu
PDGF	Platelet-derived growth factor- krevní destičky odvozené od růstového faktoru
VIS	Viditelná část spektra
FACS	Facial Action Coding System – kódovací systém
Bcl-2	B-cell lymphoma (buněčný kmen)
SDS	Dodecyl sulfát sodný
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid – kyselina ethylendiamintetraoctová
CO ₂	Oxid uhličitý
pH	Chemická veličina pro určení kyselosti
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
BES	(pufrační látka)

TES	(pufrační látka)
ECM	Extracelulární matrix
R.T.	Room temperature – teplota místnosti
DMSO	Dimethyl sulfoxide
MEM	Minimum Essential Medium
EtOH	Ethanol
PCR	Polymerázová řetězová reakce
HaCaT	Lidské keratinocyty
HepG2	Hepatocyty
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
ATCC	Airedale Terrier Club of Canada

SEZNAM GRAFŮ

Graf 7. Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Burgundy modré.....	48
Graf 2. Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Frankovky.....	50
Graf 3. Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Muškátu moravského.....	52
Graf 4. Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Burgundy modré.....	55
Graf 5. Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Frankovky.....	62
Graf 6. Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z Muškátu moravského.....	66

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Rozdělení polyfenolů:.....	12
Tab. 2. Chemické složení vína:.....	19
Tab. 3. Obsah fenolických látek ve víně:.....	21
Tab. 4. Testované odrůdy vína:.....	43
Tab. 5. Chemikálie a roztoky:.....	45
Tab. 6. Navážky révy vinné:	45
Tab. 7. Obsah celkových polyfenolů v jednotlivých odrůdách révy vinné	47

SEZNAM OBRÁZKŮ

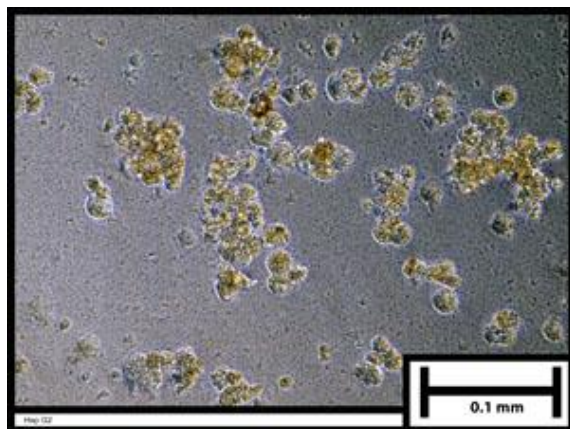
Obr. 1. Strukturní řetězec hydrochinonu:.....	13
Obr. 2. Strukturní vzorek kumarinu:.....	14
Obr. 3. Strukturní vzorec flavanu:	15
Obr. 4. Strukturní vzorec kvercetinu:	16
Obr. 5. Strukturní vzorec katechinu:.....	17
Obr. 6. Strukturní vzorec resveratrolu:	17
Obr. 7. Strukturní vzorec kyanidinu:	18
Obr. 8. Průřez bobulí révy vinné:.....	20
Obr. 9. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Burgundy modré: A - 25 µg/ml, B - 50 µg/ml, C - kontrola, D- 75 µg/ml, E - 100 µg/ml.	56
Obr. 10. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z bobulí Burgundy modré: A - 25 µg/ml, B - 50 µg/ml, C - kontrola, D- 75 µg/ml, E - 100 µg/ml.	58
Obr. 11. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z pozdního sběru Burgundy modré: A - 25 µg/ml, B - 50 µg/ml, C - kontrola, D- 75 µg/ml, E - 100 µg/ml.....	59
Obr. 12. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Frankovky: A - 25 µg/ml, B - 50 µg/ml, C - kontrola, D- 75 µg/ml, E - 100 µg/ml	61
Obr. 13. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z pozdního sběru Frankovky: A - 25 µg/ml, B - 50 µg/ml, C - kontrola, D- 75 µg/ml, E - 100 µg/ml	63
Obr. 14. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Muškátu moravského: A - 25 µg/ml, B - 50 µg/ml, C - kontrola, D- 75 µg/ml, E - 100 µg/ml.....	65
Obr. 15. Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z bobulí Muškátu moravského: A - 25 µg/ml, B - 50 µg/ml, C - kontrola, D- 75 µg/ml, E - 100 µg/ml.....	67

SEZNAM PŘÍLOH

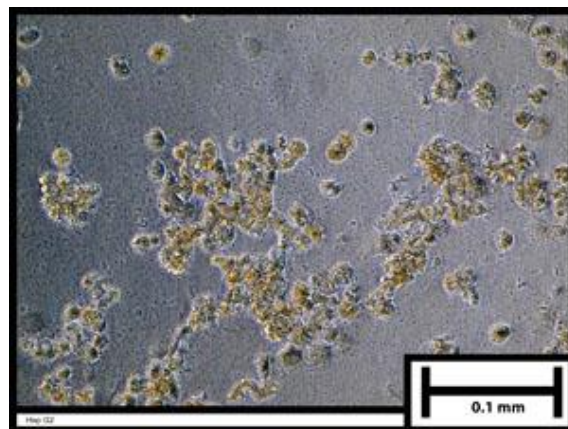
PŘÍLOHA I: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Burgundy modré: A - 25 µg/ml, B - 50 µg/ml, C - kontrola, D- 75 µg/ml, E - 100 µg/ml.....	93
PŘÍLOHA II: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z bobulí Burgundy modré: A - 25 µg/ml, B - 50 µg/ml, C - kontrola, D- 75 µg/ml, E - 100 µg/ml.....	94
PŘÍLOHA III: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z pozd. sběru Burgundy modré : A-25 µg/ml, B-50 µg/ml, C-kontrola, D-75 µg/ml, E-100 µg/ml.....	95
PŘÍLOHA IV: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Frankovky.: A-25 µg/ml, B-50 µg/ml, C-kontrola, D-75 µg/ml, E-100 µg/ml.....	96
PŘÍLOHA V: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z pozního sběru Frankovky.: A-25 µg/ml, B-50 µg/ml, C-kontrola, D-75 µg/ml, E-100 µg/ml.....	97
PŘÍLOHA VI: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Muškátu moravského.: A-25 µg/ml, B-50 µg/ml, C-kontrola, D-75 µg/ml, E-100 µg/ml.....	98
PŘÍLOHA VII: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Muškátu moravského.: A-25 µg/ml, B-50 µg/ml, C-kontrola, D-75 µg/ml, E-100 µg/ml.....	99

PŘÍLOHA I: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Burgundy modré: A - 25 $\mu\text{g/ml}$, B - 50 $\mu\text{g/ml}$, C - kontrola, D- 75 $\mu\text{g/ml}$, E - 100 $\mu\text{g/ml}$.

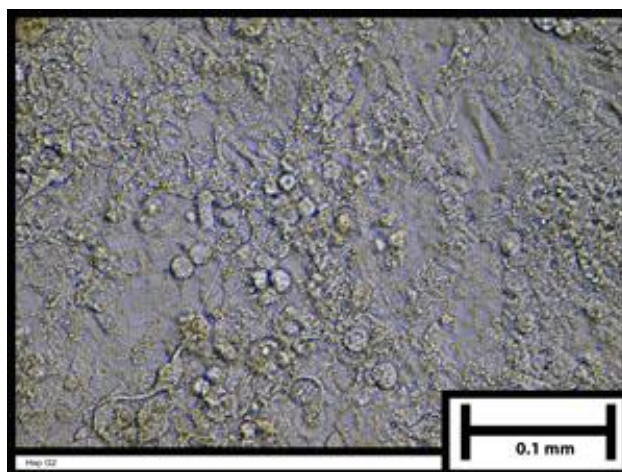
A



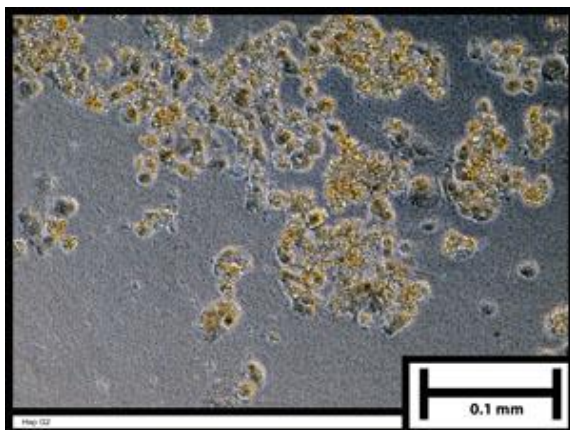
B



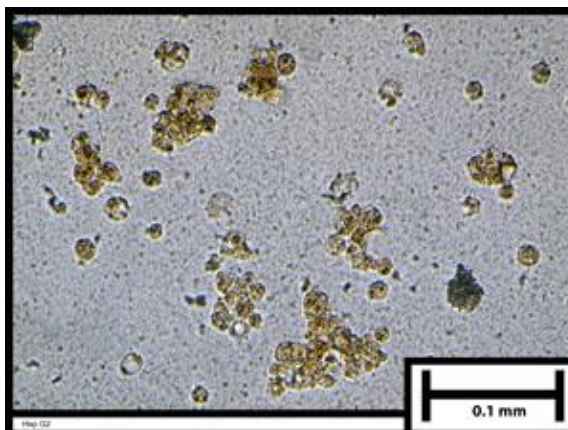
C



D

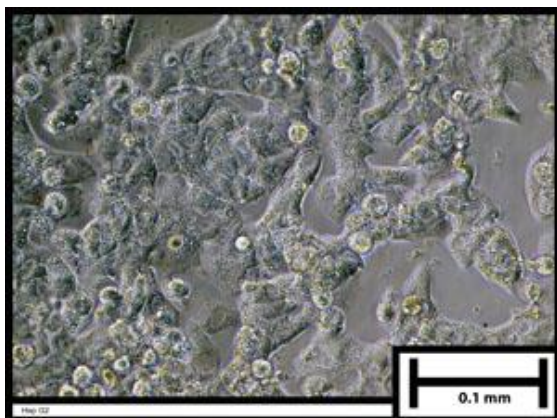


E

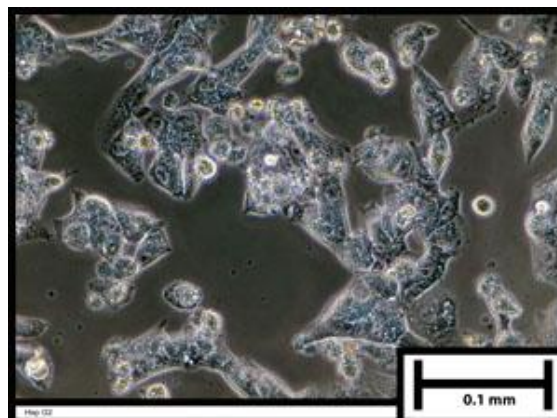


PŘÍLOHA II: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z bobulí Burgundy modré: A - 25 $\mu\text{g/ml}$, B - 50 $\mu\text{g/ml}$, C - kontrola, D- 75 $\mu\text{g/ml}$, E - 100 $\mu\text{g/ml}$.

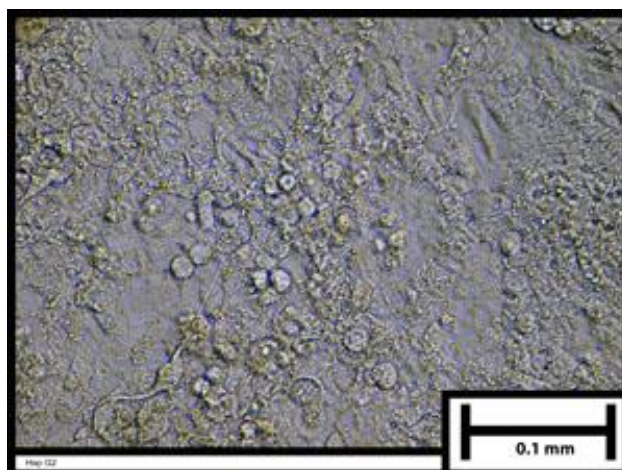
A



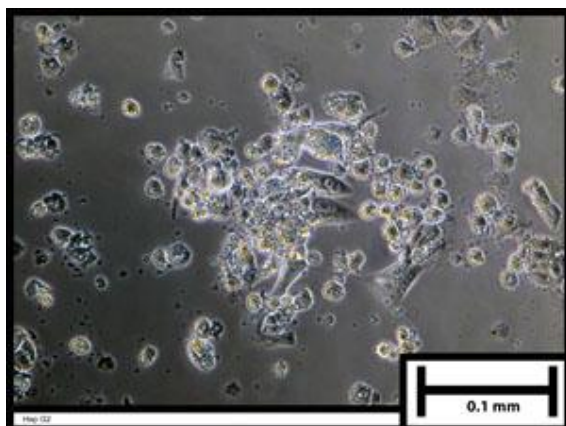
B



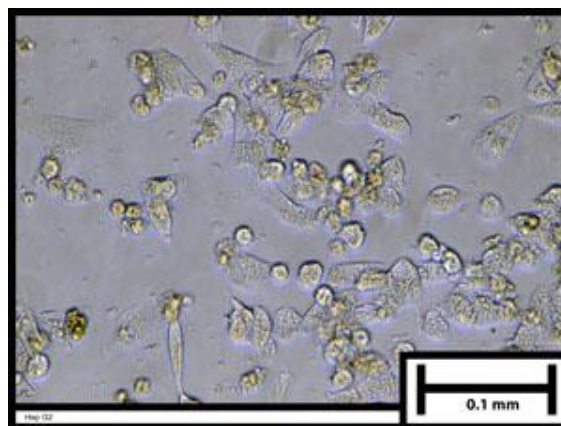
C



D

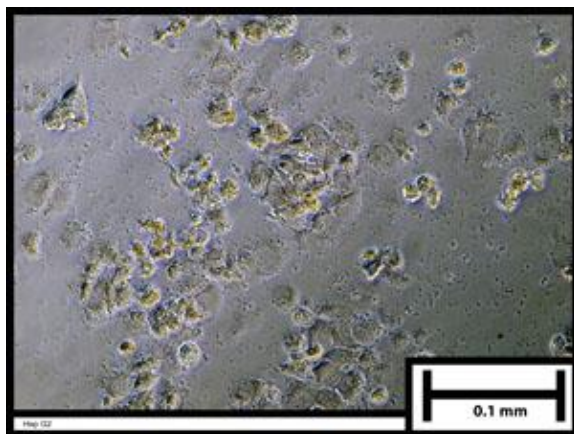


E

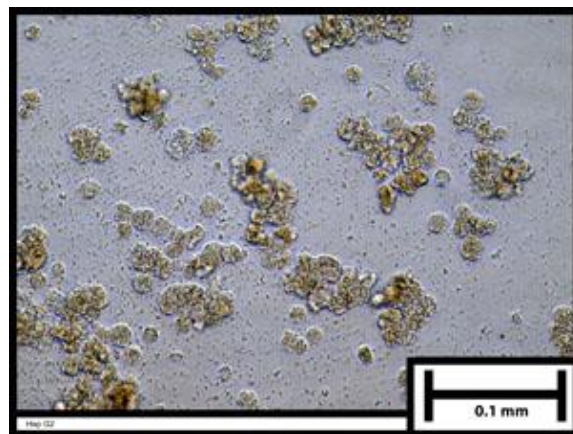


PŘÍLOHA III: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z pozd. sběru Burgundy m.: A-25 $\mu\text{g/ml}$, B-50 $\mu\text{g/ml}$, C-kontrola, D-75 $\mu\text{g/ml}$, E-100 $\mu\text{g/ml}$.

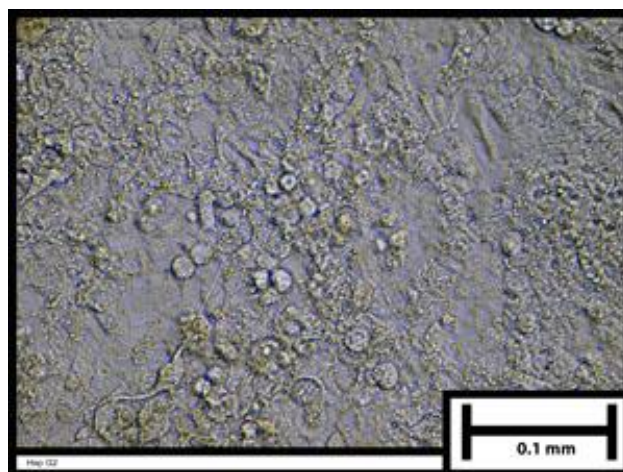
A



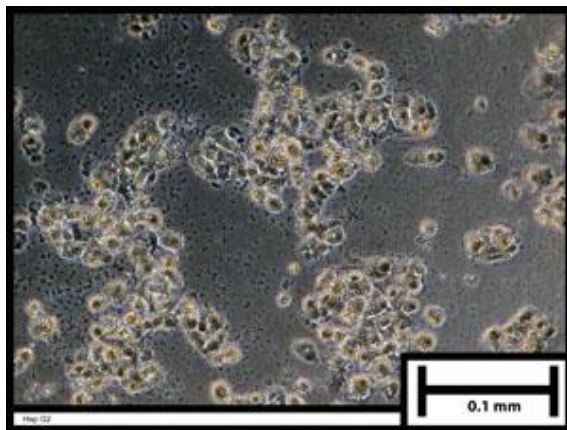
B



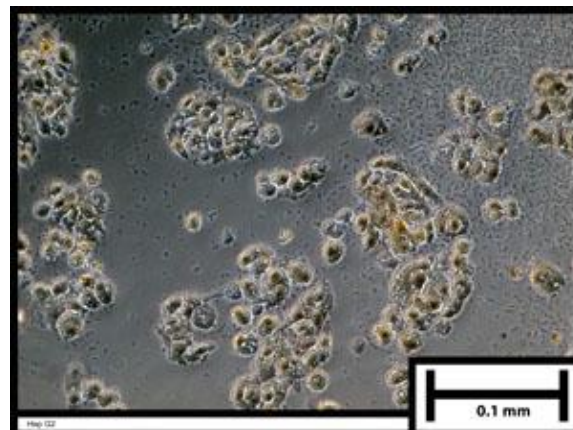
C



D

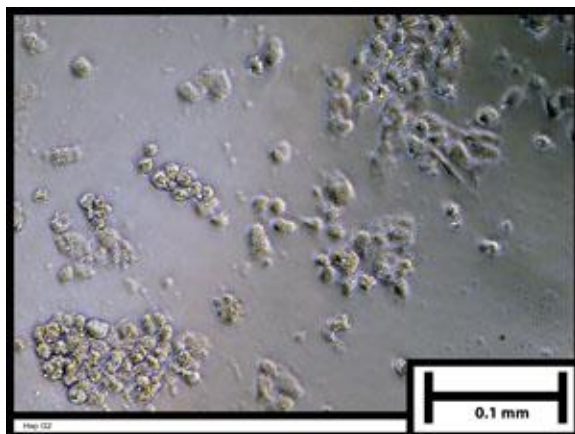


E

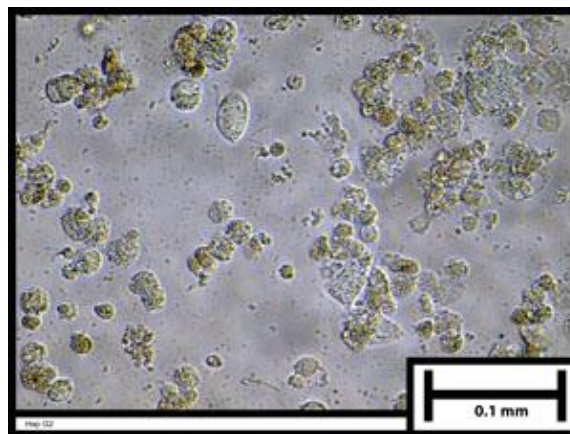


PŘÍLOHA IV: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Frankovky.: A-25 $\mu\text{g/ml}$, B-50 $\mu\text{g/ml}$, C-kontrola, D-75 $\mu\text{g/ml}$, E-100 $\mu\text{g/ml}$.

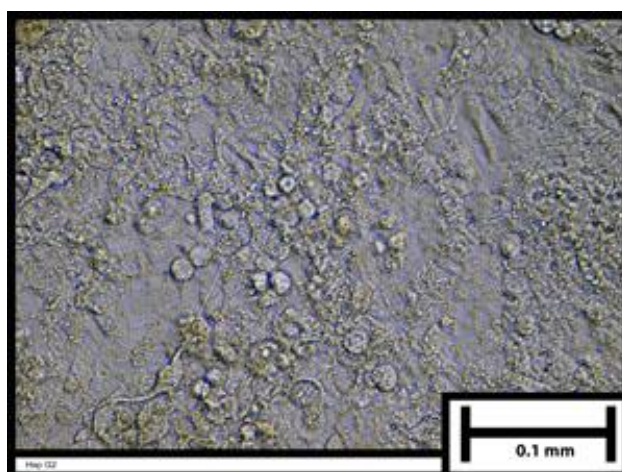
A



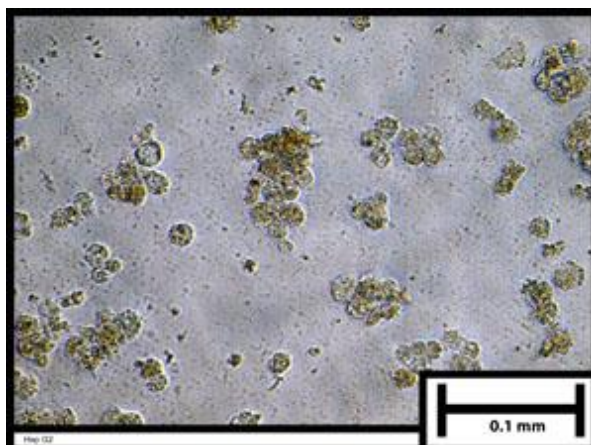
B



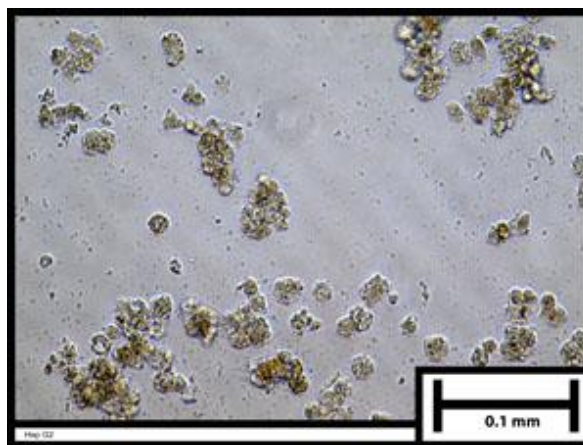
C



D

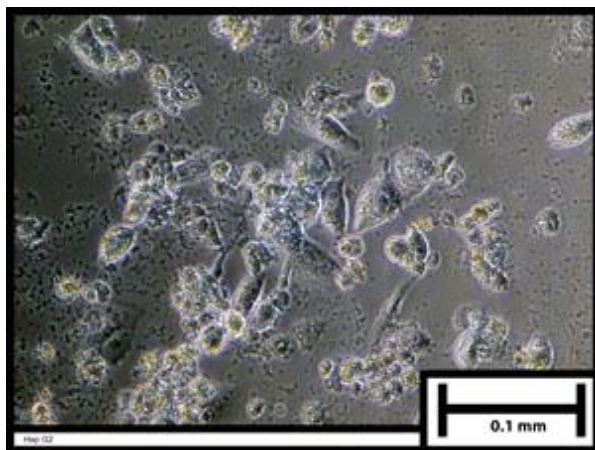


E

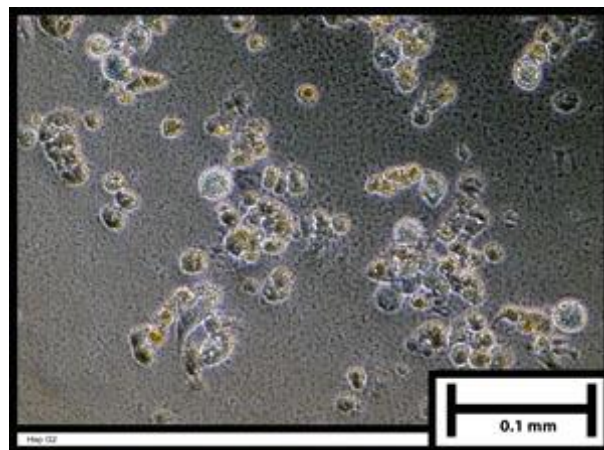


PŘÍLOHA V: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z pozního sběru Frankovky.: A-25 $\mu\text{g/ml}$, B-50 $\mu\text{g/ml}$, C-kontrola, D-75 $\mu\text{g/ml}$, E-100 $\mu\text{g/ml}$.

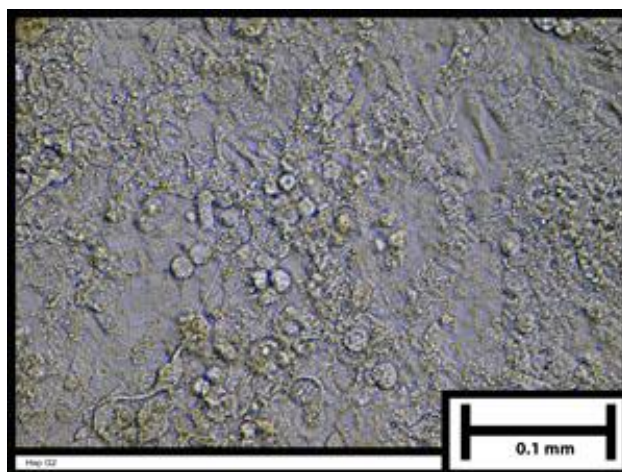
A



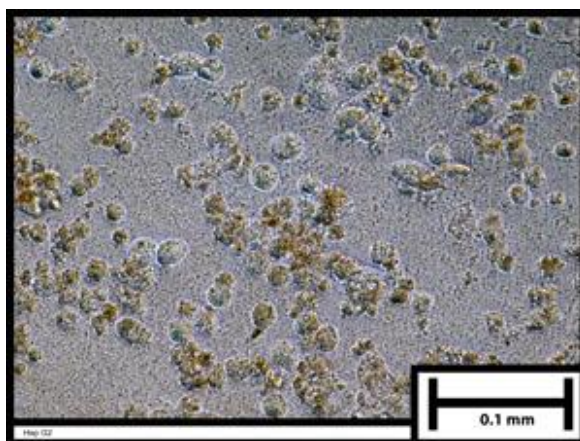
B



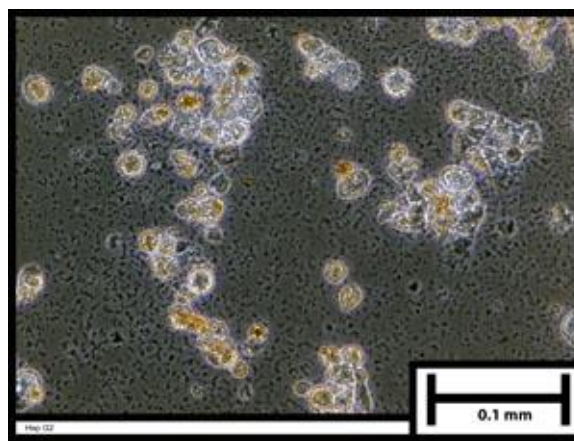
C



D

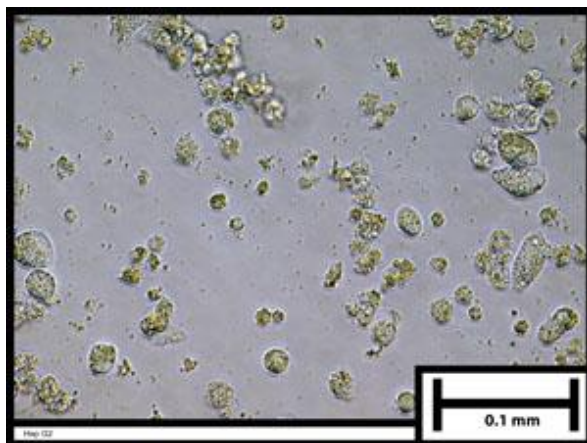


E

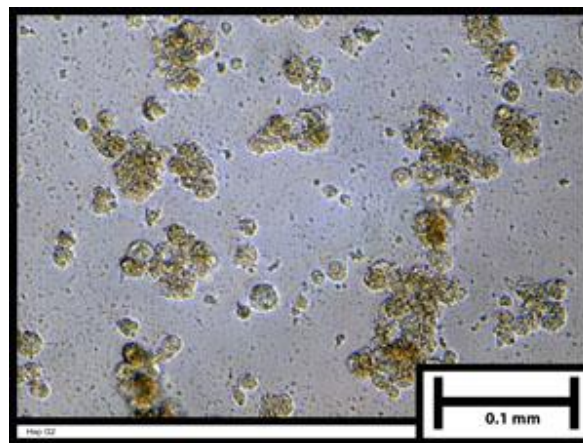


PŘÍLOHA VI: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů ze slupek Muškátu moravského.: A-25 $\mu\text{g/ml}$, B-50 $\mu\text{g/ml}$, C-kontrola, D-75 $\mu\text{g/ml}$, E-100 $\mu\text{g/ml}$.

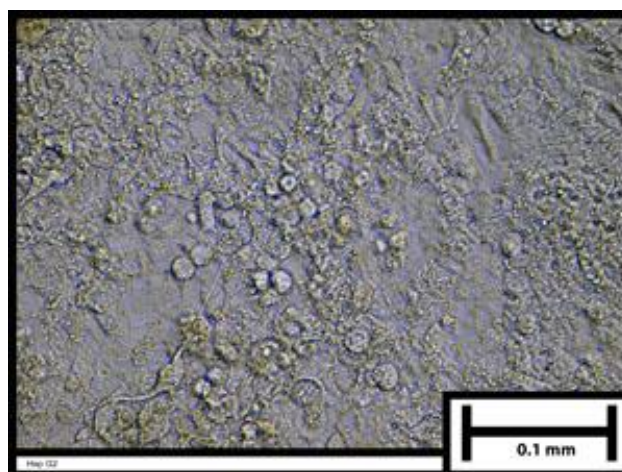
A



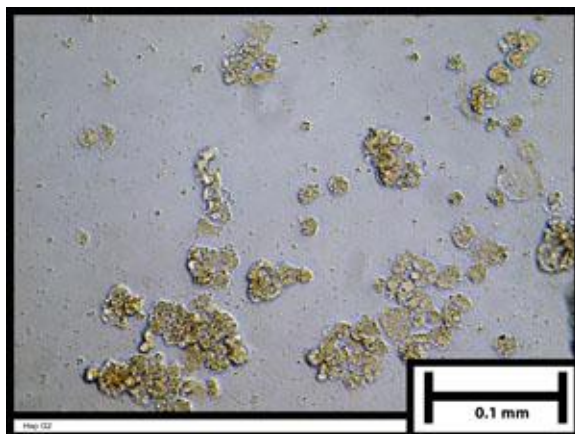
B



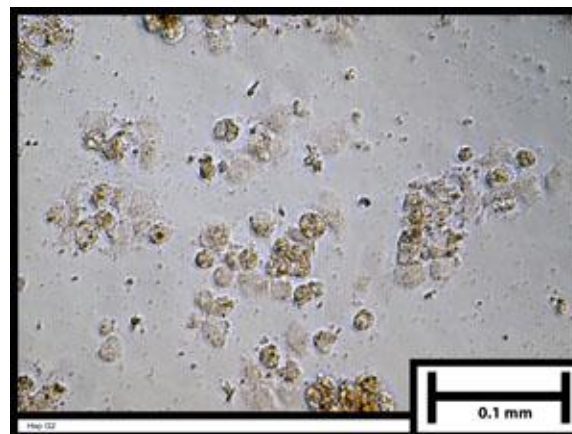
C



D

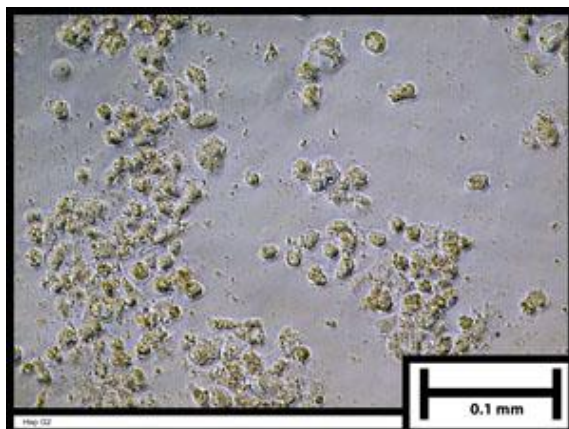


E

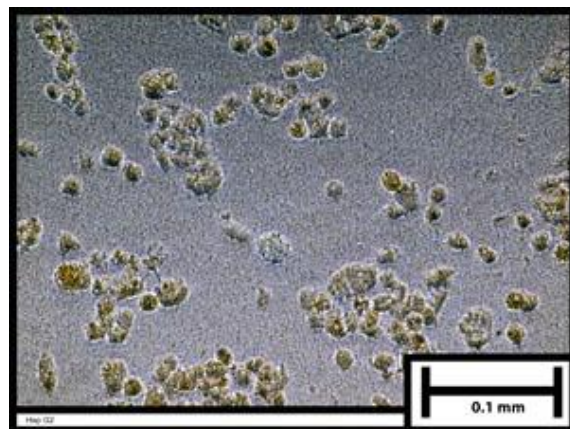


PŘÍLOHA VII: Fotografie buněk HepG2 kultivovaných za přítomnosti extraktů z bobulí Muškátu moravského.: A-25 $\mu\text{g/ml}$, B-50 $\mu\text{g/ml}$, C-kontrola, D-75 $\mu\text{g/ml}$, E-100 $\mu\text{g/ml}$.

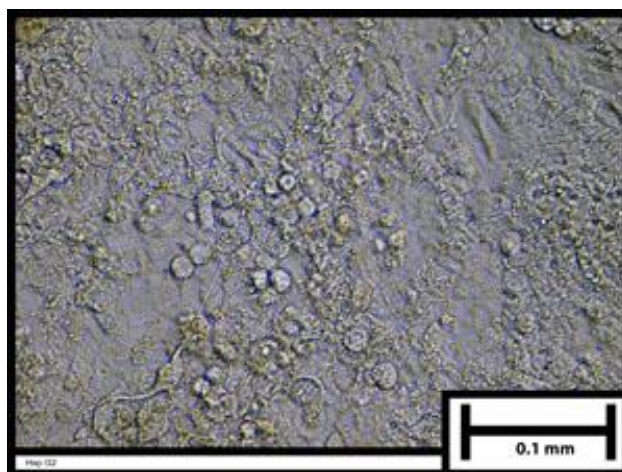
A



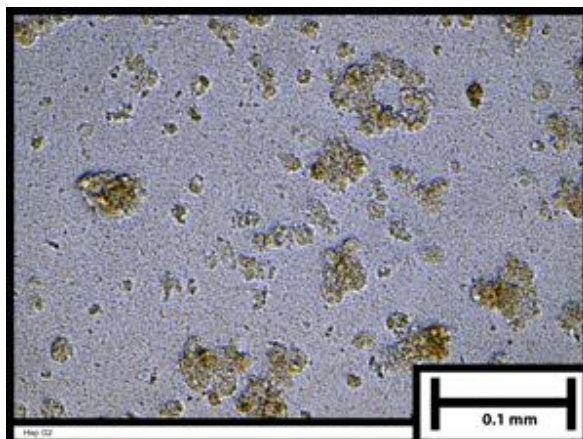
B



C



D



E

