

Vliv polyfenolů obsažených v jedlých květech na eukaryotické buňky

Bc. Lucie Neoralová

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie NEORALOVÁ**
Osobní číslo: **T10418**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vliv polyfenolů obsažených v jedlých květech na eukaryotické buňky.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Seznámit se s problematikou kultivace buněčných kultur, molekulární a buněčnou biologií v návaznosti na in vitro testování účinných látek.
2. Vypracovat popis polyfenolů obsažených v jedlých květech a jejich vlivu na lidský organismus.

II. Praktická část

1. Provést základní in vitro testy vlivu polyfenolů obsažených v jedlých květech na eukaryotické buňky.

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

Seznam odborné literatury:

- [1] SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J., DOŠKAŘ, J., FAJKUS, J., HOŘÍN, P., KNOLL, A., KUGLÍK, P., ŠMARD, J., ŠMARDOVÁ, J., VESELSKÁ, R., VYSKOT, B., RELICHOVÁ, J. Genetika. Brno, Nakladatelství Masarykovy univerzity, 2009.
- [2] ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science. ISBN: 0 ? 8153 ? 4105 ? 9.
- [3] ROSYTAL, S. Nový přehled biologie. Praha: Scientia, 2003.
- [4] Scientific databases (Web of Science, Science Direct, EnvironetBase).

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**
Centrum polymerních materiálů
Datum zadání diplomové práce: **1. února 2012**
Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/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, považuji 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 2. 5. 2012

Neoralová.....

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 nevydělečně 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 výtěžku 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 výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Polyfenoly mají mnoho chemických, biochemických, či biologických vlastností. Mohou posobit protizánětlivě, antikarcinogenně, či antioxidantně. Tato diplomová práce se zabývá sledováním vlivu polyfenolů získaných z jedlých květů na proliferační aktivitu eukaryotických buněk. U hodnocení antiproliferačního efektu *in vitro* bylo použito pět různých koncentrací roztoků polyfenolů (50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml a 1 µg/ml). Studováno bylo šest jedlých květů (*S. nigra*, *A. schoenoprasum*, *R. acetosa*, *T. repens*, *S. pratensis* a *V. arvensis*) a tři typy buněčných linií: lidské keratinocyty (HaCaT), hepatocyty (HepG2) a myší embryonální fibroblasty (NIH/3T3). K určení antiproliferačního efektu byla použita spektrofotometrická metoda MTT.

Klíčová slova: polyfenolické látky, jedlé květy, buněčné linie a proliferace

ABSTRACT

Polyphenols have a variety of chemical, biochemical and biological properties. They can act anti-inflammatory, anti-carcinogenic or as antioxidants. This thesis deals with the determination of the proliferative effect of polyphenols obtained from edible flowers on eukaryotic cells. Five different concentrations of polyphenols solutions (50 mg/ml, 25 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml and 1 mg/ml) to evaluate the antiproliferative effect *in vitro* were used. Six edible flowers (*S. nigra*, *A. schoenoprasum*, *R. acetosa*, *T. repens*, *P. pratensis* and *V. arvensis*) and three types of cell lines: human keratinocytes (HaCaT), hepatocytes (HepG2) and mouse embryonic fibroblasts (NIH/3T3) were studied in this work. To determine the antiproliferative effect the spectrophotometric method MTT was used.

Keywords: polyphenolic substances, edible flowers, cell lines and the proliferation

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Petrovi Humpolíčkovi Ph.D., za ochotu a poskytnutí odborných znalostí a rad při zpracování této práce a také za velkou dávku trpělivosti při konzultacích. Chci také poděkovat univerzitě, za poskytnutý materiál k práci a za asistenci v laboratořích.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 POLYFENOLY	12
1.1 CHARAKTERISTIKA.....	12
1.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ OBSAH POLYFENOLŮ V POTRAVINÁCH	13
1.2.1 Obsah v surovinách.....	13
1.2.2 Obsah v potravině	13
1.3 DĚLENÍ POLYFENOLŮ	14
1.3.1 Jednoduché fenoly.....	15
1.3.2 Fenolové kyseliny a jejich deriváty.....	15
1.3.3 Stilbeny	16
1.3.4 Flavonoidy.....	16
1.3.4.1 Flavony	18
1.3.4.2 Flavonoly	19
1.3.4.3 Anthokyany.....	19
1.3.4.4 Flavanony.....	20
1.3.5 Lignany	20
1.3.6 Ostatní polyfenoly.....	20
1.4 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA POLYFENOLŮ.....	20
2 OBSAH POLYFENOLŮ V POTRAVINÁCH.....	22
3 VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÝ ORGANISMUS.....	24
3.1 KVERCETIN	24
3.2 KATECHINY	25
3.3 PROANTOKYANIDY	25
3.4 ISOFLAVONOIDY	26
3.5 ANTOKYANIDINY	27
3.6 STILBENY	27
4 JEDLÉ KVĚTY	29
4.1 BEZ ČERNÝ	29
4.2 PAŽITKA POBŘEŽNÍ.....	29
4.3 ŠŤOVÍK KYSELÝ.....	30
4.4 JETEL PLAZIVÝ	30
4.5 ŠALVĚJ LUČNÍ.....	31
4.6 FIALKA ROLNÍ	31
5 BUNĚČNÉ KULTURY	33
5.1 BUNĚČNÝ CYKLUS.....	33
5.1.1 Fáze buněčného cyklu	33
5.1.2 Regulace buněčného cyklu.....	35
5.2 BUNĚČNÁ SMRT.....	37
5.2.1 Nekróza	37
5.2.2 Apoptóza	38

5.3	BUNĚČNÁ PROLIFERACE A ŽIVOTASCHOPNOST	39
5.4	BUNĚČNÉ LINIE	39
5.4.1	Primokultury	40
5.4.2	Adhezní kultury	40
5.4.3	Orgánové kultury	40
5.4.4	Subkultury	41
6	KULTIVAČNÍ PODMÍNKY	42
6.1	TEPLOTA	42
6.2	pH A ATMOSFÉRA CO ₂	42
6.3	KYSLÍK	43
6.4	OSMOLALITA	44
6.5	VISKOZITA	44
6.6	MÉDIA A SÉRA	44
6.6.1	Média	44
6.6.2	Séra	45
6.7	ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	46
6.8	PRÁCE S KULTURAMI	46
6.8.1	Izolace buněčného kmene	47
6.8.2	Zchlazování a zamrazování buněk	47
6.8.3	Rozmrazování buněk	48
6.8.4	Přeprava buněk	48
6.8.5	Monitorování infekce	48
II	PRAKTICKÁ ČÁST	50
7	METODIKA	51
7.1	JEDLÉ KVĚTY	51
7.2	POUŽITÉ VYBAVENÍ	51
7.3	EXTRAKCE POLYFENOLŮ	51
7.4	KULTIVACE BUNĚK	52
7.5	STANOVENÍ POLYFENOLŮ	52
7.5.1	Test anti - proliferačního účinku	52
8	VÝSLEDKY	54
8.1	VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÉ KERATINOCYTY	54
8.2	VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÉ HEPATOCYTY	64
8.3	VLIV POLYFENOLŮ NA MYŠÍ FIBROBLASTY	75
9	DISKUSE	87
	ZÁVĚR	91
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	92
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	108
	SEZNAM OBRÁZKŮ	109
	SEZNAM TABULEK	110
	SEZNAM GRAFŮ	111

ÚVOD

Polyfenolické látky jsou hojně zastoupeny v rostlinných surovinách, což značně ovlivňuje nejen výživu lidí a zvířat, ale také mají značný vliv na jejich organismus. Velký zájem je jim věnován zejména z toho důvodu, že čím dál více studií potvrzuje jejich pozitivní vliv v prevenci rakoviny a mrtvice. Jedlé květy, které jsou předmětem této práce, obsahují velkou škálu polyfenolů. Jejich obsah se velmi liší nejen odrůdou, ale i mezi kultivary stejného druhu. Výskyt polyfenolů v květech je do značné míry ovlivněn genetickými faktory a prostředím. Podílejí se také další faktory, jako je stupeň zralosti, klíčení, odrůda, zpracování, skladování a další. Polyfenoly mohou mít mnoho funkcí v organismu, také mohou působit jako antioxidanty, dále mají antimikrobiální účinek, ale také modulují činnost celé řady enzymů a buněčných receptorů.

Cílem této práce bylo sledovat vliv polyfenolů obsažených v jedlých květech na proliferaci eukaryotických buněk pomocí *in vitro* testů na buněčných liniích. V teoretické části je zaměřeno na polyfenoly, jejich dělení, obsah v potravinách a vliv na lidský organismus. Další část je věnována nejen charakteristice jednotlivých květů a kultivačním podmínkám, ale také buněčným kulturám a práci s nimi. V praktické části je práce zaměřena na vliv polyfenolů obsažených v jedlých květech na tři typy buněčných linií.

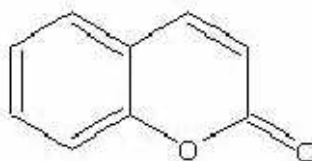
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYFENOLY

1.1 Charakteristika

Polyfenoly jsou jedna z nejpočetnějších a nejvíce zastoupených skupin rostlinných metabolitů, díky čemuž jsou součástí prakticky veškeré potravy lidí i zvířat [BRAVO, 1998]. Polyfenolům je věnován stále větší zájem a to jak ze strany spotřebitele, tak i ze strany výrobců potravin. Jedním z důvodů je fakt, že epidemiologické studie naznačují spojitost mezi konzumací potravin a nápojů bohatých na polyfenoly a prevencí rakoviny [STEINMETZ a POTTER, 1996] a mrtvice [NESS a POWLES, 1997]. Např. spotřeba vína může zabránit srdečním chorobám [CRIQUI a RINGEL, 1994; RENAUD a De LORGERIL, 1992]. Kromě toho se polyfenoly, které tvoří aktivní látky, nacházejí v mnoha léčivých rostlinách a modulují činnost celé řady enzymů a buněčných receptorů [MIDDLETON *et al.*, 2000]. Jedna z teorií vysvětlující jejich zdravotní vliv je založena na tom, že polyfenoly jsou považovány za antioxidanty, díky čemuž mohou zabránit různým nemocem spojených s oxidačním stresem, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, záněty a další [SCALBART *et al.*, 2005]. Chemicky se jedná o jednoduché fenoly, vznikající jako degradační produkty fenolových kyselin, produkty jejich redukce (aldehydy, alkoholy) a další deriváty hydroxyfenolových kyselin, např. kumarin (obr. 1.) [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009]. Ve své struktuře mají benzenové jádro substituované alespoň jednou hydroxylovou skupinou [HERTOG *et al.*, 1998].

Obrázek 1: Strukturální vzorec kumarinu [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].



Hlavními zdroji polyfenolů v potravině jsou ovoce a nápoje (ovocné šťávy, vína, čaje, kávy, čokolády a piva) a v menší míře zelenina, suché luštěniny a obiloviny. Průměrný celkový příjem je cca 1 g/den [SCALBERT a WILLIAMSON, 2000]. Některé polyfenoly, jako kvercetin se nachází ve všech rostlinných produktech (ovoce, zeleniny, obilovin, luštěnin, ovocné šťávy, čaje, vína, atd.), zatímco jiné jsou specifické pro určité potraviny (flavanony u citrusových plodů, isoflavonoidy v sóji aj.) [MANACH *et al.*, 2004]. Fenoly se uplatňují v potravinách také jako chuťové látky (jednoduché fenoly, jako jsou např. kon-

denzované třísloviny zvané flavolany, které jsou nositeli trpké chuti), přírodní barviva (některé chinony, lignany, flavonoidy a jim příbuzné stilbeny, xantiny aj.) nebo jako vonné látky. [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

1.2 Faktory ovlivňující obsah polyfenolů v potravinách

1.2.1 Obsah v surovinách

Na obsah polyfenolů v potravinářských surovinách mají zásadní vliv faktory životního prostředí. Tyto faktory mohou být klimatické (typ půdy, slunečního záření, srážky) a agronomické (kultura ve sklenících nebo zemědělské oblasti, biologické kultury, hydroponická kultura, výnosnost ovoce na stromě, atd.). Vystavení slunečnímu záření má značný vliv na většinu flavonoidů. Stupeň zralosti výrazně ovlivňuje koncentraci a poměr jednotlivých polyfenolů [MACHEIX *et al.*, 1990]. Obecně platí, že koncentrace fenolických kyselin v průběhu zrání poklesne, zatímco koncentrace anthokyaninů se zvyšují. Mnoho polyfenolů, zejména fenolové kyseliny, se přímo podílejí na reakci rostlin na různé typy stresu [PARR a BOLWEL, 2000; MACHEIX *et al.*, 1990]. I když je jen velmi málo studií, které by se přímo touto otázkou zabývaly, některé naznačují, že obsah polyfenolů v zelenině z ekologického a udržitelného zemědělství je vyšší než u zeleniny pěstované bez stresu, jako jsou pěstované v hydroponických nebo konvenčních podmínkách. To se ukázalo např. u jahod, ostružin a kukuřice [ASAMI *et al.*, 2003].

1.2.2 Obsah v potravině

Další z faktorů ovlivňujících obsah polyfenolů v potravinách je skladování. Oxidační reakce mohou vést k vytvoření více či méně polymerních látek, které vedou ke změnám v kvalitě potravin, zejména v barvě a organoleptických vlastnostech [SOSULSKI *et al.*, 1982]. Metody kulinářské přípravy mají také výrazný vliv na obsah polyfenolů v potravinách. Například, jednoduchým loupáním se z ovoce a zeleniny odstraní podstatná část polyfenolů, protože tyto látky jsou často přítomny ve vyšších koncentracích ve vnějších částech, než ve vnitřní části. Brambory obsahují až 190 mg chlorogenové kyseliny/kg, a to především ve slupce [FRIEDMAN, 1997]. Vaření může mít zásadní vliv. Cibule a rajčata ztrácí 75% až 80% svého původního obsahu kvercetinu a to již po varu po dobu 15 minut, 65% po vaření v mikrovlnné troubě, a 30% po smažení [CROZIER *et al.*, 1997]. Parní vaření zeleniny, který se vyhýbá loužení, je vhodnější.

1.3 Dělení polyfenolů

V tabulce 1 je znázorněno základní dělení polyfenolů.

Tabulka 1: Rozdělení polyfenolů [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009]

Počet uhlíků	Základní skelet	Skupina fenolových sloučenin
6	C ₆	Jednoduché fenoly, bentochinony
7	C ₆ -C ₁	Fenolické (benzoové) kyseliny
9	C ₆ -C ₃	Skořicové kyseliny, fenylypropanoidy, kumariny, chromony
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbeny, antrachinony, diarylethanoidy
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidy, isoflavonoidy
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignany, neolignany
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidy
n	(C ₆ -C ₃) _n	Lignin
n	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Flavolany

Jako složky silic jsou významné dva monoterpeny, z jednoduchých alkylfenolů odvozené od fenolu s podobnou vůní, karvakrol (5-isopropyl-2-methylfenol) a thymol (2-isopropyl-5-methylfenol). Vyskytují se např. v tymiánové silici. Chavicol neboli 4-prop-2-en-1-ylfenol (*p*-allylfenol) je složkou silice bazalky. Mnoho dalších fenolů je odvozeno od guajakolu. Isoeugenol, resp. jeho (*E*)-isomer (*IE*)-2-methoxy-4-(prop-1-en-1-yl)fenol se také vyskytuje v silici bazalkové, klíčovou aromatickou složkou v hřebíčkové silici je eugenol čili 2-methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)fenol a jako hlavní složky silice nového koření (pimentu) jsou eugenol a chavicol (spolu s myrcenem). V másle a v kysané smetaně byl také např. prokázán fenol (v másle v množství 9-16 μg.kg⁻¹). Dalé v menší koncentraci se vyskytuje i *m*-kresol (3-methylfenol), *p*-kresol (4-methylfenol) a guajakol. Značně proměnlivý je obsah fenolů v alkoholických nápojích. Koncentrace těchto fenolů bývají relativně nízké (zpravidla se pohybují v mezích 0,1-0,3 mg.dm⁻³). Nositelem netypických pachutí bývají fenoly jen výjimečně. Vyšší obsahy fenolů jsou v různých pivech (např. v pivech vyráběných ze sladu sušeného spalínami) a také ve vínech typu sherry a v lihovinách, které zrají v dubových sudech. Mezi hlavní fenoly whisky se řadí např. eugenol, vanillin, guajakol, ale přítomen je také fenol, kresoly a další sloučeniny [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

1.3.1 Jednoduché fenoly

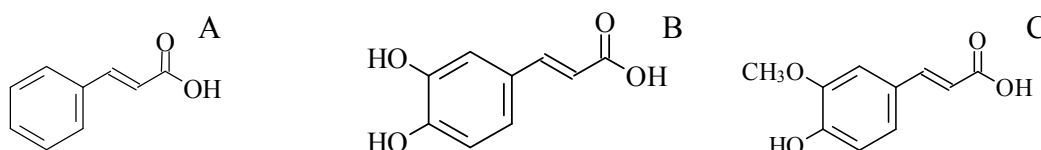
Tyto látky ve své struktuře obsahují cyklické C₆ řetězce a základní skelet molekuly je často substituován methylovými skupinami [SUJAK *et al.*, 2006]. Jednoduché fenoly, které jsou všude přítomné mezi rostlinami, patří do kategorie látek, které ovlivňují poškození DNA, mutace a chromozomální aberace. Na základě *in vivo* a *in vitro* testů je známo, že mohou potlačit genotoxické aktivity mnoha karcinogenních látek. Některé fenoly mají také antioxidační a antimikrobiální účinek [STICH, 1991]. Nejčastěji se vyskytují mono- a difenoly, menší část tvoří trifenoly. Tyto látky jsou ve většině případů ve formě glykosidů, nebo methyletherů [PARR a BOLWEL, 2000].

1.3.2 Fenolové kyseliny a jejich deriváty

Fenolové kyseliny se strukturou C₆-C₁ (benzoová kyselina a její deriváty) a se strukturou C₆-C₃ (skořicová kyselina a její deriváty) jsou běžnou součástí rostlinných materiálů [LUŠTINEC a TÁRSKÝ, 2003]. Tyto kyseliny se nacházejí jak ve volné, tak i v esterifikované formě [KING a YOUNG, 1999]. Některé kyseliny, např. 2-hydroxybenzoová (salicylová), 4-hydroxybenzoová aj., jsou také složky kouře používané k uzení potravin [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

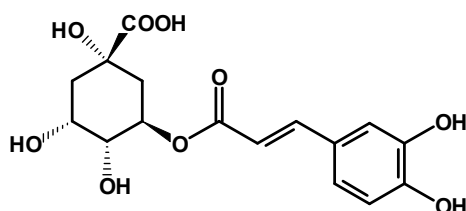
Fenolové kyseliny vykazují účinky primárních antioxidantů a jejich aktivita závisí na počtu hydroxylových skupin v molekule. V naší stravě jsou fenolické kyseliny zastoupeny především skořicovou kyselinou zobrazenou na obr. 2.-A. (a to převážně ve formě esterů), která jde zmýdelnit při pokojové teplotě s následným alkalickým ošetřením při teplotě 170°C [IIYAMA *et al.*, 1990]. Nejčastější je kyselina kávová (obr. 2.-B.) a její estery, a v menší míře kyselina ferulová (obr.2.-C.). Jedním z hlavních zdrojů ferulové kyseliny jsou pšeničné otruby (5 mg/g) [KROON *et al.*, 1997].

Obrázek 2: Strukturální vzorec: A. Kyselina skořicová, B. Kyselina kávová, C. Kyselina ferulová [TÁBORSKÁ, 2003].



Nejběžnějším esterem kávové kyseliny je kyselina chlorogenová (5-caffeoylchinová kyselina), která je přítomná v řadě druhů zeleniny a ovoce, a také v kávě. Šálek instantní kávy obsahuje 50-150 mg kyseliny chlorogenové [CLIFFORD, 1999]. Tato kyselina je znázorněna na obrázku 3.

Obrázek 3: Kyselina chlorogenová [TÁBORSKÁ, 2003].



1.3.3 Stilbeny

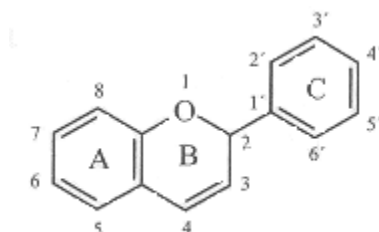
Stilbeny nejsou v potravinách příliš rozšířeny. Nicméně v posledních letech je velká pozornost věnována resveratrolu (3,5,4-trihydroxystilben) a to díky jeho antikarcinogenním vlastnostem [JANG *et al.*, 1997] a přítomnosti ve víně (0,3-2 mg/l) [FRANKEL *et al.*, 1995]. Zároveň je účinným antioxidantem díky čemuž má celou řadu pozitivních účinků, např. zneškodňuje aktivní formy kyslíku.

1.3.4 Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou nejhojnější polyfenoly v naší stravě [SCALBERT *et al.*, 2005], i díky tomu, že se vyskytují přirozeně v rostlinných potravinách [ERDMAN *et al.*, 2005]. Flavonoidy mají v molekule dva benzenové kruhy (kruh A a C) spojené uhlíkovým řetězcem [MANACH *et al.*, 2004]. Množství všech flavonoidních látek se dnes odhaduje na 5000, ale i nadále se v různých rostlinných zdrojích nacházejí nové sloučeniny [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009]. Přesné údaje o příjmu flavonoidů nejsou k dispozici, avšak dle odhadů je v rozmezí několika desítek až stovek gramů za den (od 23 mg/den až 1000 mg/den), a to v závislosti na stravovacích zvyklostech [HERTOG *et al.*, 1993]. Jsou přítomné ve významném množství v mnoha běžně konzumovaných plodech, jako jsou zelenina, obiloviny, byliny a nápoje. Tyto látky vykazují strukturálně různorodý sortiment biologické aktivity, která může vysvětlit jejich potenciální kardioprotektivní vlastnosti, včetně antioxidantních a protizánětlivých účinků a indukci apoptózy [ERDMAN *et al.*, 2005]. Příprava jídla a zpracování čerstvého ovoce a zeleniny může snížit obsah flavonoidů o 50% v důsledku vyluhování do vody, či odstranění částí rostlin, které jsou na ně bohaté [PETERSON a DWYER, 1998]. Epidemiologické důkazy o kardiovaskulárních účincích

stravy bohaté na flavonoidy, jsou smíšené. Některé studie podporují [HERGOT *et al.*, 1995; KNEKT *et al.*, 2002, YOCHUM *et al.*, 1999] a některé nepodporují [SESSO *et al.*, 2003; RIMM *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 2007] jejich pozitivní účinky.

Obrázek 4: Strukturální vzorec flavanu [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

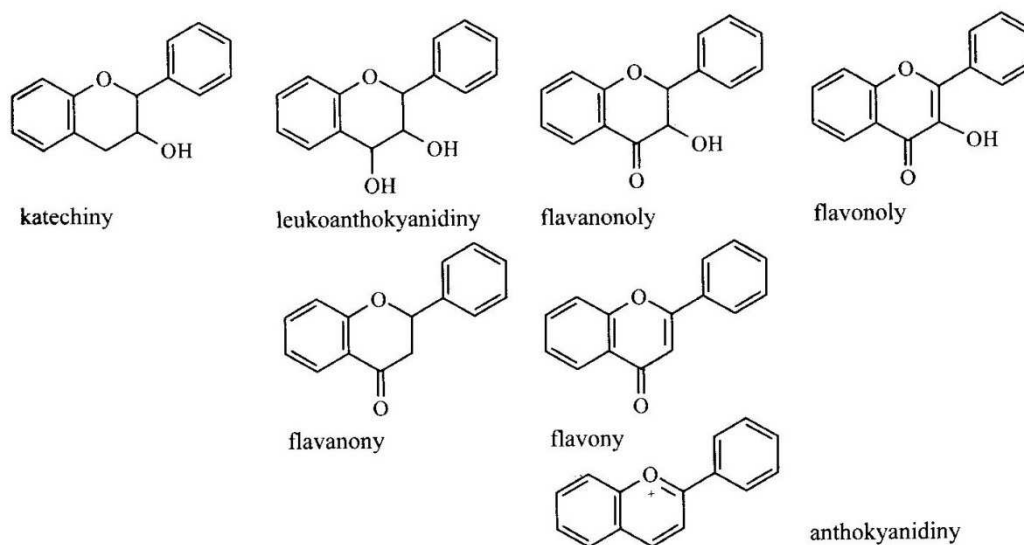


Podle stupně oxidace C3 řetězce a jeho substituce lze flavonoidy rozdělit do několika tříd:

- Flavony
- Flavonoly
- Isoflavony
- Anthokyaniny
- Flavanoly
- Flavanony
- Proanthokyanidiny [SCALBERT *et al.*, 2005]

Základní struktura těchto flavonoidních látek je znázorněna na obrázku 5. Největší oxidační stupeň z těchto flavonoidních látek mají: flavonoly > flavanonoly, flavony, anthokyanidiny > leukoanthokyanidiny, flavanony > katechiny. Zároveň tak stoupá i intenzita jejich barvy. Anthokyanidiny obsahují systém konjugovaných dvojných vazeb (jsou to flavyliové nebo 2-fenylbenzopyryliové nebo 2-fenylchromenyliové kationty) [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

Obrázek 5: Obecná struktura hlavních flavonoidních látek [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

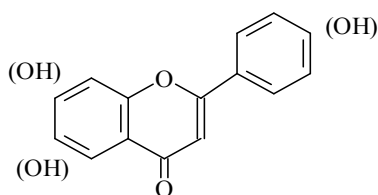


Výskyt některých z těchto flavonoidů je omezeno na několik málo potravin [REINLI a BLOCK, 1996].

1.3.4.1 Flavony

Flavony (obr. 6.) jsou spolu s flavonoly nejrozšířenějšími žlutými pigmenty rostlin skupiny flavonoidů vyskytující se volně nebo jako estery [HESS, 1983]. Běžnými sloučeninami v potravinách jsou flavony substituované na C-5 a C-7, méně často v poloze C-6 kruhu A a v poloze C-4' kruhu B. Pokud se substituent nachází v poloze C-4', bývají často substituovány také uhlíky C-3' a C-5', vzácně také uhlík C-2'. Běžným substituentem je methoxylová a hydroxylová skupina. Častými flavony jsou především apigenin v petrželi kadeřavé a luteolin v přesličce. Méně často se vyskytuje tricetin a další flavony [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009]. Flavony byly také identifikovány v sladké paprice (luteolin) a celeru (apigenin) [HERTOG *et al.*, 1992].

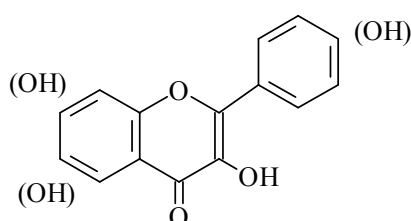
Obrázek 6: Strukturní vzorec flavonu



1.3.4.2 Flavonoly

Flavonoly jsou sloučeniny vyskytující se v potravinách v poloze C-3, C-5, C-7, C-4' hydroxyskupinu a liší se vzájemně substitucí v poloze C-3' a C-5' [HARBORNE, 1988; MACHEIX *et al.*, 1990]. Téměř univerzálními flavonoly jsou kemferol, kvercetin (obr. 7.) a myricetin, což jsou bledě žluté a málo rozpustné látky obsažené převážně v květech a listech rostlin [KÜHNAU, 1976].

Obrázek 7: Strukturální vzorec kvercenu [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

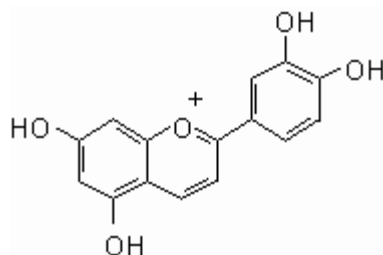


V bobulích bezu černého (*Sambucus nigra*) se nachází kvercetin-3-rutinosid, který chybí např. v jahodách [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009]. Jiné druhy flavonolů jsou společné pro různé potraviny. Kvercetin, hlavní flavonol v naší stravě, je přítomen převážně v zelenině, ovoci, ale i v nápojích. Nejvíce bohatá na kvercetin je cibule (0,3 mg/1g čerstvé váhy) a čaj (10-25 mg/1l) [HERTOG *et al.*, 1992].

1.3.4.3 Anthokyany

Anthokyany, také nazývány anthokyaniny, jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných barviv, méně stabilních. Dosud jich v přírodních zdrojích bylo identifikováno asi 300 [KYZLINK, 1968].

Obrázek 8: Strukturální vzorec kyanidinu [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

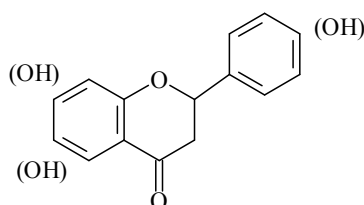


Mnoho druhů ovoce, zeleniny, květin a dalších rostlinných materiálů se vyznačuje svojí atraktivní oranžovou, červenou, fialovou a modrou barvou, kterou lze nalézt na plodech i listech. Jako hlavní zástupce je např. kyanidin (obr. 8.) [RODRÍGUEZ, 2009].

1.3.4.4 Flavanony

V potravinách jsou bezbarvé až světle žluté flavanony rozšířeny poměrně málo a jako barviva nemají téměř žádný význam. Hlavními složkami jsou zde glykosidy odvozené od 5,7-dihydroxyflavanonů [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009] a to naringenin v grapefruitu, hesperetin v pomeranči, a v citrónu eriodictyol. Flavanony (obr. 9.) jsou obecně glykosylované o disacharid na pozici 7: buď neohesperidose, který předá hořkou chuť, nebo rutinose, který je bez příchuti. Flavanony se obecně nacházejí v rajčatech a aromatických rostlinách, jako je máta, ale to jen v malé míře [TOMAS-BARBERAN a CLIFFORD, 2000]. Hlavním zdrojem jsou citrusové plody. Nejvíce je konzumován hesperidin z pomerančů (125 až 250 mg/1l šťávy) [ROUSSEFF *et al.*, 1987].

Obrázek 9: Strukturální vzorec flavanonu [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].



1.3.5 Lignany

Potraviny, ve kterých by byly prokázány lignany je prozatím málo, avšak řadí se tam lněné semínko a lněný olej [AXELSON *et al.*, 1982]. Lignany jsou uznávány jako fytoestrogeny díky jejich estrogenním účinkům a antagonistickým vlastnostem [SCALBERT *et al.*, 2005]. Lignany byly identifikovány v lidské plazmě a moči [ADLERCREUTZ a MAZUR, 1997].

1.3.6 Ostatní polyfenoly

Ostatní polyfenoly nejsou přesně chemicky definovány a jsou výsledkem oxidační polymerizace flavonoidů a fenolových kyselin. K tomu může dojít v průběhu zrání a zpracování potravin (mletí, vaření, kvašení a jiné procesy). Tyto fenolické sloučeniny jsou hlavní polyfenoly v černém čaji a víně [SANTOS-BUELGA a SCALBERT, 2000].

1.4 Antioxidační aktivita polyfenolů

Polyfenoly jsou nejdůležitější skupinou chemických sloučenin, které mají antioxidační účinky. Mohou tvořit až 65% všech antioxidantů přítomných v rostlinách. Dále tvoří mno-

ho podvojných skupin chemických sloučenin, které vznikají metylací, esterifikací nebo polymerací. Mezi nejvýznamnější zdroje polyfenolických sloučenin patří zelený a černý čaj, lesní ovoce a další [MANACH *et al.*, 2004].

Pro stanovení antioxidační aktivity existuje řada analytických metod. V oblasti chemických analýz a biologického hodnocení antioxidačních charakteristik byly v posledních letech vypracovány četné metody umožňující stanovení antioxidační aktivity, které jsou ovšem principiálně odlišné [ROY *et al.*, 2010; SOCHOR, 2010].

2 OBSAH POLYFENOLŮ V POTRAVINÁCH

Fenolické látky jsou téměř všudypřítomné v rostlinné stravě, jako je zelenina, ovoce, luštěniny, obiloviny, ořechy a v nápojích jako je víno, pivo, čaj, kakao a jablečný mošt [SINGLETON, 1981]. Jejich obsah se velmi liší i mezi kultivary stejného druhu. Například vznik flavonu a flavonolů glykosidy výrazně závisí na světle, a proto se nejvyšší koncentrace těchto sloučeniny nacházejí většinou v listech a na vnější části rostlin, pouze stopové množství v podzemní části rostliny [HERMANN, 1988]. Přítomnost polyfenolů v rostlinných potravinách, je do značné míry ovlivněna genetickými faktory a prostředím. Ovlivňují to také jiné faktory, jako je klíčení, stupeň zralosti, odrůda, zpracování, skladování a další [POTTER, 1989; PELEG *et al.*, 1991].

V tabulce 2 je uveden obsah polyfenolů různých tříd v některých, běžně konzumovaných, potravinách a nápojích. Hodnoty jsou pouze orientační, jelikož se liší typem potravy a hmotností [HAMMERSTONE *et al.*, 2000].

Tabulka 2: Obsah polyfenolů v potravinách a nápojích (mg)
[HAMMERSTONE *et al.*, 2000]

Potravina (množství)	Fenolové kyseliny	Flavonoly
Brambora (200g)	28	
Rajče (100g)	8	0,5
Hlávkový salát (100g)	8	1
Cibule (20g)		7
Jablko (200g)	11	7
Třešeň (50g)	37	1
Pšeničné otruby (10g)	50	
Červené víno (125ml)	12	2
Káva (200ml)	150	
Černý čaj (200ml)		8

Polyfenoly jsou rovnoměrně rozloženy v rostlinných tkáních a během zpracování může dojít ke ztrátě nebo obohacení některých fenolických sloučenin. Např. ve slupce jablka se nachází kvercetin (1 mg/g čerstvého ovoce), avšak loupané ovoce většinou neobsahuje žádné flavonoly [BURDA *et al.*, 1990]. Polyfenoly v zrně pšenice, obsažené hlavně ve vnějších vrstvách (osemení), jsou ztraceny během rafinace mouky [SHAHIDI a NACZK,

1995]. Naopak je tomu při lisování šťávy z jablek, kdy zůstávají fenolické sloučeniny v jádrech [SPANOS a WROLSTAD, 1992].

Plody ovoce jsou většinou bohatším zdrojem polyfenolů než zelenina [MACHEIX *et al.*, 1990]. Spotřeba cereálních výrobků přispívá k příjmu fenolových kyselin pouze v tom případě, kdy jsou při výrobě použita celá zrna. Dalším velmi bohatým zdrojem polyfenolů je čokoláda a to především katechinu [ARTS *et al.*, 1999].

Významným zdrojem polyfenolů jsou také nápoje (káva, čaj, ovocné šťávy a červené víno). Např. pomerančový džus není tak bohatý na polyfenoly, jelikož vitamin C (50 mg/100ml) tvoří až 40% z odhadovaného celkového množství fenolů, přičemž zbývající část připadá na flavanony [SOUCI *et al.*, 1986]. Celkový obsah fenolů v pivě byl naměřen na 500-1000 mg/l [LEUPOLD a DRAWERT, 1981], ale část z toho může pocházet z produktů Maillardovy reakce [MAILLARD a BERSET, 1995]. Fenolické kyseliny tvoří přibližně jednu třetinu celkových fenolů a flavonoidy tvoří dvě třetiny. Tento podíl značně závisí na spotřebě kávy. Lidé, kteří konzumují kávu více, pravděpodobně konzumují více fenolických kyselin než flavonoidů [CLIFFORD, 1999].

Příjem polyfenolů také závisí do značné míry na stravovacích návycích a preferencích. Dále to závisí na konzumaci nejen celkových polyfenolů, ale i různých druhů těchto polyfenolů [HERTOG *et al.*, 1993]. Příjem flavonolů, flavonů a isoflavonů je relativně nízký ve srovnání s fenolickými kyselinami a dalšími flavonoidy. Spotřeba látek, jako jsou kvercetin a genistein nepřesahuje 2 až 4% z celkového příjmu polyfenolů [SCALBERT *et al.*, 2005].

3 VLIV POLYFENOLŮ NA LIDSKÝ ORGANISMUS

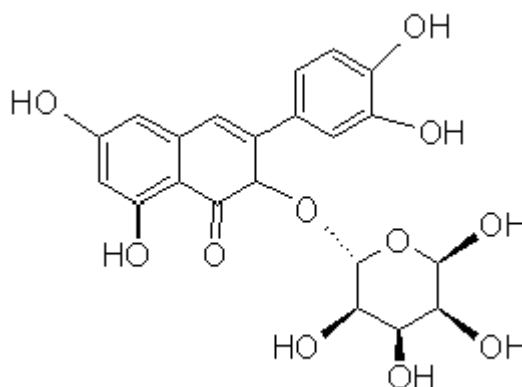
Biologické vlastnosti polyfenolů závisí na jejich biologické dostupnosti. Nepřímými důkazy o jejich vstřebávání v trávicím traktu, je zvýšení antioxidační kapacity plazmy po požití potravin bohatých na polyfenoly [SERAFINI *et al.*, 1996]. Více přímých důkazů o biologické dostupnosti fenolických látek byly získány na základě měření jejich koncentrace v plazmě a moči po požití buď čistých látek, nebo potravin se známým obsahem polyfenolů [SCALBERT *et al.*, 2005].

Chemická struktura polyfenolů určuje rychlost a rozsah střevní absorpce a povahu metabolitů cirkulující v plazmě [FUHR a KUMMERT, 1995]. Hlavní část požitých polyfenolů (75 až 99%) nebylo nalezeno v moči. To znamená, že buď nebyly vstřebány přes střevní bariéru, nebo byly vstřebány a následně vyloučeny žlučí, nebo metabolizovány střevní mikroflórou, případně lidskými tkáněmi [HOLLMAN *et al.*, 1995].

3.1 Kvercetin

Dominantní flavonol ve výživě člověka je kvercetin (obr. 10.). Jedná se antioxidant, který brání oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou [HOLLMAN *et al.*, 1995]. Nachází se ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule (300 mg/kg čerstvé váhy), kapusta (100 mg/kg), jablka (21-72 mg/kg) a zelený a černý čaj (10-25 mg/l). Ve většině z těchto zdrojů se nachází ve volné formě, ale také je vázán s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4'-O-glukosid [WILLIAMSON MANACH, 2005]. Polovina kvercetinu obsažených v cibuli bylo absorbováno v tenkém střevě [HOLLMAN *et al.*, 1995].

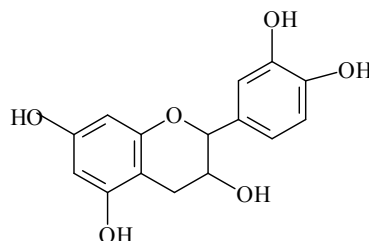
Obrázek 10: Strukturní vzorec kvercetinu [TÁBORSKÁ, 2003].



3.2 Katechiny

Katechiny jsou látky patřící do třídy flavonoidů [ARTS *et al.*, 2000]. Patří sem např. katechin (obr. 11.), epikatechin, epigallokatechin a jejich estery s kyselinou galovou. Většina jich je přítomna hlavně v čaji. Mladé výhonky obsahují 200 až 340 mg katechinu a jeho derivátů v 1g suchého listí [HARA *et al.*, 1995]. V nálevu ze zeleného čaje se nachází 30% katechinů [LUNDER, 1992]. Černý čaj je brán jako zdroj pro boj proti HIV-1, jelikož obsahuje theaflavin deriváty [LIU *et al.*, 2005]. V čaji jsou katechiny účinným lapačem volných kyslíkových radikálů a mohou také nepřímo působit jako antioxidanty, prostřednictvím jejich účinků na transkripční faktory a enzymatickou aktivitu. Účinky čaje, převážně toho zeleného, tlumí oxidativní stres a oxidativní poškození DNA [HIGDON a FREI, 2003]. Dále snižují celkovou hladinu cholesterolu v krvi [MURAMATSU *et al.*, 1986]. Dalšími zdroji jsou např. ovoce, luštěniny [ARTS *et al.*, 2000], červené víno (270mg/l) a čokoláda [FRANKEL *et al.*, 1995].

Obrázek 11: Strukturální vzorec katechinu [TÁBORSKÁ, 2003].



3.3 Proantokyanidy

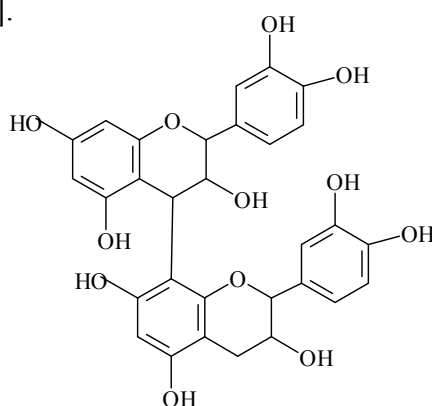
Proantokyanidy jsou komplexní flavonoidy tvořící stabilní komplexy s ionty kovů a bílkovinami a jsou, stejně jako jiné polyfenoly, nedobrá redukční činidla [SANTOS-BUELGA a SCALBERT, 2000]. Vykazují obvykle adstringentní účinky a vyskytují se také vázány esterově s kyselinou galovou nebo ve formě dvojité spojených dimerů [TÁBORSKÁ, 2003].

Jsou schopny inaktivovat kyslíkové radikály a chelátovat ionty kovů, a díky tomu mohou hrát významnou roli v prevenci různých degenerativních onemocnění, způsobených oxidativním stresem [ROP a HRABĚ, 2009]. Jsou přítomny v ovoci, kůře, listech a semenech mnoho rostlin, kde poskytují ochranu. Zároveň dávají chuť a hořkost nápojům jako je víno, ovocné šťávy a čaje, a jsou stále více uznávány za prospěšné účinky na lidské zdraví. Pří-

tomnost proantokyanidinů je také hlavním faktorem pro kvalitu píce [DIXON *et al.*, 2005].

V potravinářských surovinách a v potravinách se nejběžněji vyskytuje proantokyanidin typu B, např. proantokyanidin B₁ převládá v hroznech, čiroku a brusinkách, B₂ v jablkách, višních a kakaových bobech, B₃ v chmelu a jahodách, B₄ v borůvkách a malinách. Proantokyanidiny typu A (obr. 12.) se nachází hlavně ve slupce oříšků podzemnice olejné, v kůře a květech [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

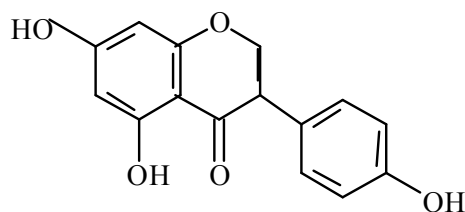
Obrázek 12: Strukturní vzorec proantokyanidinu A [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].



3.4 Isoflavonoidy

Zvláštní skupinou flavonoidů jsou isoflavonoidy, již dlouho známé jako květinové pigmenty pro přilákání hmyzu opylovačů [DIXON a STEELE, 1999]. Hlavním zdrojem isoflavonů je sója, která obsahuje cca 1 mg genisteinu a daidzeinu [REINLI a BLOCK, 1996]. Genistein (obr. 13.) inhibuje aktivitu 5 α -reduktázy a 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázy, což jsou enzymy potřebné pro syntézu androgenu [EVANS *et al.*, 1995; MAKELA *et al.*, 1998]. Isoflavonoid equol, bakteriální metabolit odvozený od daidzeinu, izoluje dihydrotestosteron [LUND *et al.* 2004]. Oba tyto isoflavonoidy se hromadí v prostatě a mohou napodobovat, nebo upravovat endogenní hormony důležité pro karcinogenezi prostaty [ROWLAND *et al.*, 2003]. Isoflavonoidy hrají významnou roli při prevenci rakoviny prsu a osteoporózy [ADLERCREUTZ a MAZUR, 1997], jelikož tyto látky se vyskytují v mnoha rostlinách, které jsou spojeny se snížením výskytu rakoviny. Nachází se převážně v luštěninách, dále vydatným zdrojem je sója (1-3 mg/g) a veškeré produkty z ní [BIRT *et al.*, 2001]. Jejich průměrný příjem potravou u evropské populace je 1 až 9 mg, zatímco v Japonsku až 30 až 40 mg/den [TÁBORSKÁ, 2003].

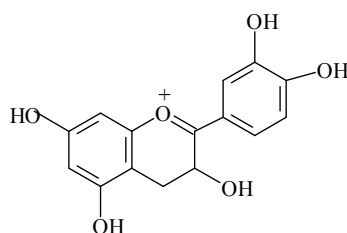
Obrázek 13: Strukturální vzorec genisteinu [TÁBORSKÁ, 2003].



3.5 Antokyanidiny

Antokyanidiny jsou ve vodě rozpustné barevné pigmenty, nejčastěji červené barvy vyskytující se např. ve švestkách, třešních, rybízů a hroznech [DAVÍDEK *et al.*, 1983]. Obsah je kolísavý a to v rozmezí 0,15 mg/g (jahody), 4,5 mg/g (třešně) na čerstvém ovoci [CLIFFORD, 1996]. Jedním z představitelů je zobrazen na obrázku 14.

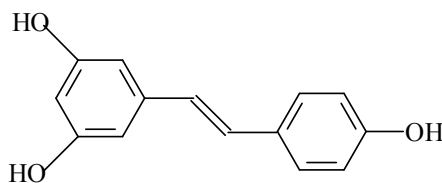
Obrázek 14: Strukturální vzorec sanidinu [TÁBORSKÁ, 2003].



3.6 Stilbeny

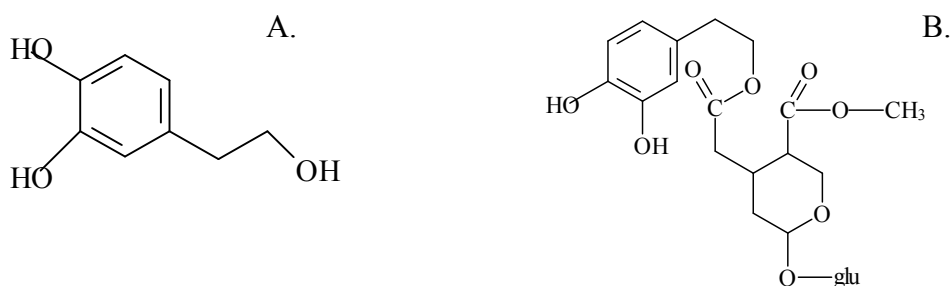
K dietárním polyfenolům, které jsou podskupinou tzv. fytochemikálií polyfenolů, se řadí stilbeny [BORRIELLO *et al.*, 2010]. V rostlinné říši nejsou příliš rozšířeny, avšak jeden z nich v nedávné minulosti vyvolal pozornost vědců. Jedná se o resveratrol (obr. 15.), který byl určitou dobu dáván do souvislosti s tzv. Francouzským paradoxem (v jedné z oblastí Francie byl zaznamenán nízký výskyt kardiovaskulárních onemocnění, což zapříčinil právě resveratrol přítomný v červeném víně) [KRAUS *et al.*, 2008].

Obrázek 15: Strukturální vzorec resveratrol [TÁBORSKÁ, 2003].



Resveratrol tedy působí jako antioxidant, antikarcinogen a zároveň má protinádorové vlastnosti [BURNS *et al.*, 2002]. Nachází se ve slupkách hroznů, červeném víně, borůvkách, brusinkách, sóji, arašidech a oříškách [GRESELE *et al.*, 2011; MANACH *et al.*, 2004]. Dalším stilbenem, který se nachází převážně v hroznech a borůvkách je pterostilben. Je to antioxidant, který zajišťuje prevenci a léčbu rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění [BORRIELLO *et al.*, 2010]. V olivovém oleji byl také prokázán významný obsah polyfenolických látek. Jsou to např. hydroxytyrosol (obr. 16-A.), oleuropein (obr. 16-B.) a jeho aglykon a některé fenolické kyseliny (kávová, vanilová, syringová, protokatechová). Jejich obsah se uvádí až 1 g/kg oleje, je však závislí na odrůdě, způsobu zpracování a také podmínkách pěstování [TÁBORSKÁ, 2003].

Obrázek 16: Strukturní vzorec hydroxytyrosolu a oleuropeinu [TÁBORSKÁ, 2003].



4 JEDLÉ KVĚTY

4.1 Bez černý

Sambucus nigra se řadí do čeledě *Caprifoliaceae*, rodu *Sambucus*. Vytrvalý, obvykle 1,5 až 5 m vysoký keř (občas ale i 10 m vysoký strom). Listy vstřícné, řapíkaté, lichozpeřené, s 3 až 7 lístky, jež jsou kopinaté až vejčitě kopinaté, krátce řapíčkaté, na okraji pilovité, na rubu chlupaté, po rozemnutí mírně páchnoucí. Květy uspořádány v hustých, vrcholových, plochých chocholících o průměru 10 až 25 cm, bílé až nažloutlé, vonné. Plodem je 5 až 8 mm velká černá bobule, tzv. bezinka. Kvete od června do července. Květ obsahuje glykosidy (např. rutin a sambunigrin), cholin, aminy, organické kyseliny, sacharidy, třísloviny, sliz, saponiny, trochu silice a jiné látky. V plodech jsou přítomny antokyanová barviva, organické kyseliny (např. kyselina jablečná, citronová, kozlíková, octová, vinná, propionová), cukr, třísloviny, silice, hořčiny, pentosan, tyrosin, vosk, guma, pryskyřice, vitaminy (hlavně A a B), silice aj. Kůra a listy jsou jedovaté. Listy obsahují toxický glykosid sambucinigrin a alkaloid sambucin, v kůře jsou přítomny třísloviny, alkaloid a pryskyřice, jejíž působení je značně drastické. Otravy se projevují silným zvracením, průjmem, nechutenstvím a celkovou slabostí. Stejně příznaky se ale mohou objevit i při extrémním předávkování bezovými plody. Květy působí potopudně, močopudně, snižují horečku a příznivě působí na cévní stěny [JANČA a ZENTRICH, 1997, díl 1.].

4.2 Pažitka pobřežní

Allium schoenoprasum řazená do čeledi *Liliaceae* je vytrvalá, trsnatá, až 50 cm vysoká bylina s nevýraznými cibulkami. Listy duté, trubkovité, do 0,5 cm v průměru, lysé. Květy v koncovém, okolíčnatém, kulovitém květenství se dvěma listy, okvětní lístky kopinaté, delší než tyčinky. Kvete od května do srpna. Klíčovými prekurzory aroma *A. schoenoprasum* jsou sирné aminokyseliny *S*-alk(en)ylcysteinsulfoxidy neboli *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxydy. Enzymovým rozkladem těchto látek C-S lyasou alliinasa dochází k tvorbě typického aroma. V neporušeném pletivu jsou *S*-alk(en)ylcystein-sulfoxidy lokalizovány v cytoplazmě, zatímco alliinasa ve vakuolách. K rychlému rozkladu těchto aminokyselin za tvorby pyruvátu, amoniaku a alk(en)ylsulfenové kyseliny, jejíž kondenzací vznikají příslušné dialk(en)ylthiosulfináty, dochází při krájení či jiném poškození rostliny. Tyto látky jsou nositeli aroma čerstvě krájené zeleniny a vykazují nezanedbatelné antimikrobní vlastnosti. Obecně jde však o látky mimořádně nestálé, které se při delším stání rychle rozklá-

dají v závislosti na teplotě a polaritě prostředí na celou škálu sekundárních produktů (thiosulfonátů, disulfidů, trisulfidů apod.) tvořících aroma kulinárně zpracovaných zelenin. Zastoupení sirných aminokyselin v pažitce je podobné jako u cibule (kde hlavní sirnou aminokyselinou je isoalliin z níž enzymovou degradací vzniká sulfonová kyselina, která dále isomeruje za tvorby thiopropanalsulfoxidu, látky způsobující slzení očí při krájení cibule), pouze obsah propiinu je poněkud vyšší na úkor isoalliinu, což je také hlavní příčinou podstatně méně výrazných slzotvorných vlastností pažitky [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

4.3 Šťovík kyselý

Rumex acetosa z čeledi *Polygonaceae* a rodu *Rumex* je vytrvalá, dvoudomá, 30 až 100 cm vysoká bylina. Lodyha přímá. Listy podlouhlé, střelovité, celokrajné, přizemní dlouze řapíkaté, horní krátce řapíkaté nebo přisedlé, objímavé střelovitými cípy. Květy malé, jednopohlavní, krovky 3,5 až 5 mm dlouhé, zelené nebo do červena naběhlé, uspořádány v úzkých a řídkých latách. Kveté od května do července. *Rumex acetosa* patří v naší flóře k největším producentům pylu: jedna rostlina vyprodukuje během kvetení, až 400 milionů pylových zrn. Sbírá se list (*Folium rumicis acetosae*), méně často oddenek (*Rhizoma rumicis acetosae*), obojí v období dubna až května. Obsahuje kyselinu šťavelovou, šťavelan (díky těmto látkám chutná kyselé), antrachinonové deriváty, organické kyseliny, vitamín C, oxalát draselný, flavonové glykosidy, minerální látky aj. *Rumex acetosa* je dnes pokládán za drogu zastaralou, v současnosti se užívá převážně jen zevně ve formě kašovitých obkladů na různé kožní defekty nebo ve formě kloktadla při aftech v ústech. Kašovité obklady se osvědčily i při některých formách lupénky (přikládají se denně na dobu 20 až 25 minut). Vnitřně se droga užívá jen zřídka, neboť přítomná kyselina šťavelová se v organismu slučuje s vápníkem v nerozpustný oxalát vápenatý, jenž se může usazovat v močových cestách ve formě kaménků (a kromě toho je tímto způsobem z organismu odčerpáván vápník). Při konzumaci většího množství může droga působit i toxicky podobně jako šťavel kyselý, jenž se i v léčitelství někdy používá stejně jako šťovík [JANČA a ZENTRICH, 1997, díl 4.].

4.4 Jetel plazivý

Trifolium repens čeledi *Fabaceae* a rodu *Trifolium* je vytrvalá, 10 až 30 cm dlouhá bylina. Lodyha poléhavá až plazivá, na uzlinách kořenující, na konci vystoupavá, lysá nebo takřka

lyzá. Listy velmi dlouze řapíkaté, trojčetné, obvejčité až široce eliptické, ostře pilovité, přisedlé, na vrcholu obsrdčité nebo tupě špičaté, na bázi klínovité. Květní hlávky 40 až 80 květé, kulovité, jednotlivé, asi 2 cm v průměru, na stopkách až 20 cm dlouhých. Květy 8 až 13 mm dlouhé, květní stopky 4 až 5 mm dlouhé, po odkvětu sklánějící se, kalich s 10 žilkami, koruna bílá nebo světle krémová, vzácně růžová, po odkvětu hnědá. Kveté od května do září. Droga obsahuje glykosidy, trísloviny, flavonoidy, barviva, fenolické látky, pryskyřice, silice, tanin a flavonové substance pratol a pratensol. Užívá se proti průjmům, při bronchitidě, revmatismu, na oteklé lymfatické žlázy a při cukrovce, zevně pak ve formě koupelí jako kožní dezinfekce. Nejčastěji se užívá ve formě nálevu [JANČA a ZENTRICH, 1997, díl 2.].

4.5 Šalvěj luční

Salvia pratensis, čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*), rodu *Salvia* je vytrvalá, až 80 cm vysoká bylina. Lodyha přímá, v horní části obvykle větvená, chlupatá, s 1 až 3 páry listů, přízemní listová růžice za květu vyvinutá. Listy vstřícné, vejčité nebo trojúhelníkovité, na bázi uťaté nebo srdčité, zubaté nebo vroubkované, chlupaté, dolní lodyžní listy řapíkaté, horní až přisedlé. Listeny maximálně v délce kalicha, koruna fialová, zřídka růžová či bílá, korunní trubka prohnutá, horní pysk přilbovitý, dolní pysk 3laločný. Kveté od května do července. *Salvia pratensis* obsahuje diterpeny karnasovou kyselinu (rosmarinicín) odvozenou od *ent*-kaurenu a hořký karnosol (pikrosalvin), které jsou účinnými antioxidanty. Karnasová kyselina je hlavní složkou čerstvé nati rozmarýny (1 až 2%), ale je nestálá a působením enzymů přechází na karneol. Tyto dva diterpenoidy reprezentují asi 15% hmotnosti extraktů nati rostlin a vykazují asi 90% jejich antioxidační aktivity [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009].

4.6 Fialka rolní

Viola arvensis, čeleď *Violaceae*, rod *Viola* je jednoletá, 5 až 20 cm vysoká bylina. Lodyha vystoupavá, větvená. Dolní lodyžní listy okrouhle vejčité až kopinaté, vroubkované, horní listy vejčité až vejčité kopinaté, vroubkovaně pilovité, palisty dlanitosečné až peřenosečné, s úkrojky obvykle čárkovitými. Květní stopka až 11 cm dlouhá, květy nevonné, nejvýše 15 mm vysoké, žluté, někdy nařialovělé, koruna nepřesahuje kalich nebo jen málo. Kveté od dubna do září. Obsahuje sliz složený z glukózy, galaktózy, arabinózy a ramnózy, dále trísloviny, flavonoidy (rutin, violatin), antokyany, karetonoidy, vitamíny C a E, alkaloid

violin, glykosid vilotusid, silici. Sbírá se kvetoucí nať (*Herba violae tricoloris*) zbavená zdřevnatělých částí. Droga má protirevmatický účinek, podporuje vykašlávání, zlepšuje vylučování odpadních látek z organismu, dobře účinkuje při cévních a kožních chorobách, podporuje usazování vápníku v kostech, má antialergické účinky, působí proti otokům, tlumí krvácení do tkání, působí močopudně, podporuje prokrvení periferních vlásečnic včetně oční sítnice nebo v ledvinách, zevně ve formě koupelí se doporučuje při ekzémech a alergických vyrážkách. Podává se nejčastěji ve formě nálevu (jedna čajová lžička na šálek vody, denně se pije 2 šálky) nebo macerátu. Droga by neměla být podávána těhotným a kojícím ženám a neměla by být podávána dlouhodobě. Při předávkování se může objevit zvracení, u některých citlivých osob se může objevit i při dávkách běžných [JANČA a ZENTRICH, 1997, díl 3.].

V tabulce 3 jsou znázorněny jednotlivé květy a jejich významné látky.

Tabulka 3: Vzorčky a důležité látky v nich [VELÍŠEK a HAJŠLOVÁ, 2009, JANČA a ZENTRICH, 1997].

Český název	Latinský název	Významné látky
Bez černý	<i>Sambucus nigra</i> (Cappariaceae)	antokyanová barviva: Cy-3-sambubiosid (sambucyanin), 3-sambubiosid-5-glukosid, 3,5-diglukosid, 3-glukosid
Pažitka pobřežní	<i>Allium schoenoprasum</i> (Liliaceae)	S-alk(en)ylcysteinsulfoxidy neboli S-alk(en)ylcystein-S-oxidy, dialk(en)ylthiosulfínáty
Šťovík kyselý	<i>Rumex acetosa</i> (Polygonaceae)	k. šřavelová, šřavelan, anthrachinonové deriváty, organické kyseliny, oxalát draselný, flavonové glykosidy
Jetel plazivý	<i>Trifolium repens</i> (Fabaceae)	glykosidy, trísloviny, flavonoidy, barviva, fenolické látky, pryskyřice, silice, tanin a flavonové substance pratol a pratensol
Šalvěj luční	<i>Salvia patensis</i> (Lamiaceae)	karacová kyselina, karneol, složky silice: 0-60% thujon (α - a β -thujon), kafir, 1,8-cineol, α -pinen, β -pinen, bornyl-acetát, myrcen, borneol, linalyl-acetát, ocimen
Fialka rolní	<i>Viola arvensis</i> (Violaceae)	rutin, violatin, antokyany, karetonoidy, alkaloid violin, glykosid vilotusid, silici.

5 BUNĚČNÉ KULTURY

Buněčné kultury mají velmi mnohostranné využití. Jejich kontinuálním sledováním je možno pozorovat řadu buněčných procesů včetně mitózy, cytokineze apod. Buněčné kultury dnes slouží také jako referenční model pro studium toxického působení látek [NEČAS, 2000]. Dále je možno sledovat působení látek chemických, ale i vnějších faktorů fyzikálních [TOZER a PRIT, 1964]. ATCC je firma, která nabízí více než 3600 buněčných linií z více než 150 různých druhů, které mají více než 950 rakovinných buněk, 1000 hybridů a několik speciálních buněk, včetně buněk kmenových (např. HepG2, HaCaT, NIH/3T3) [LGC: online].

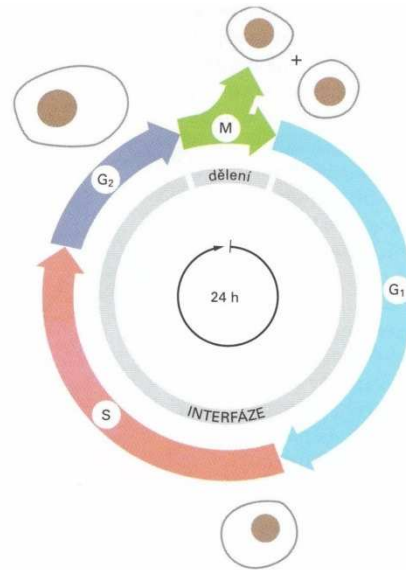
5.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je uspořádaný sled událostí, při kterých buňka zdvojí svůj obsah a následně se rozdělí na dvě dceřiné. U jednobuněčných organismů (bakterie, kvasinky) vzniká každým buněčným dělením kompletní nový organismus, zatímco u mnohobuněčných organismů je zapotřebí mnoha buněčných dělení jednak pro vznik funkčního organismu a jednak pro náhradu opotřebovaných buněk v dospělosti. Během buněčného cyklu musí být genom replikován (pouze jedenkrát), organely a makromolekuly adekvátně zduplikovány a následně rozděleny (segregovány) do dvou dceřiných buněk [ALBERTS *et al.*, 2002].

5.1.1 Fáze buněčného cyklu

Dnes je obecně přijato základní rozdělení buněčného cyklu na čtyři základní fáze. Toto rozvržení bylo navrženo v r. 1953 *Howardem a Pelcema* a těmito fázemi jsou *G₁-fáze*, *S-fáze*, *G₂-fáze* a *M-fáze* (obr. 17.) [NEČAS, 2000].

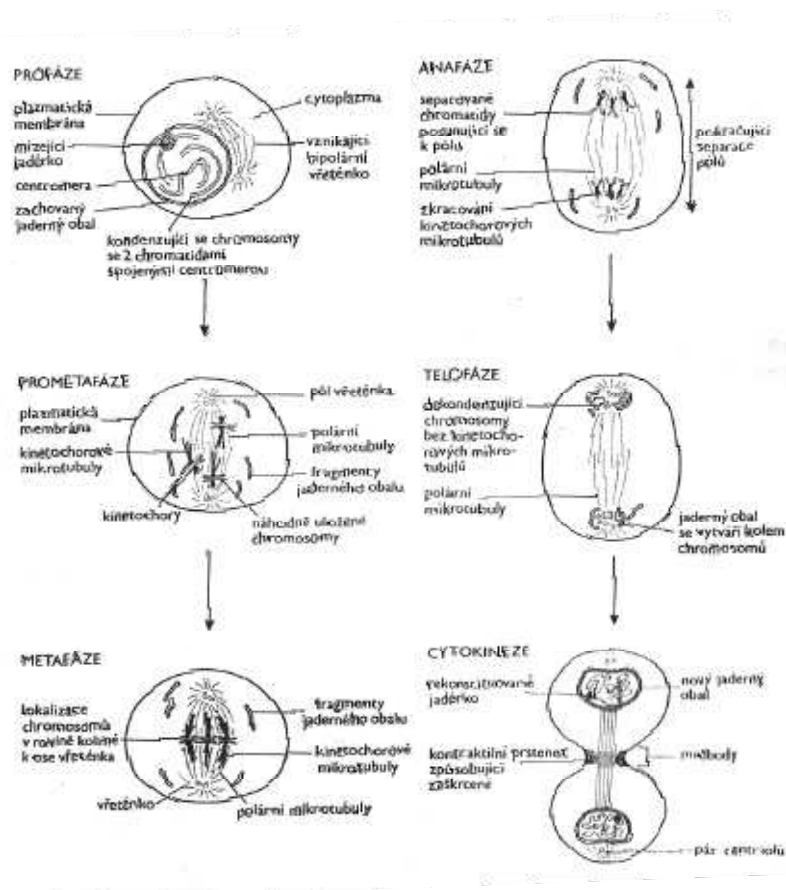
Obrázek 17: Schéma buněčného cyklu [NEČAS, 2000].



V *M-fázi* (mitotická fáze) chromatin kondenzuje do chromozomů a dvou samostatných chromatid, které tvoří chromozom. Výsledkem je oddělení těchto dvou chromatidů tak, aby každá dceřiná buňka byla samostatná. Tento průběh je znázorněn na obrázku 18. Mitóza se zpravidla dělí na pět stádií: profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi. Profáze je charakterizována především dvěma procesy: kondenzací všech chromosomů a vznikem mitotického aparátu tvořeného mikrotubuly. V prometafázi se rozpadne jaderný obal a v místě centromery, každé ze sesterských chromatid se vytváří malé tělísko zvané kinetochor. Procesem charakterizujícím metafázi je posun chromosomů do roviny kolmé k ose dělicího vřetenka, která leží uprostřed mezi centrozomy. Anafáze začíná v okamžiku, kdy se od sebe oddělí obě chromatidy dosud spojené v místě centromery a každá z nich může být posouvána k opačnému pólu. V telofázi se polární mikrotubuly ještě prodlužují až do doby, kdy se kolem chromosomů vytvoří nový jaderný obal. Ke konci telofáze chromosomy postupně dekondenzují a rekonstruují se jádérka. Celý proces mitózy je ukončen cytokinezi, což je proces rozdělovací mateřskou buňku na dvě samostatné existence schopné buňky dceřiné. Cytokinezi považujeme za samostatnou fázi buněčného cyklu, neboť nemusí probíhat vždy ke konci *M-fáze* (může být přesunuta do následujícího cyklu, nebo nemusí proběhnout vůbec) [NEČAS, 2000]. V *G₁-fázi*, buňky buď postupují k syntéze DNA a dalšímu buněčnému dělení, nebo dojde k ukončení buněčného cyklu reverzibilně (*G₀*) nebo ireverzibilně. 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 [FRESHNEY, 2010]. Po *G₁-fázi* následuje fáze S (syntéza DNA), kdy se buňka připravuje

na opakovaný vstup do mitózy (G_1 -fáze) [ŠÁRŠŮNOVÁ, 1990]. V dělicí se buňce, je buněčný cyklus přísně kontrolován mnoha regulačními mechanismy, aby zajistily, že DNA se replikuje pouze jednou, a to ve fázi S (syntetická fáze) [CARDOZO a PAGANO, 2004]. U různých buněk je trvání S -fáze různé, ale u dané buňky vždy konstantní [COOPER, 2000]. Kontrolní bod na začátku syntézy DNA a G_2 stanoví integritu DNA a zastaví buněčný cyklus, aby se DNA opravila nebo uvedla do apoptózy v případě, že oprava není možná. Apoptóza, programovaná buněčná smrt, je regulovaný fyziologický proces, kterým může být buňka oddělena od populace [FRESHNEY, 2005]. Délka G_2 -fáze je relativně krátká a zaujímá 10 až 20% trvání celého buněčného cyklu [NEČAS, 2000].

Obrázek 18: Schéma průběhu mitózy [NEČAS, 2000]



5.1.2 Regulace buněčného cyklu

System regulace buněčného cyklu musí v určitý čas aktivovat enzymy a jiné nezbytné proteiny (aktivátory, inhibitory a kinázy) pro provedení procesu a po dokončení daného procesu je musí deaktivovat. Důležité je, aby byl každý krok cyklu dokončen dříve, než začne

krok následující [ALBERT *et al.*, 2000; NEČAS, 2000]. To rozhoduje o tom, zda se buňka rozdělí, zda vstoupí do vratného, klidového stadia, či zda prodělá postmitotickou diferenciaci. Přitom musí tento kontrolní systém zpracovat velký počet různých signálů. Skládá se v podstatě ze dvou hlavních složek:

- z cyklinů- proteiny s homologními oblastmi, jejichž buněčná hladina výrazně osciluje během buněčného cyklu vlivem transkripční regulace a různě rychlé degradace proteinů. Cycliny jsou katalytické podjednotky aktivních cyklin-cdk komplexů,
- z kináz závislých na cyklinech (CDK)- protein-kinázy vyžadující jako katalytickou podjednotku cyklin a jejich aktivita je regulována fosforylací a defosforylací a pomocí cdk-inhibitorů.

Cykliny se sdružují s CDK, aktivují tak kinázy a dovedou je k jejich specifickým substrátům. CDK zajišťují vedení signálu a rozmnožují příchozí mitogenní signály [HORST *et al.*, 2005]. Podmínkou aktivity CDK není jen asociace s cyklinem, ale i přítomnost dalších proteinových složek aktivního polypeptidového komplexu a naopak absence proteinových inhibitorů CDK. CDK také podléhají regulaci prostřednictvím fosforylace katalytické podjednotky [LEW a REED, 1995].

Regulační systém hlídá také okolní podmínky a reaguje na signály od ostatních buněk, jako jsou např. stimuly k buněčnému dělení. Regulační systém buněčného cyklu hraje klíčovou úlohu v regulaci počtu buněk v tkáních těla. Ve většině případů zahrnuje kontrolní body, ve kterých může být buněčný cyklus zastaven [ALBERTS *et al.*, 2001].

Z několika tkání byly izolovány peptidy a nízkomolekulární bílkoviny s mitogenní aktivitou, tj. signály indukující přechod buněk z G_0 -fáze do buněčného cyklu, které se obecně nazývají růstové faktory. Jedním z prvních byl z poškozené epiteliální tkáně izolován polypeptid s mitogenní aktivitou pro buňky tkáně nepoškozené. Byl nazván epidermální růstový faktor [NEČAS, 2000]. Inzulin a inzulinu podobný růstový faktor je nejsilnější stimulator epidermální proliferace [FUKAMACHI, 1992; BOOTH *et al.*, 1995]. Dnes jsou známy desítky podobných faktorů, výběr nejznámějších růstových faktorů je uveden v tab. 4 [NEČAS, 2000].

Tabulka 4: Některé růstové faktory a jejich funkce [NEČAS, 2000].

Růstový faktor	Účinek
Destičkový růstový faktor (PDGF)	Stimuluje proliferaci buněk pojivové tkáně a některých buněk neuroglie.
Epidermální růstový faktor (EGF)	Stimuluje více buněčných typů, je signálem při embryonálním vývoji.
Interleukin-2 (II-2)	Stimuluje proliferaci aktivovaných T-lymfocytů.
Nervový růstový faktor (NGF)	Stimuluje růst nervových výběžků nervových buněk.
Erytropoetin	Stimuluje proliferaci a diferenciaci buněk červené krevní řady.
Interleukin-3 (II-3)	Stimuluje proliferaci různých typů buněk bílé krevní řady.

5.2 Buněčná smrt

Buněčná smrt může nastat pomocí dvou různých mechanismů [CHWARTZMAN a CIDLOWSKI, 1993]. Nekróza neboli neprogramovaná buněčná smrt je patologický proces, který nastane, když je buňka vystavena vážnému fyzikálnímu nebo chemickému porušení. [WESSELLS *et al.*, 2004; KOWLURU *et al.*, 2004]. Programovaná buněčná smrt se vyskytuje u většiny živočišných tkání v určité fázi svého vývoje [RAFF, 1992]. Jedná se o apoptózu, která byla poprvé identifikována jako morfologicky odlišný režim buněčné smrti v roce 1970 [WYLLIE *et al.*, 2008]. Dalším pojmem, který je nutno vysvětlit je cytotoxicita, což neznamená konkrétní mechanismus buněčné smrti, ale usmrcení buněk způsobené chemickými sloučeninami (např. potraviny, kosmetické či farmaceutické látky) nebo jinými buňkami [BERKE, 1991; KRÄHENBÜHL a TSCHOPP, 1991].

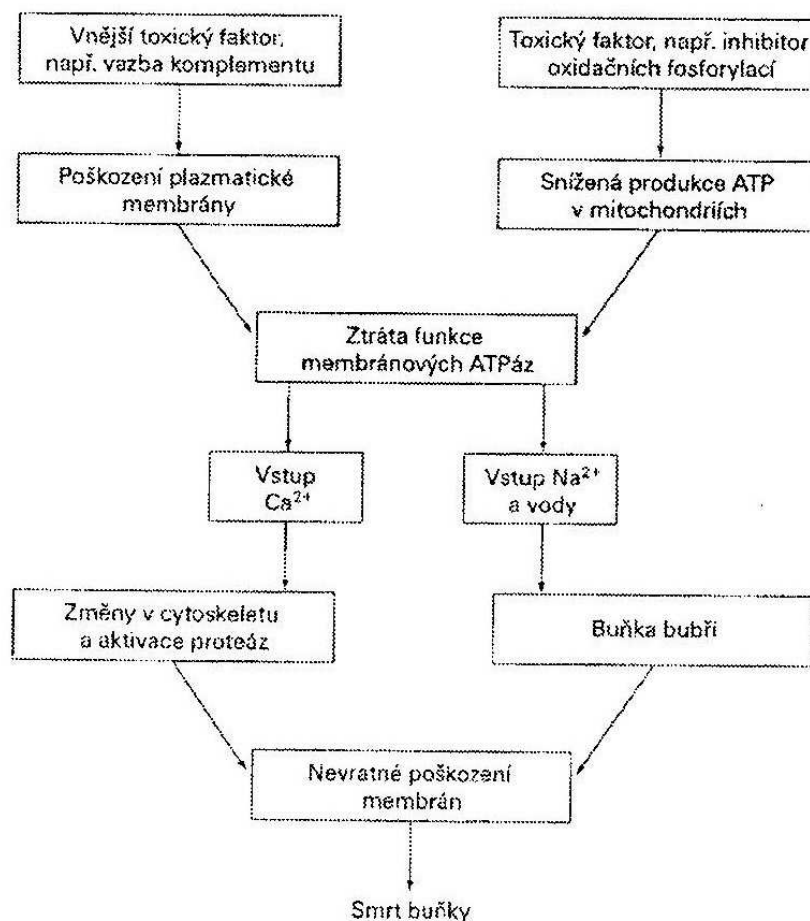
Všechny materiály, které jsou používány např. v medicíně či průmyslu, musí být testovány na řadu vlastností souvisejících s biokompabilitou. Jedním z nich je i cytotoxicita.

5.2.1 Nekróza

K nekróze dochází, jsou-li buňky vystaveny extrémním nevratným (ireverzibilním) podmínkám (např. podchlazení, dlouhodobé přerušování toku látek, nadměrným přísunem energie, působení virů), což může vést např. k poškození plasmatické membrány. Odumření buňky začíná při poškození homeostázy, což vede k průniku vody a extracelulárních iontů do buňky. Dojde ke zvětšení objemu buňky a následnému prasknutí. Proto nekróza je často spojována s rozsáhlým poškozením tkání [Van FURTH a Van ZWET, 1988].

Postup změn, které vedou k nekróze buňky, jsou znázorněny na obrázku 19. Jsou zde znázorněny dvě různé primární příčiny. Oba zásahy se pak převádí na dílčí změny, které jsou již společné. Podobně by tomu bylo i u jiných vnějších příčin, které vedou k nekróze buňky [NEČAS, 2000].

Obrázek 19: Postup změn, které vedou k nekróze buňky [NEČAS, 2000].



Letální (smrtící) faktory zasahují zpravidla primárně do některého z dílčích buněčných procesů a toto místo pak označujeme jako primární terč působení. Od něj se odvíjí celá řada dalších procesů, které vedou k zániku buňky. Velmi častým primárním terčem působení vnějších faktorů jsou biomembrány a zástava syntézy ATP, což v obou případech vede ke stejným příznakům smrti buňky [NEČAS, 2000].

5.2.2 Apoptóza

Apoptóza je aktivní programovaný proces buněčné smrti, kterému mohou sloužit různé funkce v mnohobuněčných organismech [SHEN a SHENK, 1995, FISHER, 2003]. Apoptóza je vysoce selektivní forma "buněčné sebevraždy", s charakteristickými morfologic-

kými a biochemickými charakteristikami: kondenzace chromatinu, vznik apoptotických tělísek a fragmentace DNA aktivací endonukleasy [PAUS *et al.*, 1993]. K apoptóze dochází nejčastěji během normálního embryonálního vývoje [KERR *et al.*, 1972].

Apoptóza vykazuje charakteristické morfologické změny v jádře (fragmentace jádra i chromozomů, kondenzace chromatinu do kompaktních shluků, internukleozomální štěpení DNA apod.) [FREEMAN, 2000]. V lidském organismu jsou denně likvidovány miliony buněk a to „nenápadným“ způsobem, který nevyvolává zánětlivou reakci [NEČAS, 2000]. Většina živočišných buněk potřebuje neustálou signalizaci od jiných buněk, a to proto, aby se vyhnuly programované buněčné smrti. Tím může být zajištěno, že buňky přežívají pouze na správných místech a ve správném čase [ALBERTS *et al.*, 2001]. Apoptóza pravděpodobně také přispívá k mnoha chronickým degenerativním procesům, včetně Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby a selhání srdce. Apoptóza se také vyskytuje spontánně u zhoubných nádorů, často výrazně zpomaluje jejich růst, a to u reakce na ozáření, cytotoxické chemoterapie a hormonální ablace [KERR *et al.*, 2006].

5.3 Buněčná proliferace a životaschopnost

Buněčná proliferace je nárůst počtu buněk v důsledku buněčného růstu a následného dělení buněk. Je vyjadřována počtem buněk, které se v kultuře namnoží. Jedním ze způsobů měření tohoto parametru je provedení klonogenních testů. V těchto testech je definovaný počet buněk na příslušné matrici a počet kolonií, které vznikají po období růstu. Obvykle jedním z parametrů pro měření zdraví buněk je životaschopnost. Může být definována jako počet zdravých buněk ve vzorku. Využívá se to, pokud nejsou primární buňky izolovány a udržovány v kultuře pro stanovení optimálních podmínek. Nejjednodušší metodou pro stanovení životaschopnosti buněk je přímé počítání buněk [DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1994; GERDES *et al.*, 1984].

5.4 Buněčné linie

Jedná se o kultury oddělené z původní tkáně. Buňky se oddělí (mechanicky nebo enzymaticky) do suspenze, která pak může být kultivovaná jako jednovrstvený na pevný podklad, nebo jako suspenze v kultivačním médiu. Buněčné kultury mohou být charakterizovány a definovány populací, a mohou být zakonzervovány zmrazením [UNCHEARN, 1999]. Mohou být konečná (dále poroste pouze pro omezený počet zdvojení) nebo kontinuální, kde se buňky množí na dobu neurčitou, za předpokladu, že jsou sériově pasážovány do čerstvého

média. Pro buněčné linie, je třeba, aby nastala "nesmrtelnost", aby se staly trvalé. To může nastat přirozeně v kultuře (somatickou mutací), virovou transformací, nebo vyvolané jinou mutací či hybridizací (spojení hostitelské buňky s "nesmrtelnou" buněčnou linií). Tyto buněčné linie jsou často velmi užitečné, protože mohou být uloženy v tekutém dusíku a uchovány pro pozdější použití, aniž by bylo nutné získat jiný vzorek tkáně. Kontinuální buněčné linie mohou být využity také pro výrobu biofarmaceutik, vakcín, vektorů pro genovou terapii [MARQUIS, 1994].

5.4.1 Primokultury

První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu neboli primokulturu [SCHAEFFER, 1990]. Jde-li o zakládání primokultury, můžeme rozlišit buňky pocházející z normální a z nádorové tkáně. Nádorové buňky se svými vlastnostmi liší od normálních buněk. Zpravidla se lépe množí a obecně se snáze kultivují. Kultury normálních buněk mají omezenou životnost, po několika pasážích dochází k tzv. zestárnutí kultury – buňky změny svoje vlastnosti a přestanou se dělit. Nádorové buňky většinou stárnutí nepodléhají. Odlišné je také chování buněk izolovaných z dospělého jedince a z embrya. Embryonální buňky se snáze pěstují a kultury, které z nich vycházejí, mají výrazně delší životnost. Na druhou stranu bývají náchylnější ke změnám fenotypu [DAVISEM, 2002].

5.4.2 Adhezní kultury

Jedná se o buněčné linie, které k růstu vyžadují vhodný povrch (dnes nejčastěji tkáňový polystyren). Tyto buňky se pěstují v kultivačních nádobách (lahvích, Petriho miskách apod.) ve speciálních kultivačních médiích. Tyto média obsahují potřebné ionty, aminokyseliny, vitamíny, růstové faktory, pufrů, zdroje energie a další pomocné látky. Směs potřebných růstových faktorů, stopových prvků a dalších látek potřebných v nízkých koncentracích je obvykle dodáván přidavkem fetálního telecího séra. Pro optimální růst je třeba tkáňové kultury pěstovat ve sterilním prostředí se stálou teplotou kolem 37 °C v atmosféře 5 až 10% CO₂ [KARMIOL, 2000]. K následnému uvolnění buněk se používá trypsin /EDTA [MATHER, 1998].

5.4.3 Orgánové kultury

Jedná se o kultury, které zachovávají některé nebo všechny histologické rysy tkáně *in vivo*. Mohou být součástí všech orgánů získaných od zvířete za aseptických podmínek. Celý orgán nebo jeho část jsou udržovány tak, aby umožňovali rozlišení a zachování struktury

kultivační tkáně na rozhraní kapalina-plyn nebo gel [UNCHERN, 1999]. Ačkoli bylo odvozeno mnoho vědomostí od studie jednotlivých typů buněk v kultuře, ve většině případů, reagují buňky v orgánech na jiné typy buněk ve stejném (nebo jiném) orgánu [MARLER *et al.*, 1998].

5.4.4 Subkultury

Často počet buněk získaných v primární kultuře nestačí k vytvoření vhodných podmínek pro roubování a proto subkultury dávají příležitost k rozšíření buněčné populace, ke stanovení dalších selektivních medií a k dosažení vyššího růstu frakce. [FRESHNEY, 2005]. Většina normálních buněčných linií projde omezeným počtem subkultur. Tento limit je dán počtem zdvojení a je ovlivněn řadou vnitřních faktorů, regulací buněčného cyklu [MUNGER a HOWLEY, 2002], a je doprovázen zkracováním telomer na chromozomech [WRIGHT a SHAY, 2002]. Pokaždé, kdy je kultura přeočkována se opakuje růstový cyklus a vznikají sériové subkultury [FRESHNEY, 2005]. Celý postup je označován jako pasážování a nové kultuře se říká subkultura.

6 KULTIVAČNÍ PODMÍNKY

Buněčný cyklus mohou ovlivnit vnější podmínky buď kvantitativně, tj. ovlivní délku cyklu (generační dobu), nebo kvantitativně, tj. buněčný cyklus zastavují nebo zahajují [NEČAS, 2000]. Dále tyto podmínky dělíme na fyzikální, chemické a biologické a tyto faktory je třeba regulovat i za běžných laboratorních podmínek. Důležitými faktory jsou teplota, hodnota pH, kyslík, osmotický tlak a další [FRESHNEY, 2010]. Každá buňka se kultivuje při optimální teplotě pro daný organismus, ze kterého byla izolována [LESKO, 1975].

6.1 Teplota

Optimální teplota pro buněčné kultury je závislá jednak na tělesné teplotě zvířete, ze kterého buňky získáváme, ale také na rozdílné anatomické teplotě (např. teplota kůže a varlat může být nižší než teplota zbytku těla) a na začlenění bezpečnostních faktorů, které umožňují drobné chyby v regulaci inkubátorů [SU *et al.*, 1991]. Teplota vhodná pro většinu buněčných linií (člověka i teplokrevných zvířat) je 37°C. Vzhledem k vyšší tělesné teplotě u ptáků, by měla být ptačí buňka kultivována při 38,5°C pro maximální růst. Při 37°C rostou uspokojivě, avšak pomaleji. Savčí buňky tolerují i nižší teploty. Jsou schopné přežít i několik dní při 4°C, a mohou být zmrazeny až na -196°C. Avšak teplota nad 40°C po delší dobu způsobí jejich odumírání [FRESHNEY, 2005]. K zajištění reprodukovatelných výsledků je věnována pozornost nejen výšce, ale také stabilitě teploty (v rozsahu $\pm 0,5^\circ\text{C}$) [FOSTER a MARTIN, 1992].

6.2 pH a atmosféra CO₂

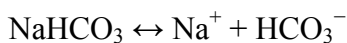
Optimální pH pro růst buněk se liší poměrně málo mezi různými buněčnými liniemi. Většina buněčných linií roste při pH 7,4. Některé normální fibroblastové linie rostou nejlépe při pH 7,4 až při pH 7,7, a transformované buňky mohou snášet i nižší hodnoty pH, a to pH 7,0 až pH 7,4 [EAGLE, 1973]. Bylo také stanoveno, že epidermální buňky mohou být udržovány při pH 5,5 [EISINGER *et al.*, 1979]. Ve zvláštních případech může být výhodné provést stručný experiment růstu, nebo speciální funkční analýzy pro určení optimálního pH [FRESHNEY, 2002]. Běžně používaným indikátorem je fenolová červec v kultivačním médiu, která je při pH 7,4 červená a při pH 7,0 oranžová. Při pH 6,5 je žlutá a poklesem pod tuto hodnotu se zbarví do citronově žluté. Naopak při hodnotách vyšších než pH 7,6 je růžová a při pH 7,8 fialová [EAGLE, 1973]. Vzhledem k tomu, že posuzování barvy je velmi subjektivní, je vhodné použít soubor standardů s použitím sterilního vyváženého

roztoku soli (BSS) s fenolovou červení na správnou koncentraci, ve stejném typu láhve a se stejným obsahem vzduch, který je běžně používán k přípravě médií.

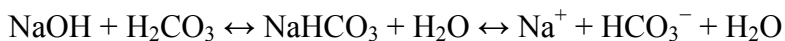
Velmi důležitým plynem je oxid uhličitý a hydrogenuhličitan. Oxid uhličitý se v plynné fázi rozpouští ve střední stavové rovnováze s HCO_3^- ionty, a tím se snižuje pH. Jelikož rozpuštěný CO_2 , HCO_3^- a pH spolu souvisí, je těžké určit přímý vliv CO_2 . Přítomný CO_2 v atmosféře je závislý na teplotě a to brání tvorbě H_2CO_3 , který se uvolňuje podle reakce:



HCO_3^- má poměrně nízkou disociační konstantu s většinou dostupných kationtů, což vede k tendenci obnovit asociace vylučování kyselého média. Výsledkem zvýšení atmosférického CO_2 je snižování pH a zvýšený CO_2 pak může být neutralizován zvýšením koncentrace hydrogenuhličitanu:



Zvýšená koncentrace HCO_3^- má za následek posunutí rovnice doleva, dokud není dosaženo hodnoty pH 7,4. Výsledek je stejný, i pokud se použije jiný oxid (např. NaOH).



Kultury v otevřených nádobách se inkubují v atmosféře CO_2 , jehož koncentrace v médiu je v rovnováze s hydrogenuhličitanem sodným [FRESHNEY, 2005].

6.3 Kyslík

Druhou hlavní složkou plynné fáze je kyslík. Zatímco většina buněk potřebuje kyslík k dýchání *in vivo*, tak kultivované buňky často spoléhají na glykolýzu, která je anaerobní. V některých případech se používají O_2 nosiče, jako je například u hemoglobinu [CHEN a PALMER, 2009]. Ovšem tato metoda ještě není rozšířena, tudíž většina kultur spoléhá především na rozpuštěný O_2 . Ten může být toxický vzhledem k vysokému obsahu volných radikálů [BALIN *et al.*, 1976]. Kultury se liší v požadavcích na kyslík a hlavní rozdíl je mezi orgánovými a buněčnými kulturami [COOPER *et al.*, 1958; BALIN *et al.*, 1976]. Pro většinu buněčných kultur je vhodnější atmosférický kyslík nebo nízký tlak, některé orgánové kultury, zvláště odvozené od pozdního stádia embrya novorozenců nebo dospělých, potřebují až 95% O_2 v plynné fázi [TROWELL, 1959; De RIDDER a MAREEL, 1978]. Na porézní mikronosiče se difúze může stát také omezující [PREISSMANN *et al.*, 1997], jelikož rozptýlené buněčné kultury preferují nižší tlak kyslíku [COURTENAY *et al.*, 1978].

6.4 Osmolalita

Osmolalita je celkové množství osmoticky aktivních částic rozpuštěných v kilogramu vody. Vyjadřuje se v osm/kg nebo ve zlomcích této jednotky. Většina kultivovaných buněk má poměrně širokou toleranci k osmotickému tlaku [WAYMOUTH, 1970]. Vzhledem k tomu, že osmolalita v plazmě je přibližně 290 mosmol/kg, je rozumné předpokládat, že tato úroveň je optimální pro lidské buňky *in vitro*, ačkoli to může být různé pro jiné druhy. V praxi, osmolalita je mezi 260 mosmol/kg a 320 mosmol/kg, což je přijatelné pro většinu buněk [FRESHNEY, 2005], avšak jednou zvolená hodnota by měla zůstat konstantní na ± 10 mosmol/kg [WAYMOUTH, 1970].

Osmolalita je obvykle měřena poklesem uvolnění místa, nebo zvýšení tlaku par tohoto média. Měření osmolality je užitečný krok kontroly jakosti, pokud si chceme vytvořit média sami, jelikož pomáhá chránit před chybami při navažování, ředění, a podobně. Je to zvláště důležité sledovat v případě změny konstrukce media. Přidání HEPES a léků rozpuštěných v silné kyselině nebo zásadě a jejich následná neutralizace může výrazně ovlivnit osmolaritu [FRESHNEY, 2005].

6.5 Viskozita

Viskozita kultivačního média je ovlivněna především obsahem séra a ve většině případů má malý vliv na buněčný růst. Viskozita se stává důležitou, pokud je suspenze rozrušená (např. při přerušení kultury se míchá), nebo když buňky jsou odděleny trypsinem. Jakékoliv poškození buněk, ke kterému dochází za těchto podmínek můžeme snížit zvýšením viskozity média s karboxymethylcelulóza (CMC) nebo polyvinylpyrrolidon (PVP) [CHERRY a PAPOUTSAKIS, 1990]. To je obzvláště důležité při nízké sérové koncentraci, v nepřítomnosti séra. U bioreaktoru se používá zamíchání kultur, ve kterém je často používán Pluronic F68, ačkoli jeho účinek je pravděpodobně multifaktoriální [FRESHNEY, 2005].

6.6 Média a séra

6.6.1 Média

Pro kultivaci buněčných kultur se využívají kultivační média. Jejich součástí bývají často také séra. Složení médií je vysoce specifické s ohledem na kultivovanou buněčnou linii. Veškeré látky použité pro přípravu médií musí být vysoké kvality s minimem nežádoucích

příměsí [WAYMOUTH, 1970]. Základem je voda a v ní rozpuštěné anorganické soli. Ty hrají významnou roli v zajištění vhodného pH, osmotického tlaku a jsou zdrojem nezbytných iontů. Osmotický tlak je roven koncentracím rozpuštěných iontů. Mezi nejzákladnější ionty obsažené v médiích jsou Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} a HCO_3^- [YAMADA a GEIGER, 1997]. Další důležitou součástí většiny médií je glukóza, jako zdroje energie. Je metabolizována hlavně na pyruvát, který může být převeden na laktát a acetoacetát a ty mohou vstoupit do Krebsova cyklu, kde jsou oxidovány za vzniku CO_2 a vody. Krebsův cyklus nemusí fungovat úplně a to při hromadění kyseliny mléčné v médiu, což je patrné v embryonálních a transformovaných buňkách. V médiu se vyskytuje i řada dalších látek včetně bílkovin, peptidů, nukleosidů, kyseliny citronové apod [FRESHNEY, 2002]. Viskozita kultivačního média je ovlivněna především obsahem séra a ve většině případů má malý vliv na růst buněk [CHERRY a PAPOUTSAJIS, 1990].

6.6.2 Séra

Sérum je důležitou částí média pro kultivaci a to především pro obsah specifických látek. Každé sérum je jiné kvality, proto se provádí testy na přítomnost endotoxinů, testy na snášenlivost konkrétním typem buněk, na přítomnost virů, apod. Séra jsou také různého původu, různé šarže, normální a inaktivní séra (inaktivace séra je jeho vystavení teplotě 56°C po dobu cca 30 až 45 minut) [ALBERTS *et al.*, 1998]. Sérum obsahuje růstové faktory, které podporují buněčnou obranu. Sérum je také zdrojem minerálů, tuků a hormonů, z nichž mnohé mohou být vázané na bílkoviny. Nejčastěji používaná séra jsou z tkání kultury z telecího či hovězího plodu, z dospělého koně a lidské sérum. Séra telece (CS) a plodu skotu (FBS) jsou nejvíce používána, především pro náročnější buněčné linie a pro klonování. Lidské sérum je někdy používáno pro specifické lidské buněčné linie [HYVONEN *et al.*, 1988; KAMINSKA *et al.*, 1990].

Kultivační média mohou být dodávána jako kapaliny nebo ve formě prášku. Média ve formě kapaliny mohou mít trvanlivost při 4°C až jeden rok. Sérum má trvanlivost přibližně jeden rok při 20°C . Příprava médií, ve všech případech, vyžaduje vysokou kvalitu vody, a proto se používá voda deionizovaná (velmi kvalitní čistá voda s vysokou rezistivitou, u níž došlo k odstranění organických látek, iontů a bakterií) [UNCHERN, 1999].

6.7 Antimikrobiální látky

Při manipulaci s primární kulturou, je třeba pracovat za přísných aseptických podmínek. Není-li dosaženo dobrých sterilních podmínek, je zapotřebí použít do médií antibiotika určitých kritérií (např., nesmí inhibovat růst ani ovlivňovat metabolismus buněk a musí ochraňovat kulturu po celou dobu experimentu) a antimykotika [UNCHERN, 1999]. Dosažení kontroly nad velkým množstvím mikroorganismů, aniž by působily toxicky na buňky, vyžaduje intenzivní krátkodobé vystavení vysokým koncentracím antibiotik. Pro tkáňové kultury používá většina autorů celou řadu antibiotik, např. penicilin a antimykotika jako jsou kanamysin, gentamicin a amfotericin B [KAEFFER, 2002].

6.8 Práce s kulturami

Práce s buněčnými kulturami závisí na pečlivé kontrole kultivačních podmínek a práci s těmito kulturami. Je také důležité věnovat pozornost čistotě, autenticitě a stabilitě. Je nutné, aby veškeré používané pomůcky a chemikálie byly sterilní a aby neobsahovaly toxické látky. Pro zajištění sterility zařízení a chemikálií, se doporučuje sterilizovat v autoklávu všechny komponenty a chemikálie, které jsou tepelně stabilní a to za sterilační teploty 121°C po dobu nejméně 15 minut při tlaku 100 kPa. Zařízením 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 *et al.*, 2002]. Omytím (2-5% aldehydy, 70% EtOH, 2-5% fenol, 5-10% peroxid vodíku) se sterilizují nástroje, pracovní plochy, některé plasty a sklo. Také plamenem lze sterilovat kovy a některé sklo [SPECTOR a GOLDMAN, 1998].

Při práci s kulturami by dveře inkubátorů měli zůstat otevřené jen na nezbytně nutnou dobu. V inkubátoru by měl neustále proudit vzduch k vyrovnání teplot na jeho různých místech [LESKO, 1975]. Vzorky by měly být bezpečně zabalené ve dvou vodotěsných kontejnerech a všechny lidské materiály je nutno přepravovat jako potenciálně infikované, proto by se mělo s nimi zacházet s opatrností [SAMBROOK *et al.*, 1989].

Každá laboratoř má vlastní biologické předpisy, kterými by se měla řídit, a kdokoliv by měl pochyby o nevhodné manipulaci, měl by kontaktovat místní bezpečnostní organizaci. Kromě obvyklého vybavení jsou také nutné některé speciální přístroje a pomůcky. Proto tyto techniky vyžadují zvlášť vybudované laboratoře s vyškoleným personálem a díky tomu jsou tyto techniky poměrně nákladné.

6.8.1 Izolace buněčného kmene

Izolace buněk, které se budou pěstovat je prvním krokem pro založení kultury. Výchozím materiálem je orgán či tkáň sterilně odebraný z pokusného zvířete. Jde-li o kvalitní orgán, jsou dvě možnosti, jak z něj vytvořit buněčnou kulturu.

- Prvním způsobem je, že tkáň se rozřeže na malé částičky a ty se následně ponoří do kultivačního média. Buňky pak z částiček vyrůstají a šíří se po povrchu kultivační nádoby.
- V druhém případě se tkáň rozvolní na jednotlivé buňky, ať už mechanicky homogenzátorem, nebo šetrněji – např. enzymatickým natrávením (trypsinem, kolagenázou, pronázou, dispázou, elastázou apod.).

V obou případech vzniká směs mnoha buněčných typů, ze které je nutné žádanou subpopulaci izolovat. Lze využít různé odolnosti jednotlivých typů buněk vůči různým podmínkám (náročnost na složení kultivačního média, citlivost vůči toxickým látkám apod.), nebo lze buňky rozdělit podle jejich fyzikálních vlastností (nejčastěji podle hustoty nebo rychlosti sedimentace). K izolaci buněk podle hustoty (izopyknická sedimentace) se využívá centrifugace buněčné suspenze ve zkumavce naplněné médiem, které má v různých vzdálenostech ode dna různou denzitu – tzv. dělení dle gradientu hustoty. Hustota gradientu se může měnit buď plynule (spojité gradienty), nebo skokem (nespojité gradienty). Lepší dělení buněk i výtěžek než izopyknická sedimentace poskytuje tzv. centrifugační elutriace. Ta umožňuje pomocí speciálního zařízení rozdělit buňky podle rychlosti sedimentace, tj. nejen podle hustoty, ale i objemu. Jedná se však o metodu technicky mnohem složitější a vyžaduje zvláštní vybavení.

6.8.2 Zchlazování a zamrazování buněk

Vždy, když chceme vzorky s kulturou skladovat, musí být zchlazené nebo zmrazené. Oba body jsou velmi důležité. Lednici nebo chladné místnosti je potřeba k uložení středních médií, zatímco hlubokomrazící box je potřebný pro udržení zásoby séra, živin a antibiotik [FRESHNEY, 2010]. Mají-li být buňky zachovány, je zmrazení nezbytné zajistit tekutým dusíkem nebo hlubokomrazícím boxem kde bude -80°C . Postup pro zmrazování buněk je obecně pro všechny buňky v kultuře stejný. Měly by být zmrazeny v exponenciální fázi růstu a vhodným konzervačním činidlem, obvykle dimethylsulfoxidu (DMSO). Buňky jsou zmrazeny pomalu o 1°C za minutu, až na -50°C . Následně se uchovávají při teplotě -196°C

ponořené do kapaliny N₂ (v uzavřených skleněných či plastových ampulích) nebo nad hladinou kapaliny v plyné fázi. Zhoršení zmrazených buněk bylo pozorováno při -70°C, proto je -196°C nezbytné pro dlouhodobé skladování [UNCHERN, 1999]. Do hlubokomrazicího boxu se dávají buňky v termoizolačním materiálu (např. pěnový polystyren) na 1 až 3 dny a dojde k trvalému uchování [CELIS *et al.*, 1994]. Např. při zmrazení růstového média HepG2, HaCaT nebo NIH/3T3 je zapotřebí doplnit médium o 5% DMSO a skladování v tekutém dusíku [LGC: online].

6.8.3 Rozmrazování buněk

Rozmrazované buňky je třeba co nejrychleji převést na kultivační teplotu (např. ve vodní lázni). Stejně jako i zmrazování, tak i rozmrazování závisí na minimalizaci intracelulárních ledových krystalků z vody, které by poškodily kultury [FRESHNEY, 2010]. Po zahřátí se provede odstranění zmrazovacího média (centrifugací) a poté se provede výsev k další kultivaci. Druhý den po vysetí je vhodné vyměnit kultivační médium za nové, čímž se odstraní zbytky buněk, které zamrazení (rozmrazení) nepřežily [ALBERTS *et al.*, 2001].

6.8.4 Přeprava buněk

Kultury mohou být přepraveny z jedné laboratoře do druhé několika způsoby. V termosce, což je způsob lokální přepravy, nebo jako zmrazené ampulky v izolačním boxu se suchým ledem (CO₂) pro přepravu na delší vzdálenosti, nebo jako živé kultury v kultivační nádobce s nadbytkem média. Tkáně (s výjimkou krve) se přepravují podchlazené ve výživných médiích [SPECTOR a GOLDMAN, 1998].

6.8.5 Monitorování infekce

Kultury je zapotřebí průběžně monitorovat z důvodu možné kontaminace buněčných kultur mikroorganismy. Bakteriální a plísňové kontaminace lze obvykle snadno detekovat a odstranit. Větší úsilí je vynaloženo na odhalování a odstraňování virové kontaminace [FOGH, 1973]. Pokud se v kultuře nebo v zásobních roztocích vyskytnou plísně, bakterie či viry, dochází k rychlému vyčerpání média, což se projeví změnou jeho barvy z červené na žlutou, díky poklesu pH [EAGLE, 1973]. Ke zviditelnění těchto mikroorganismů se provádí tzv. mikroskopické barvení na celkovou DNA. To je prováděno převážně v případech, kdy buňky špatně rostou, nemají správný tvar, jsou citlivější ke stresu atd. Následuje stanovení specifických antigenů - imunocytochemie, nebo western-blot. To umožní detekci speci-

fických bílkovin v biologickém materiálu a zajistí přenos proteinů pomocí elektrického pole kolmého na původní směr separace [YAMADA a GEIGER, 1997].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 METODIKA

Cílem předkládané práce bylo stanovit vliv PhC extrahovaných z vybraných jedlých květů na proliferaci eukaryotických buněk. V prvním kroku proběhla extrakce látek z květů pomocí metanolu a následně byla stanovena koncentrace PhC v extraktech. V druhém kroku došlo k úpravě koncentrace jednotlivých extraktů tak, aby byly ve všech vzorcích totožné koncentrace PhC. Ve třetí části pak proběhl vlastní test vlivu extraktů a v nich obsažených látek na buněčnou proliferaci a to pomocí *in vitro* testů na buněčných liniích. Vyhodnocení proliferace bylo provedeno pomocí spektroskopického testu MTT.

7.1 Jedlé květy

Pro extrakty PhC byly vybrány následující jedlé květy: *S. nigra* (Bez černý), *A. schoenoprasum* (Pažitka pobřežní), *R. acetosa* (Šťovík kyselý), *T. repens* (Jetel plazivý), *S. pratensis* (Šalvěj luční) a *V. arvensis* (Fialka rolní).

7.2 Použité vybavení

Veškeré práce byly prováděny v laminárním boxu Biological Safety Cabinets HERAsafe KSP (Thermo Electron LED GmbH; Německo). Kultivace buněk probíhala v inkubátoru s řízenou atmosférou CO₂ Heracell 150i (Thermo Scientific; USA) při teplotě 37°C a atmosféře 5% CO₂. K vyhodnocení MTT testu byl použit přístroj Elisa reader Sunrise (Tecan; Švýcarsko), umožňující měření 96 jamkových destiček. K mikroskopování byl použit mikroskop s fázovým kontrastem (Olympus, CKX41).

7.3 Extrakce polyfenolů

Ihned po utržení byly květy zmrazeny a uchovány při teplotě -40°C. Před samotným stanovením byla provedena extrakce podle Hakimuddien et al.[2008] s malými úpravami. Zmražené rostliny byly homogenizovány v 90 % metanolu (2ml/g) a následně se nechaly extrahovat při 4°C po dobu 30minut. Po extrakci následovalo odstředění v centrifuze při 1990 r/pm po dobu 10minut. Následovalo oddělení sedimentu od supernatanu. Sediment byl předmětem nové extrakce. Tento proces byl opakován celkem třikrát. Supernatany obsahující polyfenoly byly vysušeny v laborota4011 digital (Heidolph; Germany) a dále uskladněny při -20°C do doby vlastního testu.

Následně byly extrakty zkoncentrovány na 1000µg/ml.

7.4 Kultivace buněk

Ke kultivaci byly použity tři buněčné linie. Jako první byly použity lidské keratinocyty (HaCaT, CLS Catalog No. 300493; Germany). Pro jejich kultivaci bylo použito Dulbecco's Modified Eagle médium, s vysokým obsahem glukózy do kterého bylo přidáno 10% fetálního séra a Penicillin/Streptomycin, 100 U/ml (100 μ g/ml) zabraňující infekcím, (PAA Laboratories GmbH, Austria). Druhou buněčnou linií byly hepatocyty (HepG2, ATCC HB-8065). HepG2 byly kultivovány v médiu Eagle's Minimum Essential s přidavkem 10% fetálního séra skotu, 2 mM L-glutamine and 50 μ g/ml gentamycine (PAA Laboratories GmbH, Austria). Jako poslední byly použity myší embryonální fibroblasty (NIH/3T3, ATCC CRL- 1658) s podobným složením kultivačního média jako v případě linie HaCaT, lišící se pouze sérem. Tato buněčná linie obsahuje calf sérum.

7.5 Stanovení polyfenolů

7.5.1 Test anti - proliferačního účinku

Před samotnými testy byly extrakty dezinfikovány pomocí UV-záření o vlnové délce 258nm (UV-C Long Life 30W/G30TB, Phillips; Holland). Extrakty byly následně zředěny v kultivačním médiu k získání výsledných roztoků.

Všechny připravené roztoky byly použity do 24hodin. Buňky byly vysety do testovací destičky s 96 jamkami (TPP, Switzerland) jeden den před započítáním vlastního testu, aby proběhla prekultivace. Doba rekultivace se lišila v závislosti na růstové křivce jednotlivých linií, takže v případě HaCaT a NIH/3T3 se jednalo o 24 hodin v případě HepG2 pak 48 hodin. Kultivační médium bylo následně nahrazeno připravenými roztoky s různou koncentrací extraktů. Jako kontrolní experiment byla použita kultivace v médiu bez obsahu extraktů.

Pro posouzení vlivu extraktů na proliferaci byl použit test MTT (Invitrogen Corporation, USA). Tento test je založen na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly hvězdicovitého tvaru). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva, tím vyšší procento živých buněk a tedy i vyšší absorbance). Princip konverze byl popsán v roce 1954

Blackem a Speerem a metoda byla zavedena do laboratorní praxe Mosmanem v roce 1983 (tzv. kolorimetrický test stanovení životnosti buněk).

Kultivace probíhala při 37°C a k vyhodnocení došlo 4. a 6. den v případě HaCaT, 7. a 11. den v případě HepG2 a 4. a 6. den v případě NIH/3T3. Termíny vyhodnocení byly stanoveny v závislosti na růstové křivce jednotlivých linií.

Absorbance byla měřena při 540nm pomocí spektrometru Sunrise microplate absorbance reader (Tecan, Switzerland). Všechny testy byly provedeny ve čtyřech opakováních s následnou kontrolou vychýlených hodnot pomocí Q-testu. Pozorování buněk bylo provedeno pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem (Olympus, CKX41). Závěrečné vyhodnocení statistických rozdílů bylo provedeno pomocí T-Testu (Statistica for Windows).

8 VÝSLEDKY

Tato část diplomové práce je zaměřena na popis naměřených výsledků. Byl určený antiproliferační vliv polyfenolových extraktů šesti jedlých květů na tři buněčné linie. Extrakty byly použity v pěti různých koncentracích polyfenolů a jejich účinek na proliferaci byl vyhodnocen v různých časových obdobích.

8.1 Vliv polyfenolů na lidské keratinocyty

Grafy vlivů extraktů z jedlých květů na buňky lície HaCaT (lidské keratinocyty, CLS Catalog No. 300493, Germany) jsou uvedeny v grafu č. 1 až 12. V grafech jsou prezentovány stanovené hodnoty absorbance korelující s počtem živých buněk. Vyhodnocení bylo provedeno 4. a 6. den. V měření pro HaCaT 4. den je průměrná kontrolní hodnota absorbance 0,5352 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0875$, a v měření 6. den je průměrná kontrolní hodnota absorbance $0,4602 \pm 0,0453$. Tabulky, s průměrnou koncentrací jednotlivých květů a kontroly, představují statisticky průkazné rozdíly (tabulka 5 – tabulka 10).

Tabulka 5: Vliv extraktů z *S. nigra* na HaCaT (průměr \pm SD).

Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>S. nigra</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	$0,2471 \pm 0,0365$ **	$0,2356 \pm 0,0155$ **
<i>S. nigra</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	$0,5003 \pm 0,0773$	$0,4775 \pm 0,0352$
<i>S. nigra</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	$0,4355 \pm 0,0662$ **	$0,4665 \pm 0,0812$
<i>S. nigra</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	$0,3868 \pm 0,0624$ **	$0,4677 \pm 0,0446$
<i>S. nigra</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	$0,3590 \pm 0,0677$ **	$0,4015 \pm 0,0799$ **
Kontrola	$0,5352 \pm 0,0875$ *	$0,4602 \pm 0,0453$ *

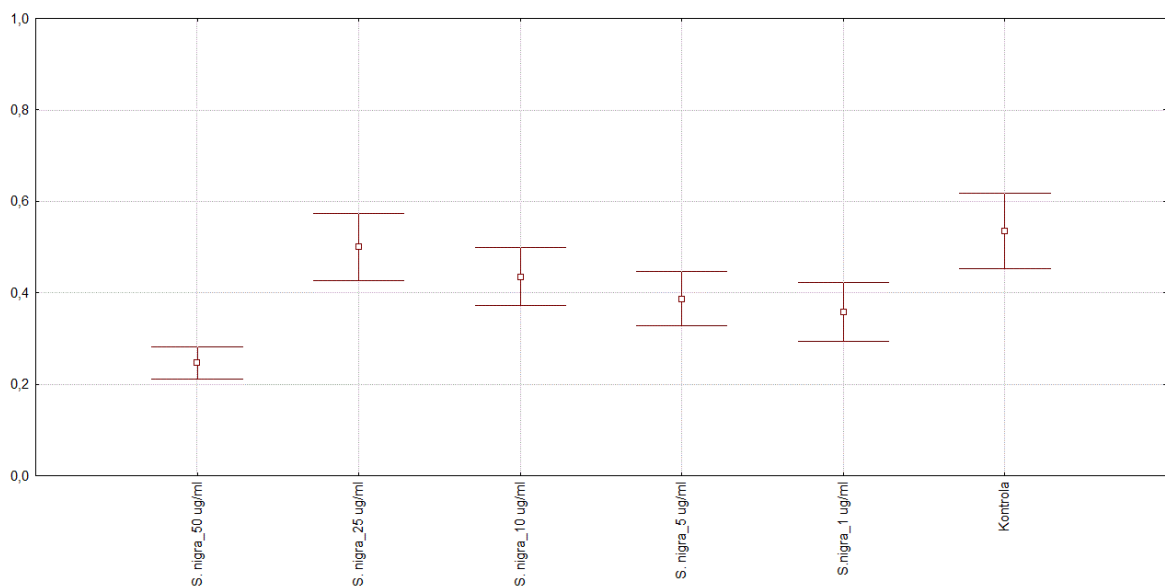
Hodnoty s rozdílnými indexy vykazují průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **).

Nejnižší průměrné hodnoty absorbance PhC byly zjištěny u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$, a to při hodnocení 4. i 6. den (viz. tabulka 5). Při vyhodnocení 4. den byl u všech koncentrací *S. nigra*, výjimkou koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$, statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou a průměrnou hodnotou absorbance. U koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ byla průměrná hodnota absorbance 0,5003 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0773$. Průměrná hodnota absorbance květu a jeho směrodatná odhylnka se překrývají s kontrolním měřením ($0,5352 \pm 0,0875$), a proto se tento účinek nepovažuje za statisticky průkazný.

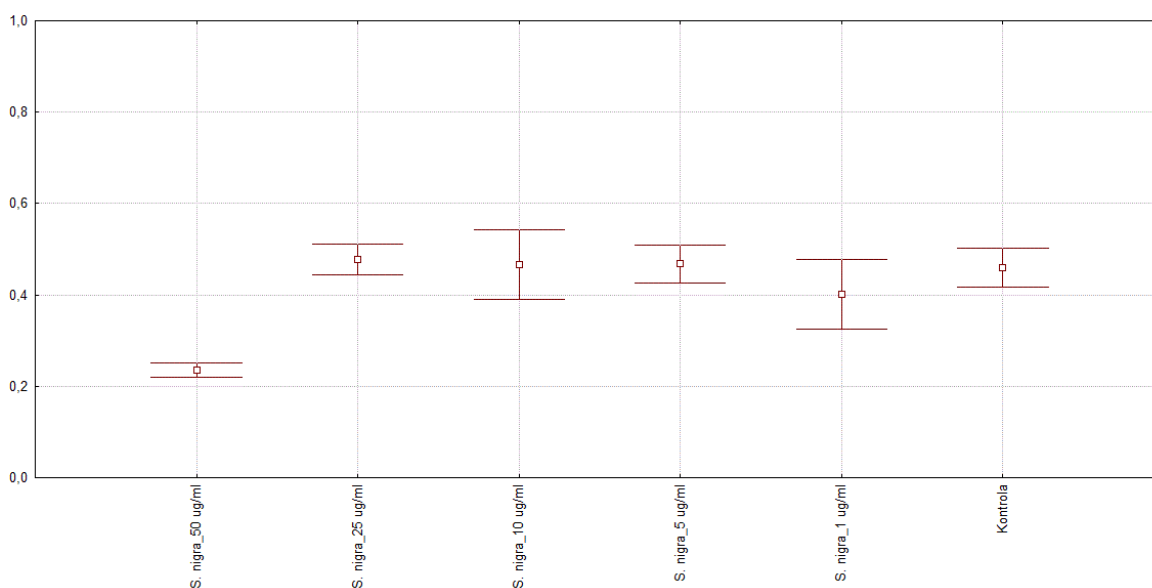
Po vyhodnocení 6. den byl statisticky průkazný rozdíl, mezi kontrolou a průměrnou hodnotou absorbance, při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ ($0,2356 \pm 0,0155$) a 1 $\mu\text{g/ml}$ ($0,4015$

$\pm 0,0799$). Zbylé koncentrace (25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ a 5 $\mu\text{g/ml}$), s absorbancí v rozmezí 0,4665 až 0,4775, se opět překrývají s kontrolním měřením ($0,4602 \pm 0,0453$), a proto se tyto účinky nepovažují za statisticky průkazné. V obou dnech vyhodnocení vykazují trakty z *S. nigra* podobnou účinnost (graf 1 a 2). Nejprve došlo ke zvyšování absorbane, se snižující se koncentrací květu, avšak u koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ došlo ke zvratu a absorbane začala klesat. Nejnižší absorbane v obou případech byla naměřena u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ a lze tuto koncentraci, a všechny vyšší, považovat za statisticky významný vliv na proliferaci.

Graf 1: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbane, za přítomnosti extraktů z *S. nigra* 4. den (průměr \pm SD).



Graf 2: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. nigra* 6. den (průměr ± SD).



Tabulka 6: Vliv extraktů z *A. schoenoprasum* na HaCaT (průměr ± SD).

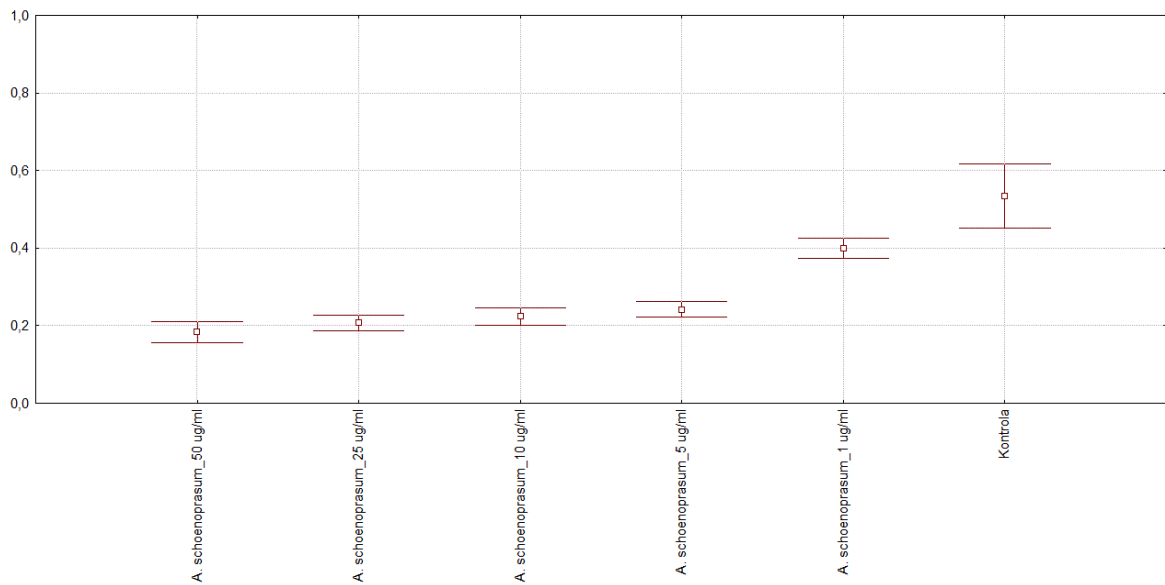
Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>A. schoenoprasum</i> 50 µg/ml	0,1840 ± 0,0288 **	0,2078 ± 0,0322 **
<i>A. schoenoprasum</i> 25 µg/ml	0,2069 ± 0,0214 **	0,2014 ± 0,0150 **
<i>A. schoenoprasum</i> 10 µg/ml	0,2239 ± 0,0244 **	0,2035 ± 0,0256 **
<i>A. schoenoprasum</i> 5 µg/ml	0,2419 ± 0,0215 **	0,2305 ± 0,0351 **
<i>A. schoenoprasum</i> 1 µg/ml	0,4002 ± 0,0272 **	0,4519 ± 0,0345
Kontrola	0,5352 ± 0,0875 *	0,4602 ± 0,0453 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazují průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **).

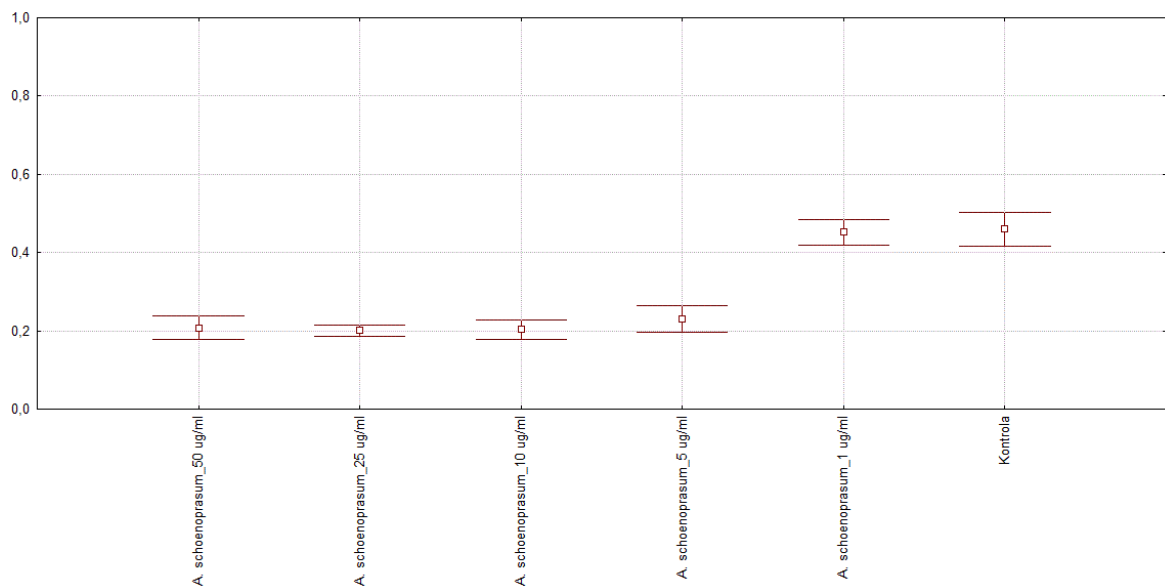
U vzorku *A. schoenoprasum* vyhodnoceného 4. den byl statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou ($0,5352 \pm 0,0875$) a průměrnou hodnotou absorbance ve všech koncentracích, což znázorňuje tabulka 6. V případě delšího působení HaCaT buněk byl statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole ve všech vysokých koncentracích. Vyjimku tvořila koncentrace 1 µg/ml, kdy absorbance byla $0,4519$ se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0345$, která se překrývá s kontrolním vzorkem ($0,4602 \pm 0,0453$), a tudíž zde nebyl prokázán statistický průkazný rozdíl. Nejnižší průměrné hodnoty proliferace HaCaT byly zjištěny v obou dnech vyhodnocení u všech koncentrací, výjimkou koncentrace 1 µg/ml. Absorbance při těchto koncentracích se pohybovala v rozmezí $0,1840$ až $0,2429$. Z grafu 3 je patrné, že se snižující se koncentrací stoupá absorbance. Jelikož všechny výsledky měly velmi malé směro-

datné odchylky, lze považovat průměrné hodnoty extraktů za velmi přesné. Z výsledků vyplývá účinnost extraktů květu *A. schoenoprasum* na snižování proliferace buněk již při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ po 4 dnech a při koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ po 6 dnech.

Graf 3: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *A. schoenoprasum* 4. den (průměr \pm SD).



Graf 4: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *A. schoenoprasum* 6. den (průměr \pm SD).

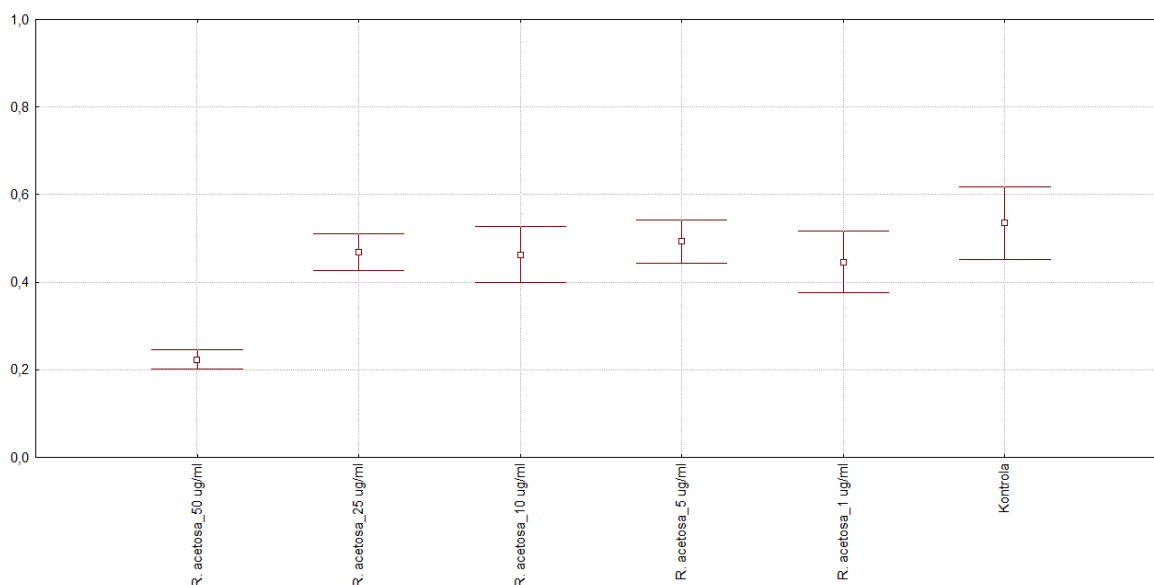


Tabulka 7: Vliv extraktů z *R. acetosa* na HaCaT (průměr ± SD).

Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>R. acetosa</i> 50 µg/ml	0,2234 ± 0,0231 **	0,2758 ± 0,0478 **
<i>R. acetosa</i> 25 µg/ml	0,4691 ± 0,0443 **	0,3869 ± 0,0426 **
<i>R. acetosa</i> 10 µg/ml	0,4631 ± 0,0678 **	0,5024 ± 0,0626 **
<i>R. acetosa</i> 5 µg/ml	0,4928 ± 0,0529	0,4765 ± 0,0517
<i>R. acetosa</i> 1 µg/ml	0,4458 ± 0,0739 **	0,5284 ± 0,0829 **
Kontrola	0,5352 ± 0,0875 *	0,4602 ± 0,0453 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazují průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **).

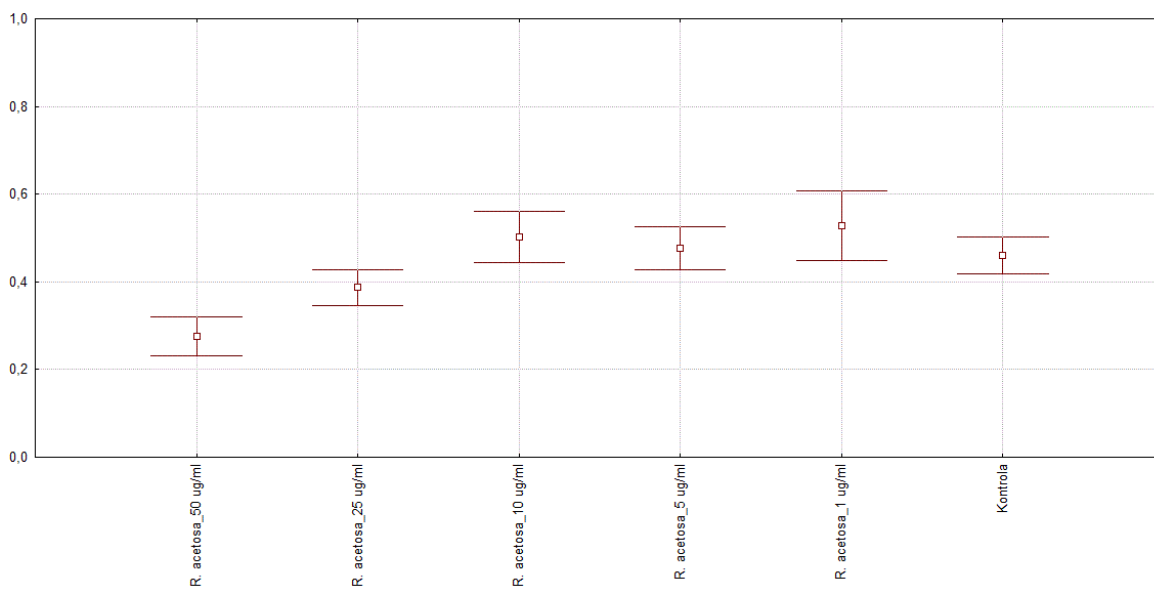
Graf 5: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *R. acetosa* 4. den (průměr ± SD).



V tabulce 7 je popsán vliv extraktů z *R. acetosa* na HaCaT. U nejvyšší koncentrace 50 µg/ml byla zjištěna nejnižší absorbance (0,2234 a 0,2758). Všechny ostatní výsledky byly srovnatelné. U koncentrace 5 µg/ml byla průměrná hodnota absorbance 0,4928 se směrodatnou odchylkou ± 0,0529 (v případě vyhodnocení 4. den) a průměrná hodnota absorbance 0,4765 ± 0,0517 (v případě vyhodnocení 6. den). Tyto hodnoty se překrývají s kontrolním pokusem, a nelze tyto účinky považovat za statisticky průkazné. V ostatních koncentracích byl prokázán statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou a průměrnou hodnotou absorbance. V grafu 5 je opět patrná nejnižší absorbance a to u koncentrace 50 µg/ml. Ostatní koncentrace se pohybují v rozmezí absorbance 0,4458 až 0,4928 s velkou variabilitou směrodatných odchylek v případě vyhodnocení po 4 dnech. Ve vyhodnocení po 6 dnech (graf 6) je také patrná nejnižší absorbance a to opět u koncentrace

50 $\mu\text{g/ml}$. V ostatních koncentracích, až na koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$, je patrný nárůst absorban-
ce, se snižující se koncentrací. Při vyhodnocení po 4 a 6 dnech byla zjištěna účinnost PhC
na snižování proliferace při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ a více.

Graf 6: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorban-
ce, za přítomnosti extraktů
z *R. acetosa* 6. den (průměr \pm SD).



Tabulka 8: Vliv extraktů z *T. repens* na HaCaT (průměr \pm SD).

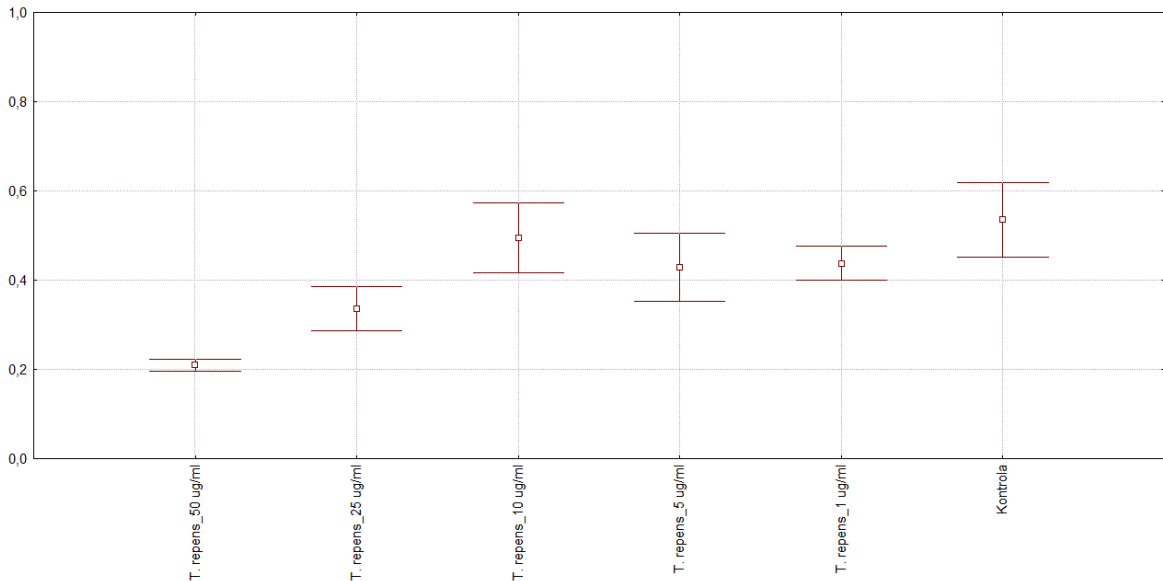
Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>T. repens</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,2098 \pm 0,0138 **	0,2070 \pm 0,0123 **
<i>T. repens</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,3370 \pm 0,0520 **	0,4738 \pm 0,0616
<i>T. repens</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,4948 \pm 0,0819	0,4654 \pm 0,0540
<i>T. repens</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,4293 \pm 0,0798 **	0,4388 \pm 0,0686
<i>T. repens</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,4376 \pm 0,0403 **	0,4516 \pm 0,0443
Kontrola	0,5352 \pm 0,0875 *	0,4602 \pm 0,0453 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazují průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **).

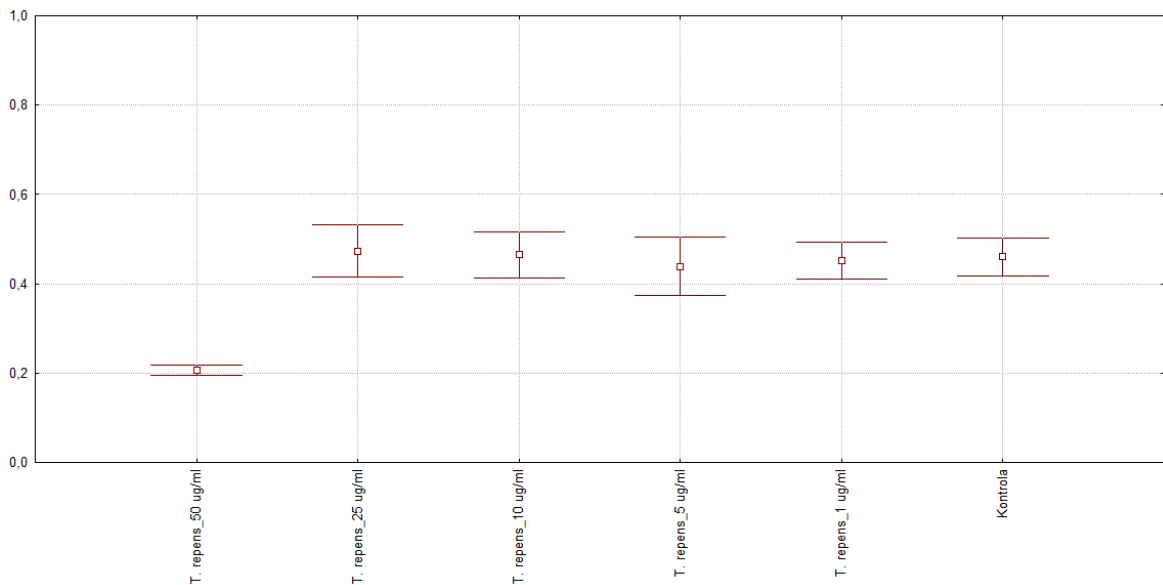
U vzorku květu *T. repens* byla kontrolní měření stejná jako pro předchozí květy, tedy opět se porovnávalo s průměrnou hodnotou absorban-
ce 0,5352 a směrodatnou odchylkou \pm 0,0875 (po 4 dnech). Při hodnocení po 6 dnech se porovnávalo s průměrnou hodnotou
absorbance 0,4602 a směrodatnou odchylkou \pm 0,0453 (viz. tabulka 8). Při hodnocení vý-
sledků po 4 dnech byla průměrná hodnota absorban-
ce *T. repens* v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ 0,4948 a vzorek při této koncentraci nenabyl statisticky průkazný rozdíl v porovnání
s kontrolním měřením. U koncentrací 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ byl zaznamenán ná-

rust absorbance oproti koncentracím 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$, kde byl zaznamenán pokles absorbance, jak je patrné v grafu 7. Vyšší koncentrace měly vyšší účinek a poměrně značně hodnoty ovlivnily. Nejvyšší koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ snížila absorbanci nejvíce a to na 0,2098 v průměru, s velmi malou směrodatnou odchylkou ($\pm 0,0138$).

Graf 7: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *T. repens* 4. den (průměr \pm SD).



Graf 8: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *T. repens* 6. den (průměr \pm SD).



Při vyhodnocení po 6 dnech byla u koncentrace *T. repens* 50 $\mu\text{g/ml}$ průměrná hodnota absorbance květu 0,2070 a vzorek při této koncentraci jako jediný nabyt statisticky průkazný

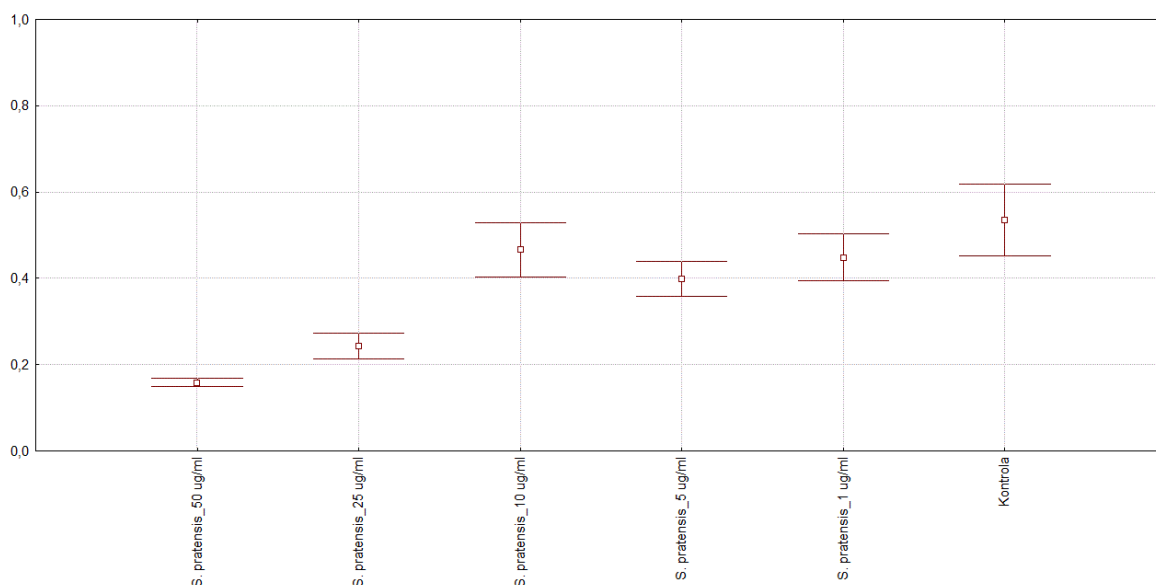
rozdíl oproti kontrole. U ostatních koncentrací nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením, jak je znázorněno v tabulce 8. Zatímco mezi koncentracemi 50 $\mu\text{g/ml}$ a 25 $\mu\text{g/ml}$ byl zaznamenán nárůst absorbance, tak u koncentrací 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ byl zaznamenán pokles absorbance, což je patrné z grafu 8. I v tomto případě nejvyšší koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ snížila absorbanci nejvíce a to na 0,2070 v průměru, s velmi malou směrodatnou odchylkou ($\pm 0,0123$). Obecně lze považovat koncentrace PhC nad 25 $\mu\text{g/ml}$ (při vyhodnocení po 4 dnech) a koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ (při vyhodnocení po 6 dnech) za statisticky významný vliv na proliferaci.

Tabulka 9: Vliv extraktů z *S.pratensis* na HaCaT (průměr \pm SD).

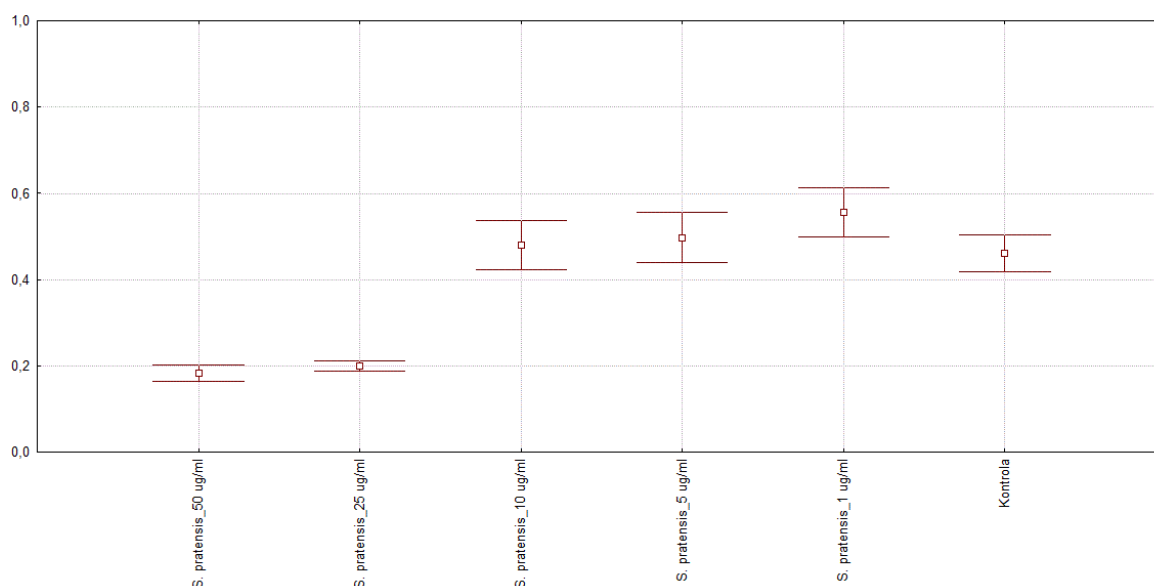
Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>S. pratensis</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,1590 \pm 0,0101 **	0,1827 \pm 0,0198 **
<i>S. pratensis</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,2437 \pm 0,0320 **	0,1991 \pm 0,0128 **
<i>S. pratensis</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,4662 \pm 0,0665 **	0,4789 \pm 0,0601
<i>S. pratensis</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,3992 \pm 0,0424 **	0,4975 \pm 0,0613 **
<i>S. pratensis</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,4488 \pm 0,0579 **	0,5550 \pm 0,0601 **
Kontrola	0,5352 \pm 0,0875 *	0,4602 \pm 0,0453 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazují průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **).

Graf 9: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. pratensis* 4. den (průměr \pm SD).



Graf 10: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. pratensis* 6. den (průměr \pm SD).



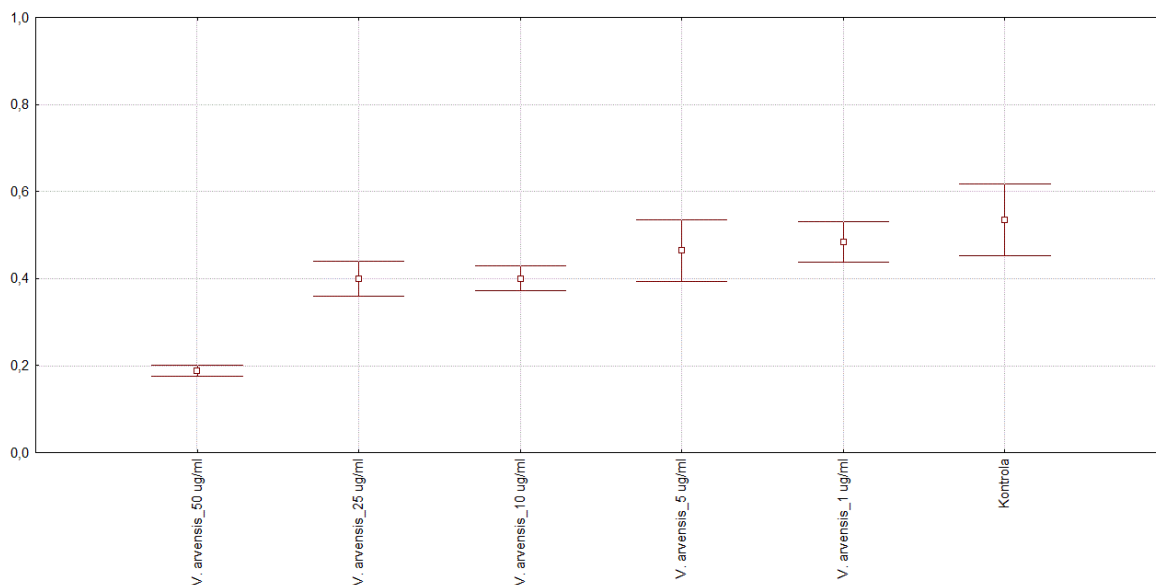
Nejnižší průměrné hodnoty proliferace byly po 4 dnech zjištěny u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ ($0,1590 \pm 0,0101$) se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0101$ (viz. tabulka 9). U všech koncentrací byl statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou ($0,5352 \pm 0,0875$) a průměrnou hodnotou absorbance. Zatímco u koncentrací 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ byl zaznamenán postupný nárůst absorbance, tak u koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ byla zaznamenána velká variabilita mezi měřeními. Z grafu 9 je patrné, že koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ snížila absorbanci nejvíce.

Při delším působení HaCaT buněk (6 dnů) byly nejnižší průměrné hodnoty proliferace zjištěny u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ ($0,1827 \pm 0,0198$) a koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ ($0,1991 \pm 0,128$). U těchto koncentrací, byl statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou ($0,4602 \pm 0,0453$) a průměrnou hodnotou absorbance. Stejně tak tomu bylo i u koncentrací 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$. Zatímco u koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole ($0,4789 \pm 0,0601$). Dále je z tabulky 9 zřetelné, že koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ a 25 $\mu\text{g/ml}$ snížily absorbanci nejvíce, a tudíž měly vyšší účinek na proliferaci. Obecně lze u *S. pratensis* vyjádřit statisticky významný vliv na proliferaci koncentrací PhC nad 1 $\mu\text{g/ml}$ po 4 dnech a koncentrace nad 25 $\mu\text{g/ml}$ po 6 dnech.

Tabulka 10: Vliv extraktů z *V. arvensis* na HaCaT (průměr ± SD).

Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>V. arvensis</i> 50 µg/ml	0,1883 ± 0,0125 **	0,2203 ± 0,0256 **
<i>V. arvensis</i> 25 µg/ml	0,3988 ± 0,0421 **	0,5376 ± 0,0401 **
<i>V. arvensis</i> 10 µg/ml	0,4006 ± 0,0294 **	0,5553 ± 0,0292 **
<i>V. arvensis</i> 5 µg/ml	0,4645 ± 0,0746	0,5494 ± 0,0425 **
<i>V. arvensis</i> 1 µg/ml	0,4848 ± 0,0488	0,5275 ± 0,0175 **
Kontrola	0,5352 ± 0,0875 *	0,4602 ± 0,0453 *

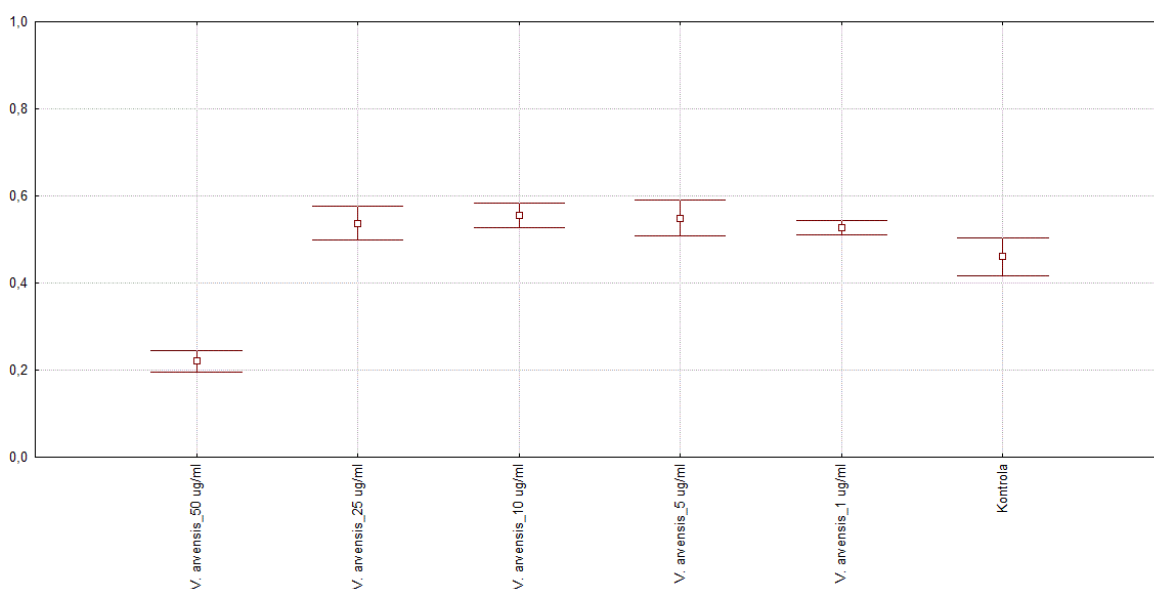
Hodnoty s rozdílnými indexy vykazují průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **).

Graf 11: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *V. arvensis* 4. den (průměr ± SD).

Posledním zkoumaným květem byl *V. arvensis*. U nejvyšší koncentrace 50 µg/ml byla zjištěna nejnižší absorbance s velmi malou směrodatnou odchylkou, a to v obou dnech vyhodnocení (viz. tabulka 10). Při vyhodnocení po 4 dnech byla u koncentrace 5 µg/ml průměrná hodnota absorbance 0,4645 se směrodatnou odchylkou ± 0,0746 a u koncentrace 1 µg/ml byla průměrná hodnota absorbance 0,4848 se směrodatnou odchylkou ± 0,0488. Tyto hodnoty se překrývají s kontrolním měřením (0,5352 ± 0,0875), a proto se tyto účinky nepovažují za statisticky průkazné. V ostatních koncentracích byl prokázán statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením. V grafu 11 je opět patrná nejnižší absorbance a to u koncentrace 50 µg/ml. Ostatní koncentrace se pohybují v rozmezí absorbance 0,3988 až 0,4848 s různou variabilitou směrodatných odchylek. Z grafu dále vyplývá, že se snižující se koncentrací se zvyšuje absorbance. U všech koncentrací, při vyhodnocení po

6 dnech, byl prokázán statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením ($0,4602 \pm 0,0453$). V grafu 12 je vidět nejnižší absorbance a to u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$. Ostatní koncentrace se pohybují v rozmezí absorbance 0,5275 až 0,5553. Z grafu je dále patrné, že se snižující se koncentrací se postupně zvyšovala absorbance (až po koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$), kdy od této koncentrace došlo k poklesu absorbance. Za statisticky významný vliv na proliferaci lze považovat koncentrace PhC větší než 10 $\mu\text{g/ml}$ po 4 dnech a koncentrace vyšší než 1 $\mu\text{g/ml}$ po 6 dnech.

Graf 12: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *V. arvensis* 6. den (průměr \pm SD).



8.2 Vliv polyfenolů na lidské hepatocyty

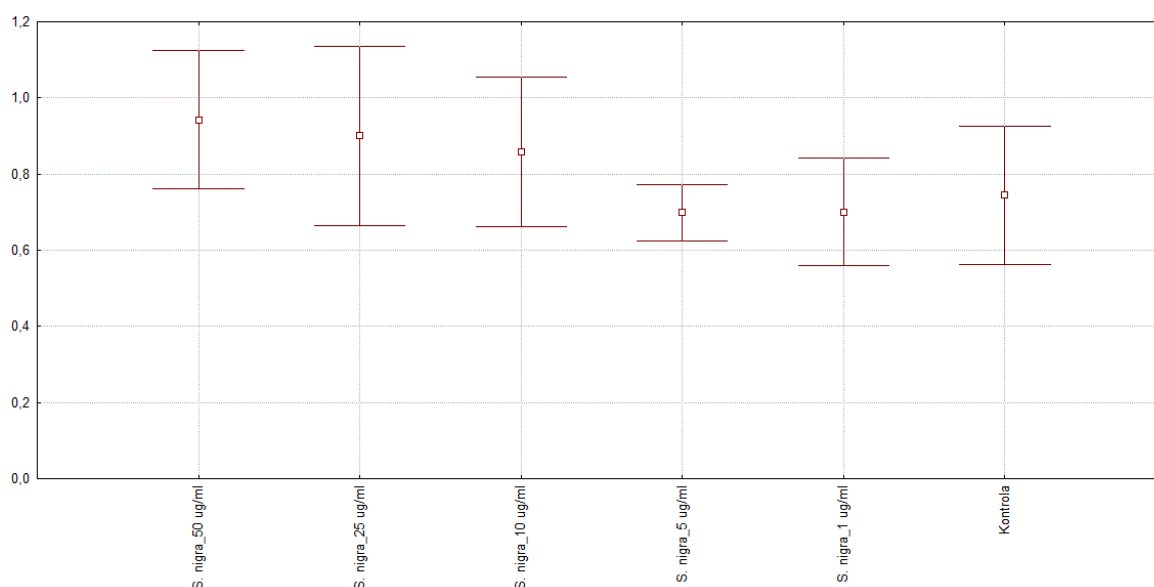
V následujících grafech (graf 13- graf 24) byla posuzována absorbance u stejných jedlých květů jako u HaCaT. V tomto případě byly použity hepatocyty (HepG2, ATCC HB-8065). Tabulky (tabulka 11- tabulka 16) s koncentrací jednotlivých květů, představují statisticky průkazné rozdíly mezi průměrnou kontrolní hodnotou absorbance a průměrnou hodnotou absorbance jednotlivých květů. V měření pro HepG2 je průměrná kontrolní hodnota absorbance 0,7443 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,1920$, pro vyhodnocení po 7 dnech. V případě vyhodnocení po 11 dnech je průměrná kontrolní hodnota absorbance 0,5662 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0135$.

Tabulka 11: Vliv extraktů z *S. nigra* na HepG2 (průměr ± SD).

Koncentrace <i>PhC</i>	7. den	11. den
<i>S. nigra</i> 50 µg/ml	0,9430 ± 0,1903 **	0,4741 ± 0,0470 **
<i>S. nigra</i> 25 µg/ml	0,9004 ± 0,2484 **	0,5605 ± 0,0821
<i>S. nigra</i> 10 µg/ml	0,8575 ± 0,2064	0,4765 ± 0,0696 **
<i>S. nigra</i> 5 µg/ml	0,6993 ± 0,0779	0,4648 ± 0,0596 **
<i>S. nigra</i> 1 µg/ml	0,7008 ± 0,1497	0,4847 ± 0,0927 **
Kontrola	0,7443 ± 0,1920 *	0,5662 ± 0,0135 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazují průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **).

Graf 13: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. nigra* 7. den (průměr ± SD).

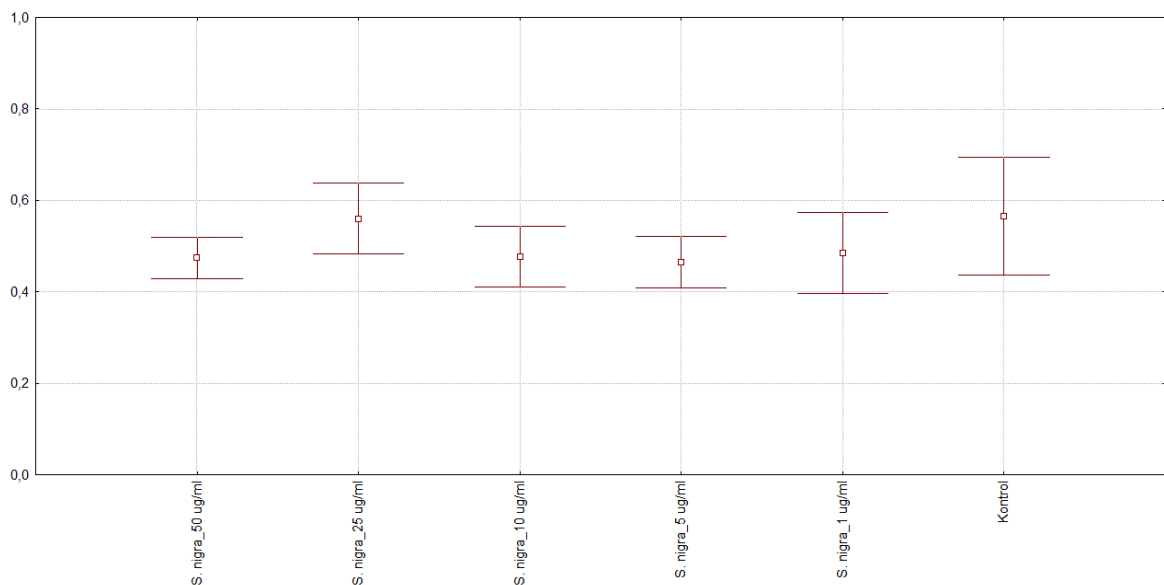


Vlivy extraktu *S. nigra* na HepG2 jsou znázorněny v tabulce 11. Při vyhodnocení po 7 dnech byla u koncentrace 10 µg/ml průměrná hodnota absorbance 0,8575 se nou odchylkou ± 0,2064, u koncentrace 5 µg/ml byla průměrná hodnota absorbance 0,6993 se směrodatnou odchylkou ± 0,0779, a u koncentrace 1 µg/ml byla průměrná hodnota absorbance 0,7008 se směrodatnou odchylkou ± 0,1497. Tyto hodnoty a jejich směrodatné odchylky se překrývají s kontrolním měřením (0,7443 ± 0,1920), a proto se tyto účinky nepovažují za statisticky průkazné. U zbylých koncentrací (50 µg/ml a 25 µg/ml) je ticky průkazný rozdíl oproti kontrolnímu měření. V porovnání s kontrolou je z grafu 13 opět patrné, že u koncentrací *S. nigra* 50 µg/ml, 25 µg/ml a 10 µg/ml je velké rozpětí rodatné odchylky mezi měřeními, což mohlo být způsobeno špatnou přípravou vzorku,

nebo chybou při měření. Avšak všechny koncentrace se pohybují v rozmezí absorbance 0,6993 až 0,9430. Z grafu 13 je dále patrné, že se snižující se koncentrací se snižuje absorbance.

Vyhodnocení po 11 dnech je opět znázorněno v tabulce 11. Ve srovnání s kontrolou měly všechny koncentrace, výjimkou koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$, statisticky průkazný rozdíl. U přídávku 25 $\mu\text{g/ml}$ koncentrace PhC se výsledky pohybovaly v mezích kontrolního pokusu $0,5662 \pm 0,0135$. U všech koncentrací PhC (výjimkou koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ a 5 $\mu\text{g/ml}$) se, se snižující koncentrací postupně absorbance zvyšovala. Všechny tyto koncentrace se pohybovaly v podobném rozmezí absorbance, a to 0,4741 až 0,4847 s poměrně stejnými směrodatnými odchylkami a vykazovaly podobnou účinnost, což je patrné z grafu 14. Za statisticky významný vliv na proliferaci lze považovat koncentrace PhC nad 25 $\mu\text{g/ml}$ po 7 dnech a koncentrace vyšší než 50 $\mu\text{g/ml}$ po 11 dnech.

Graf 14: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. nigra* 11. den (průměr \pm SD).



Tabulka 12: Vliv extraktů z *A. schoenoprasum* na HepG2 (průměr ± SD).

Koncentrace PhC	7. den	11. den
<i>A. schoenoprasum</i> 50 µg/ml	0,1630 ± 0,0074 **	0,2673 ± 0,0253 **
<i>A. schoenoprasum</i> 25 µg/ml	0,3743 ± 0,0499 **	0,3142 ± 0,0140 **
<i>A. schoenoprasum</i> 10 µg/ml	0,5204 ± 0,0779 **	0,5792 ± 0,0387
<i>A. schoenoprasum</i> 5 µg/ml	0,7865 ± 0,0628	0,4813 ± 0,0654 **
<i>A. schoenoprasum</i> 1 µg/ml	0,8038 ± 0,0626	0,5714 ± 0,0527
Kontrola	0,7443 ± 0,1920 *	0,5662 ± 0,0135 *

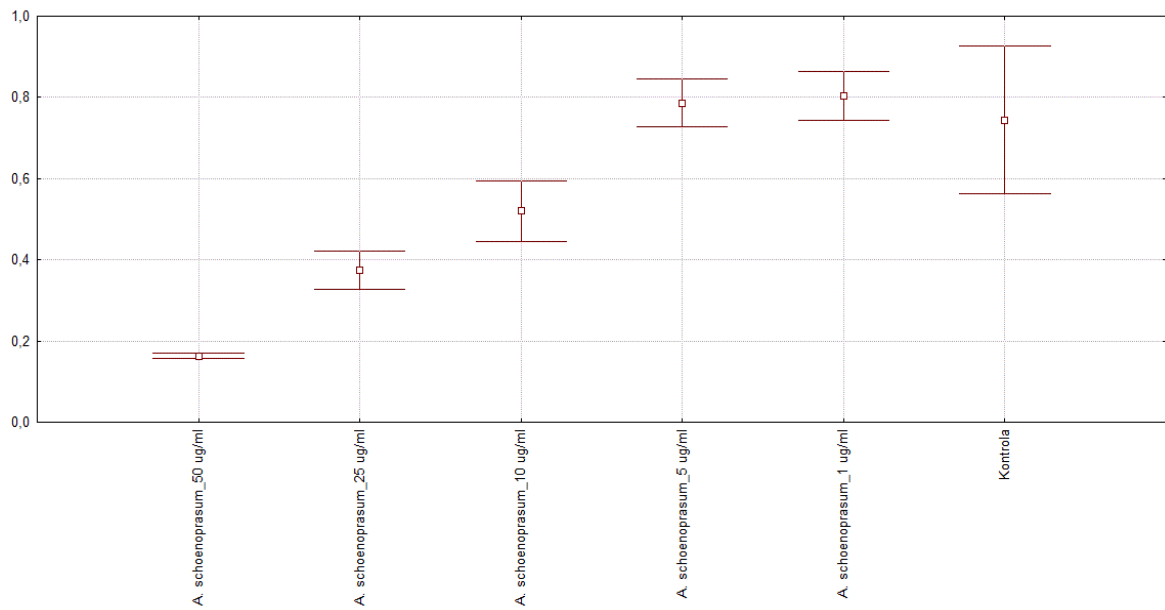
Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

Nejnižší průměrné hodnoty proliferace HepG2 u *A. schoenoprasum* po 7 dnech byly zjištěny u koncentrace 50 µg/ml (0,1630) s velmi malou směrodatnou odchylkou ± 0,0074 (viz. graf 15). Při této koncentraci je statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením. Velká podobnost účinnosti PhC je u koncentrací 5 µg/ml a 1 µg/ml. Při koncentraci

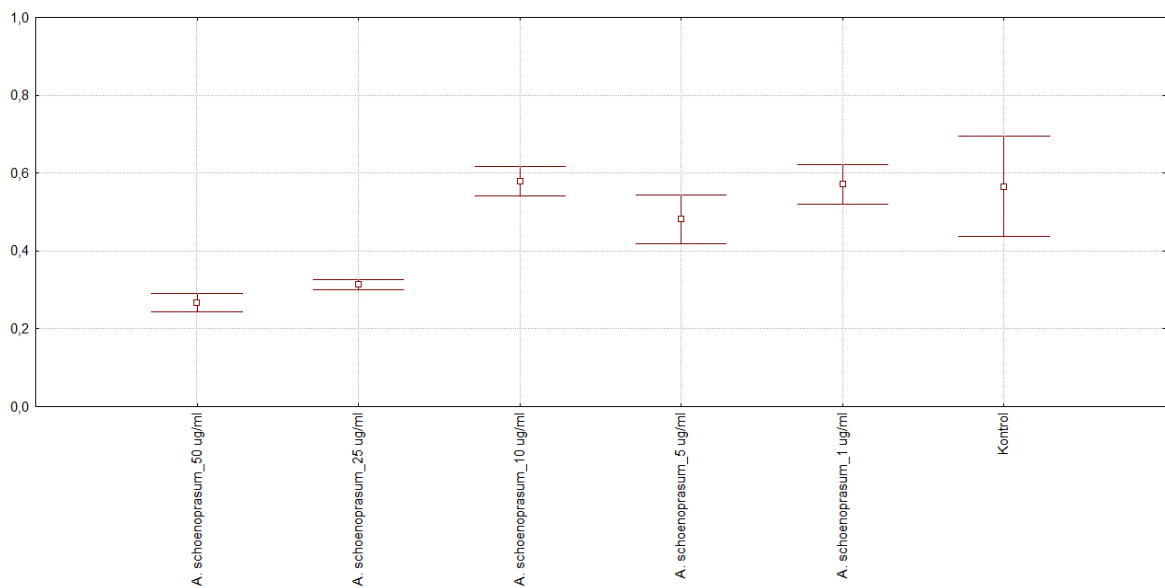
1 µg/ml byla zaznamenána nejvyšší absorbance a to 0,8038 se směrodatnou odchylkou ± 0,0626. Z grafu 15 je patrné, že se snižující se koncentrací stoupá absorbance v extraktu květu.

U hodnocení vzorku *A. schoenoprasum* po 11 dnech je vliv PhC na HepG2 buňky znázorněn v tabulce 12. Nejnižší absorbance byla naměřena u nejvyšších koncentrací, a to 50 µg/ml (0,2673 ± 0,0253) a koncentrace 25 µg/ml (0,3142 ± 0,0140). U obou těchto koncentrací byl statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole, stejně jako u koncentrace 5 µg/ml (0,4813 ± 0,0654). U koncentrací 10 µg/ml a 1 µg/ml nebyl shledán statisticky průkazný rozdíl mezi extraktem z květu a kontrolním vzorkem, u kterého byla absorbance 0,5562 se směrodatnou odchylkou 0,0135. Z grafu 16 je opět patrný vyšší účinek polyfenolů při koncentracích 50 µg/ml a 25 µg/ml, a lze je považovat za statisticky významně účinné na proliferaci. Obecně lze u *A. schoenoprasum* vyjádřit statisticky významný vliv na proliferaci koncentrace PhC nad 10 µg/ml po 7 dnech a koncentrace nad 25 µg/ml po 11 dnech.

Graf 15: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *A. schoenoprasum* 7. den (průměr \pm SD).



Graf 16: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *A. schoenoprasum* 11. den (průměr \pm SD).



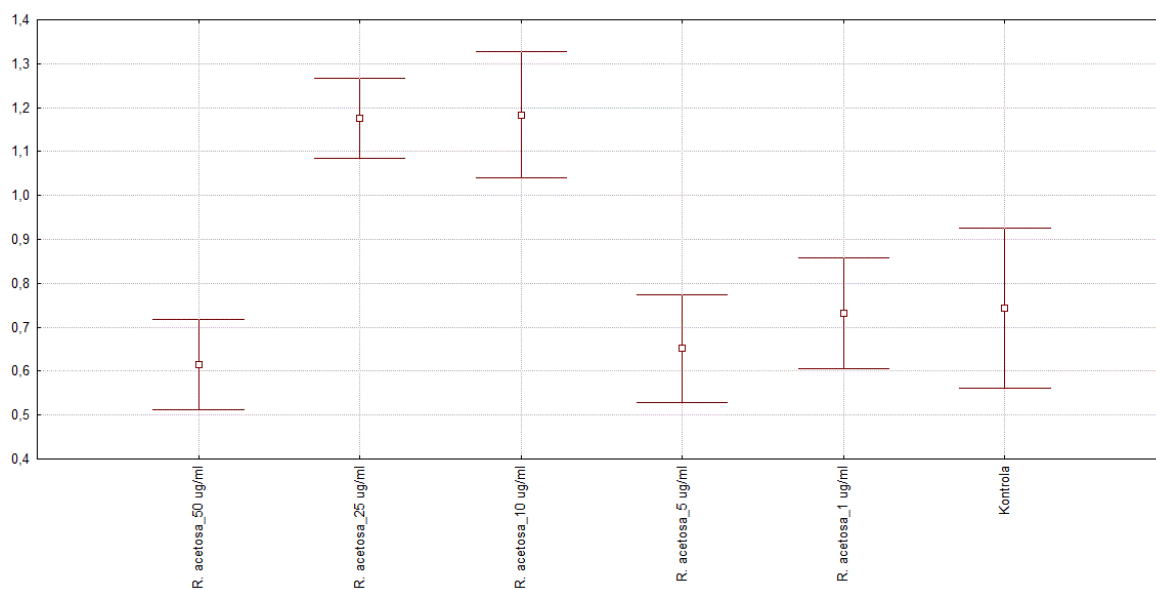
Tabulka 13: Vliv extraktů z *R. acetosa* na HepG2 (průměr ± SD).

Koncentrace PhC	7. den	11. den
<i>R. acetosa</i> 50 µg/ml	0,6154 ± 0,1074 **	0,5351 ± 0,0676
<i>R. acetosa</i> 25 µg/ml	1,1760 ± 0,0954 **	0,5239 ± 0,0730
<i>R. acetosa</i> 10 µg/ml	1,1838 ± 0,1507 **	0,5055 ± 0,0292
<i>R. acetosa</i> 5 µg/ml	0,6516 ± 0,1284	0,4810 ± 0,0591 **
<i>R. acetosa</i> 1 µg/ml	0,7328 ± 0,1328	0,4085 ± 0,0303 **
Kontrola	0,7443 ± 0,1920 *	0,5662 ± 0,0135 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

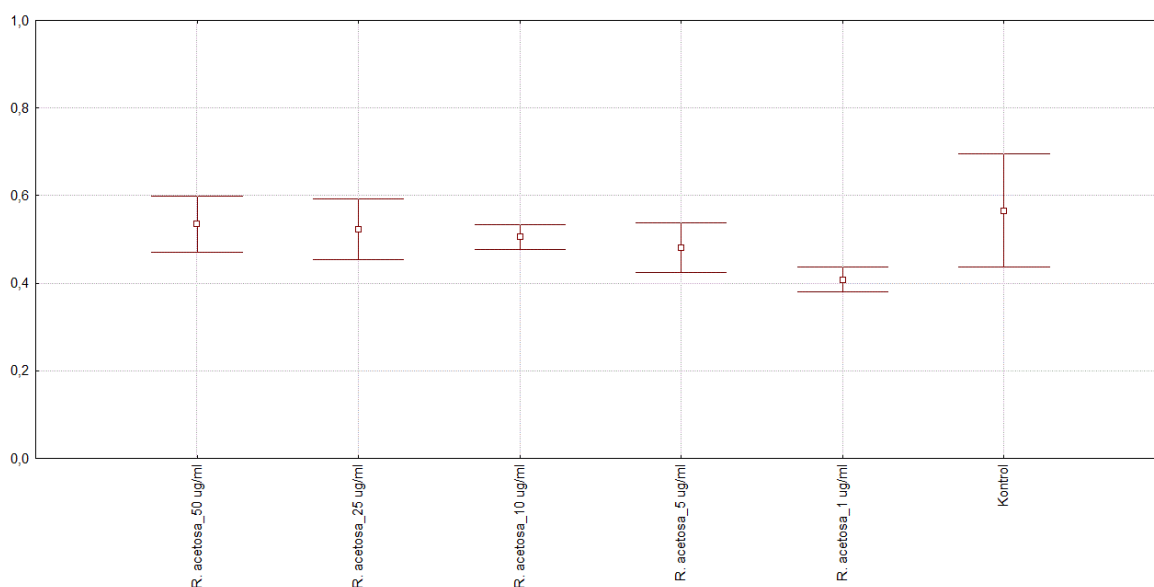
Při hodnocení *R. acetosa* po 7 dnech je z tabulky 13 patrný statisticky průkazný rozdíl koncentrací PhC 50 µg/ml, 25 µg/ml a 10 µg/ml v porovnání s kontrolním měřením. Při koncentracích PhC 5 µg/ml, s průměrnou absorbancí 0,6516, a u koncentrace 1 µg/ml, s průměrnou absorbancí 0,7328, se absorbance pohybovala v rozmezí 0,7443 ± 0,1920, a tudíž vzorek při těchto koncentracích nenabyl statisticky průkazný rozdíl. Zatímco u koncentrací 50 µg/ml, 5 µg/ml a 1 µg/ml se absorbance pohybuje v rozmezí 0,6154 až 0,7328, tak u koncentrací 25 µg/ml a 10 µg/ml byl zaznamenán velký nárůst absorbance (1,1760 a 1,1838) a tudíž extrakt v těchto koncentracích výrazně ovlivnil průběh proliferace. Velká variabilita mezi měřeními mohla být způsobena špatným měřením nebo špatně připraveným vzorkem.

Graf 17: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *R. acetosa* 7. den (průměr ± SD).



V případě vyhodnocení po 11 dnech nebyl u nejvyšších koncentrací (50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$) shledán statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole. Zatímco u koncentrací 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ byl shledán statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením. Všechny výsledky byly poměrně srovnatelné, jelikož jejich absorbance se pohybovala v rozmezí 0,4085 až 0,5351. Z grafu 18 je patrná srovnatelnost všech koncentrací. Velkou podobu představují koncentrace PhC 50 $\mu\text{g/ml}$ ($0,5351 \pm 0,0676$) a koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ ($0,5239 \pm 0,0730$). Z grafu je dále patrné, že se snižující se koncentrací se snižuje i absorbance, z čehož vyplývá, že čím nižší koncentrace, tím nižší antiproliferační efekt.

Graf 18: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *R. acetosa* 11. den (průměr \pm SD).



Tabulka 14: Vliv extraktů z *T. repens* na HepG2 (průměr \pm SD).

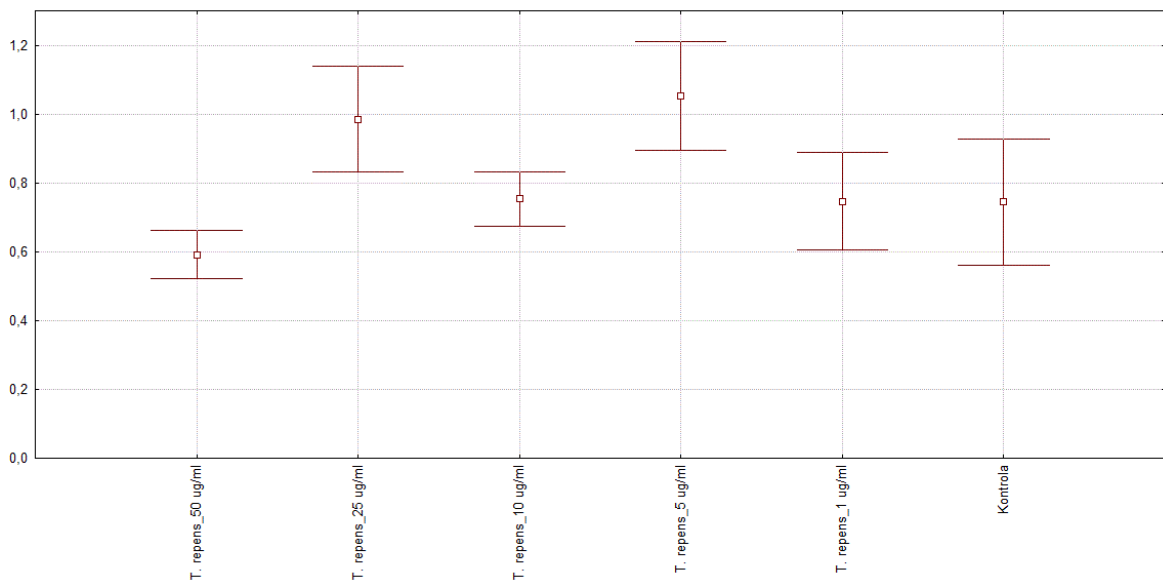
Koncentrace PhC	7. den	11. den
<i>T. repens</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,5917 \pm 0,0739 **	0,2703 \pm 0,0089 **
<i>T. repens</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,9853 \pm 0,1616 **	0,4951 \pm 0,0562 **
<i>T. repens</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,7533 \pm 0,0834	0,4747 \pm 0,0295 **
<i>T. repens</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	1,0525 \pm 0,1666 **	0,4989 \pm 0,0755
<i>T. repens</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,7468 \pm 0,1483	0,4475 \pm 0,0433 **
Kontrola	0,7443 \pm 0,1920 *	0,5662 \pm 0,0135 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

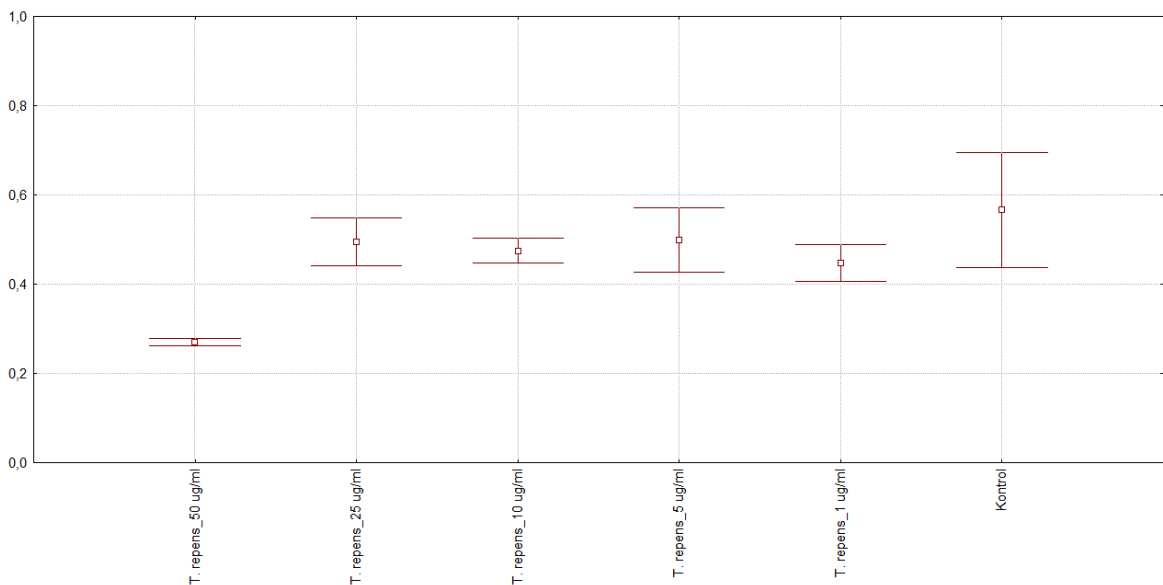
U koncentrace PhC 10 $\mu\text{g/ml}$ byla průměrná absorbance 0,7533, což se překrývá s kontrolním měřením $0,7443 \pm 0,1920$, a tudíž vzorek při této koncentraci nenabyl statis-

ticky průkazný rozdíl (tabulka 14). Stejně tomu tak bylo i u koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ ($0,7468 \pm 0,1483$). U zbylých koncentrací, které se pohybují v rozmezí absorbance 0,5917 až 0,7533 byl statisticky průkazný rozdíl. Z grafu 19 jsou patrné výkyvy u koncentrací 25 $\mu\text{g/ml}$ a 5 $\mu\text{g/ml}$, které hodnoty absorbance ovlivnily. Tyto hodnoty byly zaznamenány po 7 dnech.

Graf 19: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *T. repens* 7. den (průměr \pm SD).



Graf 20: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *T. repens* 11. den (průměr \pm SD).



Nejnižší průměrné hodnoty proliferace HepG2 po 11 dnech, byly zjištěny u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,2703) s velmi malou směrodatnou odchylkou $\pm 0,0089$ (viz. Graf 20). V této koncentraci absorbance dosahují statisticky průkazný rozdíl, stejně jako u koncentrací 25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$, což je znázorněno v tabulce 14. Koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ již měla vyšší účinek a poměrně hodnoty absorbance ovlivnila. Velká podobnost účinnosti PhC je u koncentrací 25 $\mu\text{g/ml}$ a 5 $\mu\text{g/ml}$ (viz. graf 20). Obecně lze u *T. repens* vyjádřit statisticky významný vliv na proliferaci koncentrací PhC nad 25 $\mu\text{g/ml}$ po 7 dnech a koncentrace vyšší než 10 $\mu\text{g/ml}$ po 11 dnech.

Tabulka 15: Vliv extraktů z *S. pratensis* na HepG2 (průměr \pm SD).

Koncentrace PhC	7. den	11. den
<i>S. pratensis</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,5457 \pm 0,0807 **	0,2863 \pm 0,0098 **
<i>S. pratensis</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,8984 \pm 0,0467 **	0,4976 \pm 0,0783 **
<i>S. pratensis</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,8876 \pm 0,0548	0,5146 \pm 0,0820
<i>S. pratensis</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,5969 \pm 0,0581 **	0,4318 \pm 0,0299 **
<i>S. pratensis</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,8520 \pm 0,0364	0,4113 \pm 0,0225 **
Kontrola	0,7443 \pm 0,1920 *	0,5662 \pm 0,0135 *

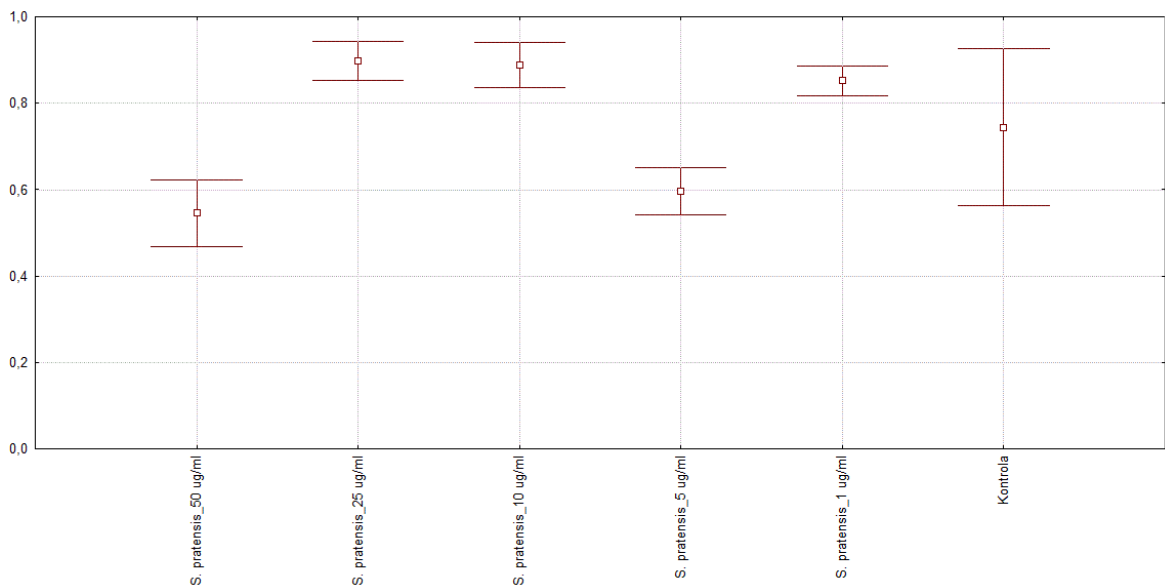
Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

U vzorku květu *S. pratensis* bylo kontrolní měření stejné jako pro předchozí květy, tedy opět se porovnávalo s průměrnou hodnotou absorbance 0,7443 a směrodatnou odchylkou $\pm 0,1920$ (v případě vyhodnocení po 7 dnech), a průměrnou hodnotou absorbance 0,5662 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0135$ (při vyhodnocení po 11 dnech). Nejnižší průměrné hodnoty proliferace po 7 dnech byly zjištěny u koncentrace PhC 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,5457) se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0807$ (viz. tabulka 15). Při této koncentraci, a dále při koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$ a 5 $\mu\text{g/ml}$ byl statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou a průměrnou hodnotou květu. U zbylých koncentrací nebyl statisticky průkazný rozdíl. Z grafu 21 je patrné, že podobnou účinnost mají koncentrace PhC 50 $\mu\text{g/ml}$ a 5 $\mu\text{g/ml}$. Další velká podobnost je u koncentrací 25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$, které vykazovaly nejvyšší absorbanci, ale statisticky průkazná v porovnání s kontrolním měřením byla jen koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$.

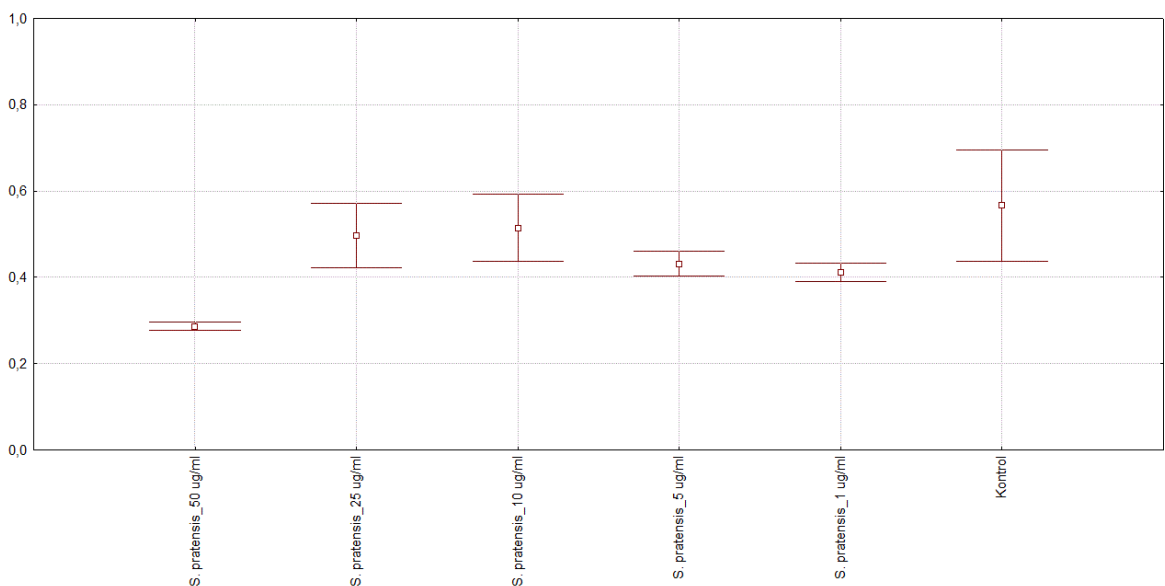
Při vyhodnocení po 11 dnech byly nejnižší průměrné hodnoty proliferace zjištěny u koncentrace PhC 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,2863) s velmi malou směrodatnou odchylkou $\pm 0,0098$, což můžeme považovat za velmi přesný výsledek (tabulka 15). U koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou (0,5662 \pm 0,0135)

a průměrnou hodnotou absorbance. Zatímco u koncentrací zbylých koncentrací byl menán statisticky průkazný rozdíl. Z grafu 22 vyplývá, že koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ snížila absorbanci nejvíce. Dále je z grafu patrné, že absorbance u jednotlivých koncentrací nejprve stoupala, a poté (od koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$) začala klesat. Při vyhodnocení v obou dnech lze za statisticky významný vliv na proliferaci považovat koncentrace nad 25 $\mu\text{g/ml}$.

Graf 21: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. pretensis* 7. den (průměr \pm SD).



Graf 22: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. pretensis* 11. den (průměr \pm SD).



Tabulka 16: Vliv extraktů z *V. arvensis* na HepG2 (průměr ± SD).

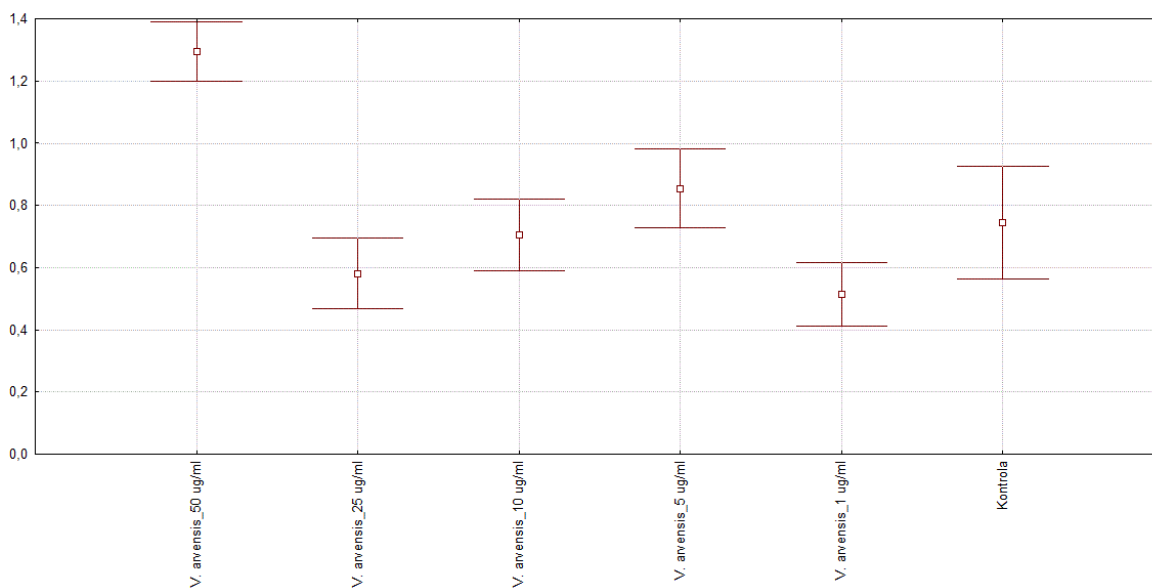
Koncentrace PhC	7. den	11. den
<i>V. arvensis</i> 50 µg/ml	1,2953 ± 0,1011 **	0,6150 ± 0,0547
<i>V. arvensis</i> 25 µg/ml	0,5809 ± 0,1205 **	0,5495 ± 0,0648
<i>V. arvensis</i> 10 µg/ml	0,7052 ± 0,1214	0,4803 ± 0,0558 **
<i>V. arvensis</i> 5 µg/ml	0,8543 ± 0,1340 **	0,5347 ± 0,0721
<i>V. arvensis</i> 1 µg/ml	0,5136 ± 0,1077 **	0,4933 ± 0,0414 **
Kontrola	0,7443 ± 0,1920 *	0,5662 ± 0,0135 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

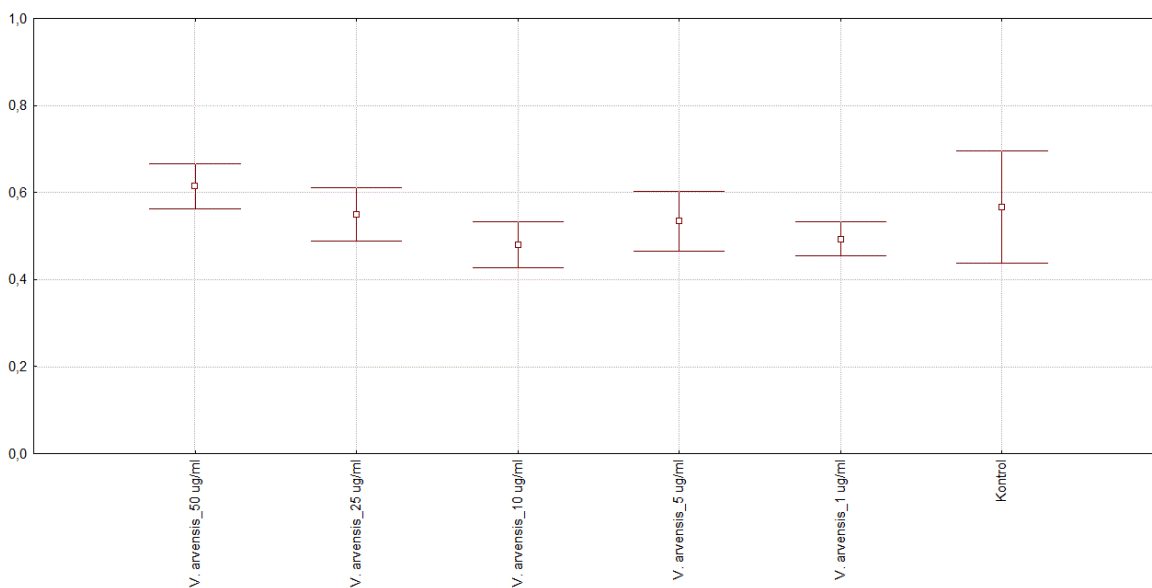
Jako poslední zkoumaný květ, na působení HepG2, byl vybrán *V. arvensis*. Při hodnocení po 7 dnech byla u nejvyšší koncentrace 50 µg/ml zjištěna nejvyšší absorbance 1,2953 se směrodatnou odchylkou ± 0,1011 (viz. tabulka 16). U následujících nižších koncentrací 25 µg/ml, 10 µg/ml a 5 µg/ml se absorbance postupně zvyšovala, zatímco u koncentrace 1 µg/ml absorbance poklesla na 0,5136. U koncentrace 10 µg/ml byla průměrná hodnota absorbance 0,7052 se směrodatnou odchylkou ± 0,1214. Tato hodnota se překrývá s kontrolním měřením, a proto se tento účinek nepovažuje za statisticky průkazný. V ostatních koncentracích byl prokázán statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole. Z grafu 23 je patrná nejvyšší absorbance a to u koncentrace 50 µg/ml. Tato koncentrace se dá považovat za špatně připravenou, nebo se zde prokázala účinnost polyfenolů z extraktu květu *V. arvensis* jen při určitých koncentracích. Ostatní koncentrace se pohybují v rozmezí absorbance 0,5136 až 0,8543 s různou variabilitou směrodatných odchylek.

Při hodnocení po 11 dnech byl statisticky průkazný rozdíl zaznamenán u koncentrace 10 µg/ml, kde byla průměrná hodnota absorbance naměřena 0,4803 se směrodatnou odchylkou ± 0,0558, a u koncentrace 1 µg/ml s průměrnou absorbancí 0,4933 a se směrodatnou odchylkou ± 0,0414. U ostatních koncentrací nebyl shledán statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením, jak je znázorněno v tabulce 16. Z grafu 24 jsou patrné srovnatelné výsledky u všech koncentrací, včetně jejich směrodatných odchylek. Jejich absorbance se pohybuje v rozmezí 0,4933 až 0,6150. Největší srovnatelnost byla zaznamenána u koncentrace 10 µg/ml (0,4803 ± 0,0558) a koncentrace 1 µg/ml (0,4933 ± 0,0414). Obecně lze u *V. arvensis* vyjádřit statisticky významný vliv na proliferaci po 7 dnech všechny koncentraci PhC, výjimkou koncentrace 10 µg/ml.

Graf 23: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *V. arvensis* 7. den (průměr \pm SD).



Graf 24: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *V. arvensis* 11. den (průměr \pm SD).



8.3 Vliv polyfenolů na myší fibroblasty

Grafy (graf 25 – graf 36), extrahovaných PhC z daných květů na NIH/3T3 linie (ATCC CRL- 1658), ukazují absorbanci MTT vyjadřující počet buněk, v porovnání s kontrolním vzorkem, na kterém je vidět volný růst buněk. Míra absorbance zároveň znázorňuje míru proliferace. V měření pro NIH/3T3 po 4 dnech je průměrná kontrolní hodnota absorbance

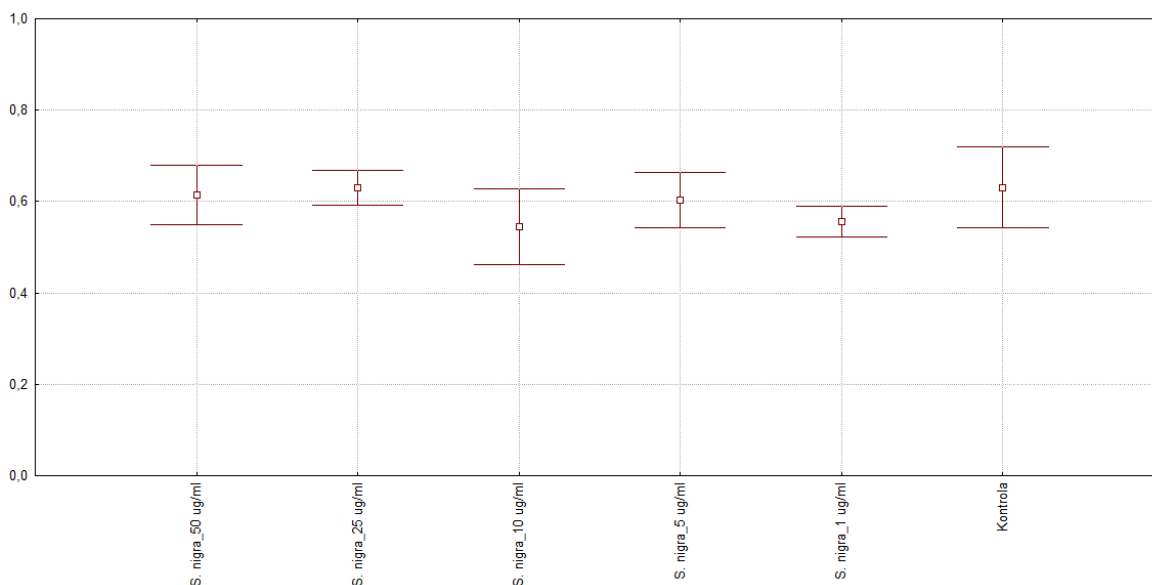
0,6306 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0932$, a po 6 dnech je průměrná hodnota absorbance 0,8083 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,1014$ (tabulka 17- tabulka 22).

Tabulka 17: Vliv extraktů z *S. nigra* na NIH/3T3 (průměr \pm SD).

Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>S. nigra</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,6147 \pm 0,0675	0,6083 \pm 0,0234 **
<i>S. nigra</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,6306 \pm 0,0403	0,5978 \pm 0,0537 **
<i>S. nigra</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,5451 \pm 0,0872 **	0,5818 \pm 0,0491 **
<i>S. nigra</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,6023 \pm 0,0637	0,5326 \pm 0,0342 **
<i>S. nigra</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,5561 \pm 0,0346 **	0,6048 \pm 0,0429 **
Kontrola	0,6306 \pm 0,0932 *	0,8083 \pm 0,1014 *

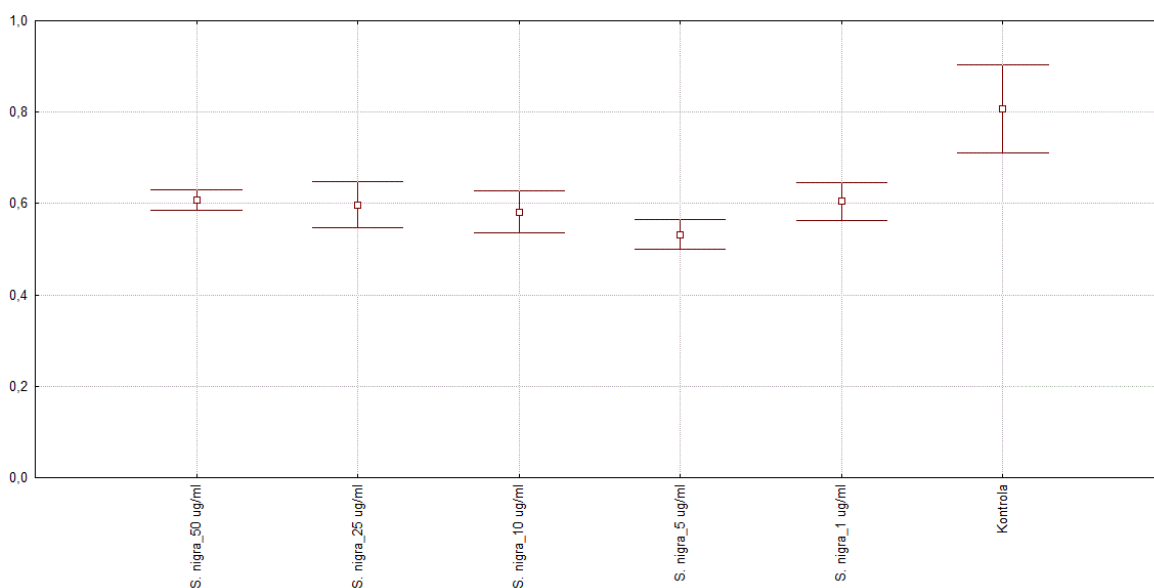
Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

Graf 25: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. nigra* 4. den (průměr \pm SD).



V tabulce 17 je znázorněn vliv extraktů z *S. nigra* na NIH/3T3 buňky po 4 a 6 dnech. Při hodnocení po 4 dnech byl při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením. Ostatní koncentrace (50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ a 5 $\mu\text{g/ml}$) byly srovnatelné, a to v rozmezí absorbance 0,6023 až 0,6306. Z grafu 25 je patrné, že všechny hodnoty absorbance se pohybují v rozmezí kontrolního měření a tak se nedá říci, že by tyto koncentrace měly vliv na proliferaci. Celkově byly i směrodatné odchylky různé u všech koncentrací.

Graf 26: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. nigra* 6. den (průměr ± SD).



Při hodnocení po 6 dnech je z tabulky 17 patrné, že při všech koncentracích byl statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním vzorkem a průměrnou hodnotou absorbance $0,8083 \pm 0,1014$. Z grafu 26 je patrné, že se snižující se koncentrací PhC, se snižuje i absorbance. Vyjimku tvoří koncentrace $1 \mu\text{g/ml}$ ($0,6048 \pm 0,0429$), při které začala absorbance opět stoupat. Všechny hodnoty absorbance se pohybují v poměrně stejném rozpětí, a to $0,5326$ až $0,6083$. Nejnižší průměrná absorbance byla naměřena u koncentrace $5 \mu\text{g/ml}$ ($0,5326$) a za statisticky významný vliv na proliferaci se dají považovat všechny koncentrace vyšší než $1 \mu\text{g/ml}$ po 6 denním působení NIH/3T3.

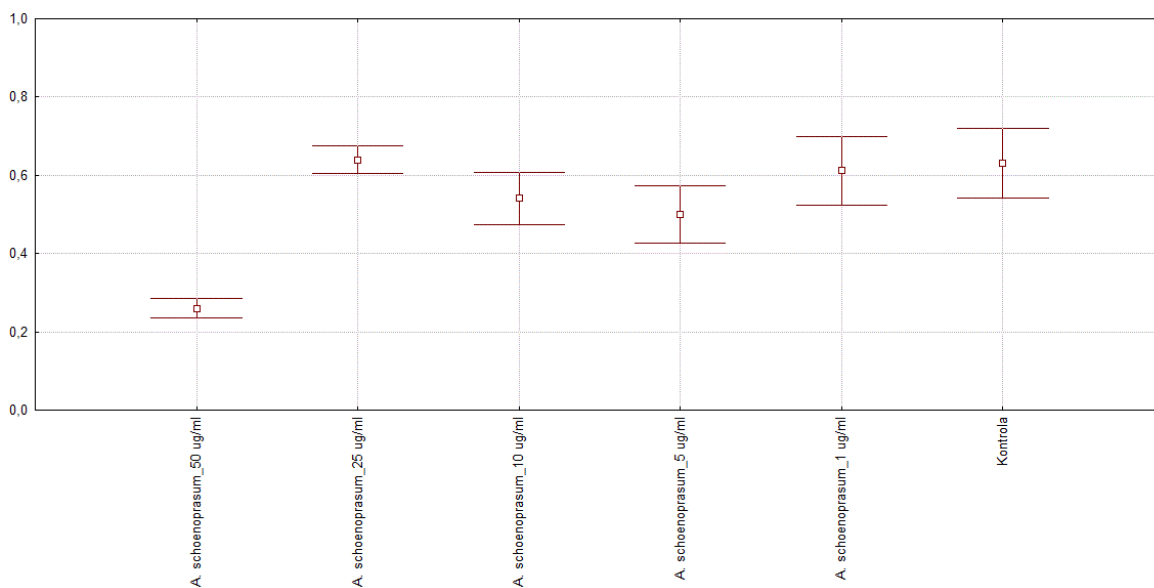
Tabulka 18: Vliv extraktů z *A. schoenoprasum* na NIH/3T3 (průměr ± SD).

Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>A. schoenoprasum</i> 50 µg/ml	$0,2603 \pm 0,0267$ **	$0,2258 \pm 0,0141$ **
<i>A. schoenoprasum</i> 25 µg/ml	$0,6401 \pm 0,0377$	$0,6058 \pm 0,0614$ **
<i>A. schoenoprasum</i> 10 µg/ml	$0,5416 \pm 0,0707$ **	$0,5330 \pm 0,0301$ **
<i>A. schoenoprasum</i> 5 µg/ml	$0,5008 \pm 0,0770$ **	$0,5513 \pm 0,0333$ **
<i>A. schoenoprasum</i> 1 µg/ml	$0,6116 \pm 0,0922$	$0,5533 \pm 0,0419$ **
Kontrola	$0,6306 \pm 0,0932$ *	$0,8083 \pm 0,1014$ *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

U vzorku *A. schoenoprasum* je v tabulce 18 popsán vliv extraktů z tohoto květu na NIH/3T3 buňky. U nejvyšší koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ byla zjištěna nejnižší absorbance, a to při vyhodnocení 4. den ($0,2603 \pm 0,0267$) i 6. den ($0,2258 \pm 0,0141$). U koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$ byla průměrná hodnota absorbance 0,6401 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0377$ a u koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$ byla průměrná hodnota absorbance 0,6116 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0922$. Tyto hodnoty absorbance se překrývají s kontrolním měřením, a proto se tyto účinky nepovažují za statisticky průkazné. V ostatních koncentracích byl prokázán statisticky průkazný rozdíl. V grafu 27 je patrná nejnižší absorbance, a to u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$. Ostatní koncentrace se pohybují v rozmezí absorbance 0,5058 až 0,6401 s velkou variabilitou směrodatných odchylek. Tyto hodnoty byly zaznamenány po 4 dnech působení NIH/3T3.

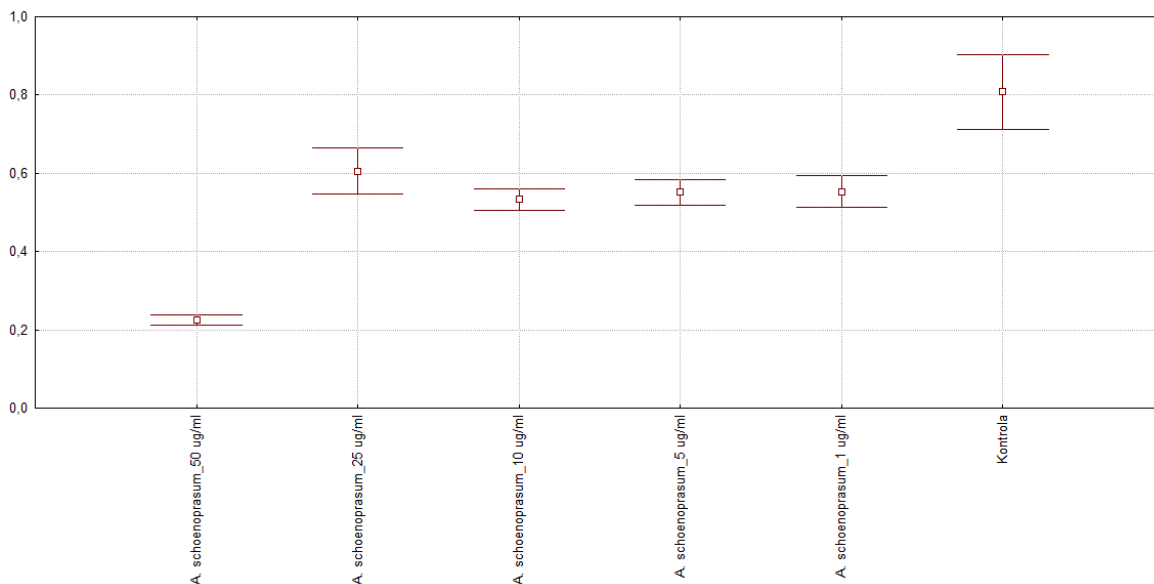
Graf 27: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *A. schoenoprasum* 4. den (průměr \pm SD).



Při vyhodnocení po 6 dnech byla u nejvyšší koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$ zjištěna nejnižší absorbance ($0,2258$) s velmi malou směrodatnou odchylkou $\pm 0,0141$, což je ukazatelem velmi přesného výsledku. U všech koncentrací byl shledán statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením ($0,8083 \pm 0,1014$). V grafu 28 je patrná nejnižší absorbance, a to u koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$. Velká výchylka byla zaznamenána u koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$, kdy byla naměřena průměrná hodnota absorbance 0,6058 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0614$. Ostatní koncentrace se pohybují v rozmezí absorbance 0,5330 až 0,5533 s poměrně stejnými směrodatnými odchylkami. Obecně lze u *A. schoenoprasum* za statis-

ticky významný vliv na proliferaci považovat koncentraci PhC nad 1 $\mu\text{g/ml}$ po 6 dnech působení NIH/3T3.

Graf 28: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *A. schoenoprasum* 6. den (průměr \pm SD).



Tabulka 19: Vliv extraktů z *R. acetosa* na NIH/3T3 (průměr \pm SD).

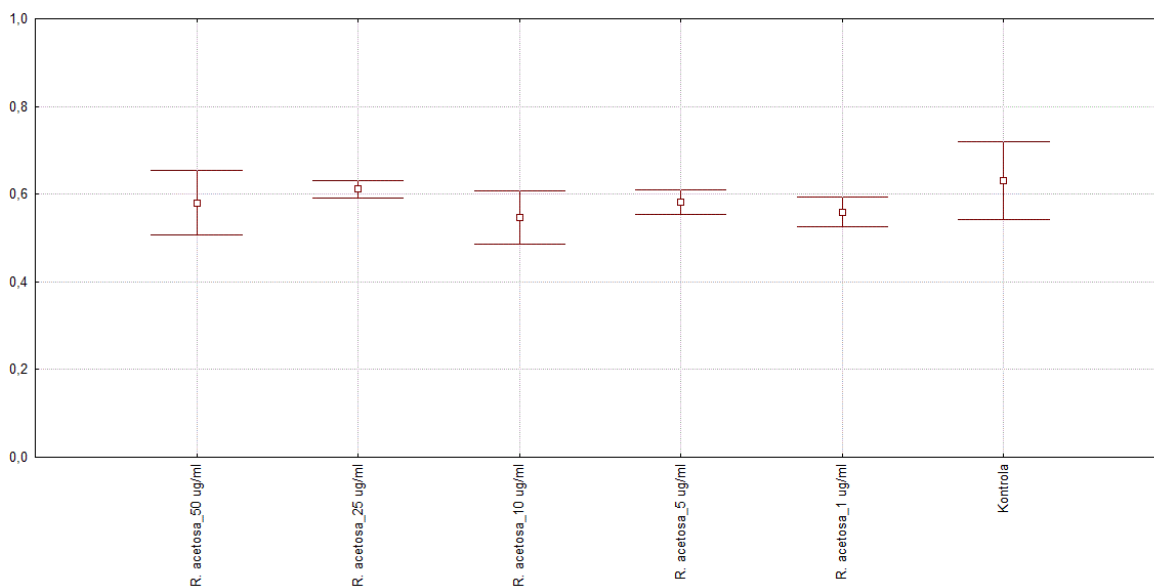
Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>R. acetosa</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	0,5806 \pm 0,0780	0,5982 \pm 0,0676 **
<i>R. acetosa</i> 25 $\mu\text{g/ml}$	0,6306 \pm 0,0199	0,6316 \pm 0,0546 **
<i>R. acetosa</i> 10 $\mu\text{g/ml}$	0,5451 \pm 0,0630 **	0,6582 \pm 0,0731 **
<i>R. acetosa</i> 5 $\mu\text{g/ml}$	0,6023 \pm 0,0296	0,6318 \pm 0,0416 **
<i>R. acetosa</i> 1 $\mu\text{g/ml}$	0,5561 \pm 0,0358	0,6219 \pm 0,0455 **
Kontrola	0,6306 \pm 0,0932 *	0,8083 \pm 0,1014 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

Statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole u *R. acetosa* na NIH/3T3 buňky byl po 4 dnech u koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$, kdy absorbance byla nejnižší, a to 0,5472 se směrodatnou odchylkou \pm 0,0630. U ostatních koncentrací nebyl shledán statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením, jak je znázorněno v tabulce 19. Stejně jako u předešlých květů se hodnoty absorbance porovnávaly s kontrolním měřením (0,6306 \pm 0,0932). Z grafu 29 je patrné, že všechny koncentrace (výjimkou koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$) se pohybují v rozmezí absorbance 0,5561 až 0,6306 a proto se nedá považovat, že by tyto koncentrace měly vliv

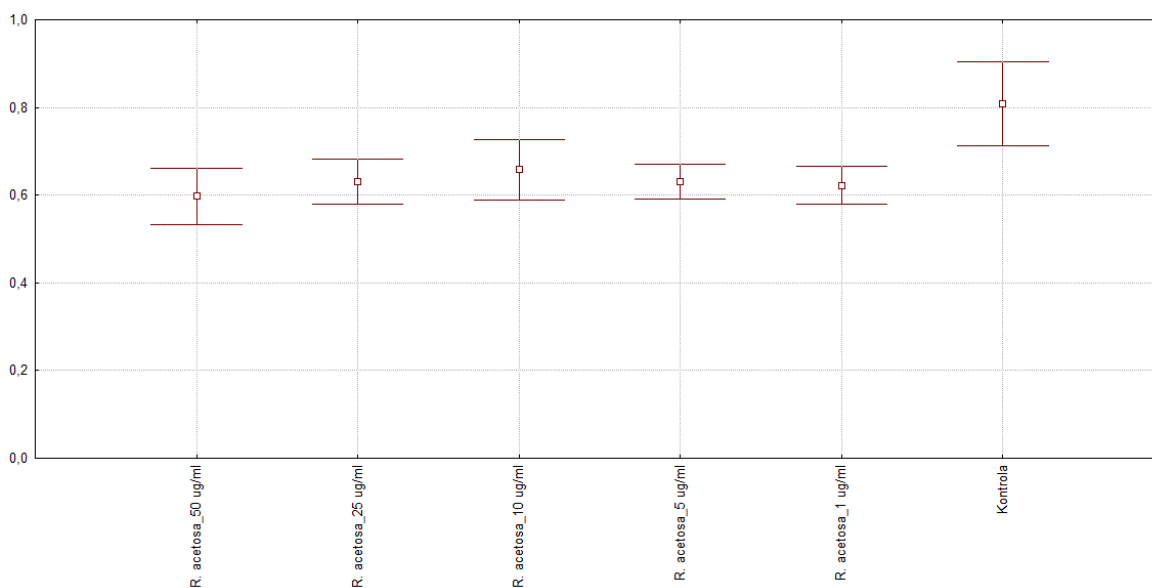
na proliferaci. Koncentrace 25 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ měly malé směrodatné odchylky, a lze tyto hodnoty považovat za velmi přesné. U koncentrací 50 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$ mohlo dojít k chybě, která mohla být způsobena špatným měřením nebo špatně připraveným vzorkem.

Graf 29: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *R. acetosa* 4. den (průměr \pm SD).



Při vyhodnocení po 6 dnech byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole u *R. acetosa* na NIH/3T3 buňky u všech koncentrací. Stejně jako u předešlých květů se výsledky porovnávaly s kontrolním měřením ($0,8083 \pm 0,1014$), což je znázorněno v tabulce 19. V grafu 30 je patrné, že všechny koncentrace se pohybují v podobném rozmezí absorbance, a to 0,5982 až 0,6682. Zatímco od koncentrací 50 $\mu\text{g/ml}$ do koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ došlo ke zvýšení absorbance, tak u koncentrací 5 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ došlo k poklesu absorbance. Nejvyšší hodnota absorbance byla naměřena u koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$, a to $0,6582 \pm 0,0731$. Obecně lze považovat účinné na proliferaci *R. acetosa* koncentrace vyšší než 1 $\mu\text{g/ml}$ po 6 dnech.

Graf 30: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *R. acetosa* 6. den (průměr ± SD).



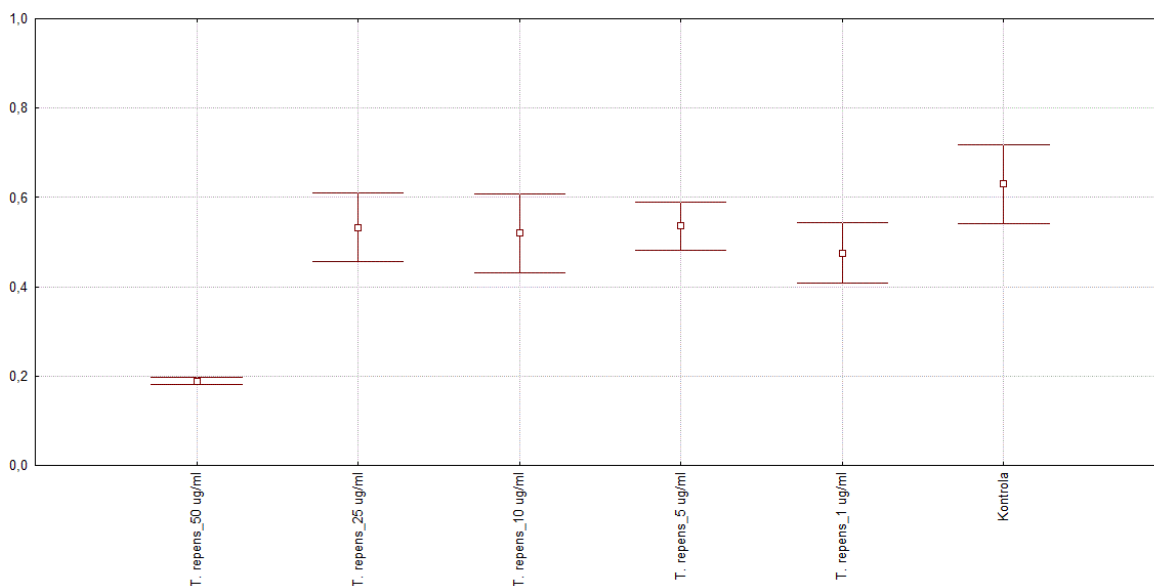
Tabulka 20: Vliv extraktů z *T. repens* na NIH/3T3 (průměr ± SD).

Konzentrace <i>PhC</i>	4. den	6. den
<i>T. repens</i> 50 µg/ml	0,1888 ± 0,0080 **	0,2856 ± 0,0541 **
<i>T. repens</i> 25 µg/ml	0,5326 ± 0,0811 **	0,6644 ± 0,0481 **
<i>T. repens</i> 10 µg/ml	0,5199 ± 0,0927 **	0,6521 ± 0,0536 **
<i>T. repens</i> 5 µg/ml	0,5359 ± 0,0574 **	0,6398 ± 0,0268 **
<i>T. repens</i> 1 µg/ml	0,4755 ± 0,0718 **	0,6098 ± 0,0641 **
Kontrola	0,6306 ± 0,0932 *	0,8083 ± 0,1014 *

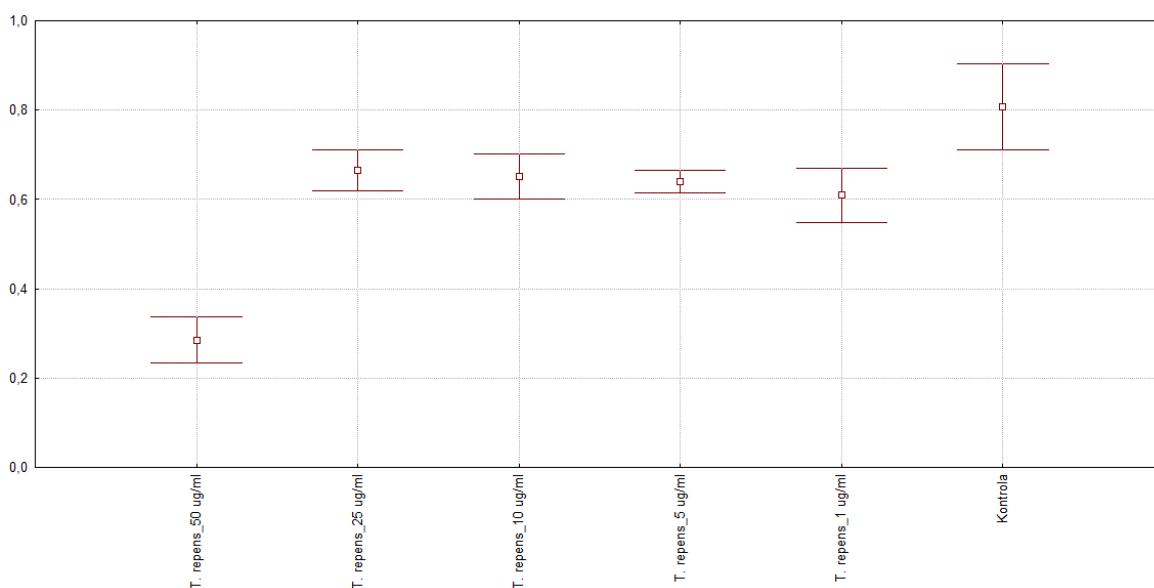
Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

U vzorku květu *T. repens* byla vyhodnocení po 4 a 6 dnech velmi podobná. Při hodnocení po 4 dnech bylo kontrolní měření opět stejné jako pro předchozí květy, porovnávalo se tedy s průměrnou hodnotou absorbance 0,6306 a směrodatnou odchylkou $\pm 0,0932$. U všech koncentrací, které se pohybují v rozmezí absorbance 0,1888 až 0,5359, byl statisticky průkazný rozdíl v porovnání s kontrolním měřením, což je znázorněno v tabulce 20. Nejnižší absorbance (0,1888) byla naměřena u koncentrace 50 µg/ml s velmi malou směrodatnou odchylkou $\pm 0,0080$, a tudíž lze tento výsledek považovat za velmi přesný. Stejně tak je to znázorněno i na grafu 31.

Graf 31: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *T. repens* 4. den (průměr \pm SD).



Graf 32: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *T. repens* 6. den (průměr \pm SD).



Po 6 denním působení NIH/3T3 se porovnávalo s průměrnou kontrolní hodnotou absorbance 0,8083 a směrodatnou odchylkou \pm 0,1014. V tomto případě byl u všech koncentrací zaznamenán statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole, který je znázorněn v tabulce 20. Nejnižší absorbance (0,2856) byla opět naměřena u koncentrace 50 μ g/ml se směrodatnou odchylkou \pm 0,0541, což lze vidět i v grafu 32. Ostatní koncentrace se pohybují v podobném rozmezí absorbance, a to 0,6098 až 0,6644. U těchto koncentrací lze pozorovat i postupné snižování absorbance, s postupným snižováním koncentrace *T. repens*.

Obecně lze tedy říci, že v obou dnech působení NIH/3T3 mají koncentrace *T. repens* vyšší než 1 µg/ml statisticky významný vliv na proliferaci.

Tabulka 21: Vliv extraktů z *S. pratensis* na NIH/3T3 (průměr ± SD).

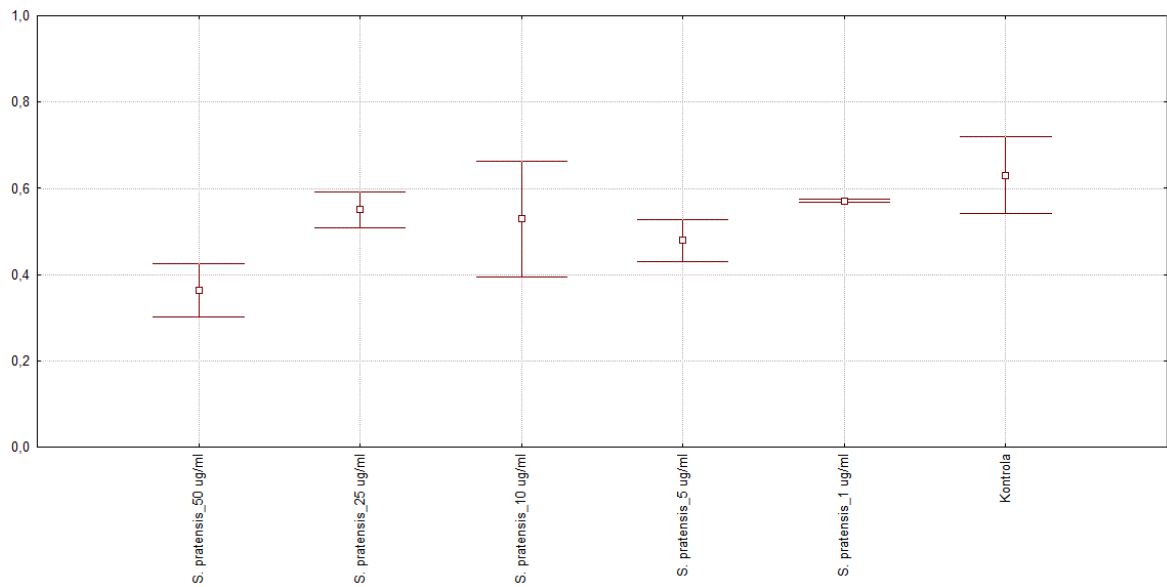
Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>S. pratensis</i> 50 µg/ml	0,3631 ± 0,0649 **	0,4617 ± 0,0510 **
<i>S. pratensis</i> 25 µg/ml	0,5507 ± 0,0437 **	0,5850 ± 0,0618 **
<i>S. pratensis</i> 10 µg/ml	0,5288 ± 0,1403 **	0,6450 ± 0,0495 **
<i>S. pratensis</i> 5 µg/ml	0,4791 ± 0,0518 **	0,5812 ± 0,0227 **
<i>S. pratensis</i> 1 µg/ml	0,5713 ± 0,0031	0,6542 ± 0,0341 **
Kontrola	0,6306 ± 0,0932 *	0,8083 ± 0,1014 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

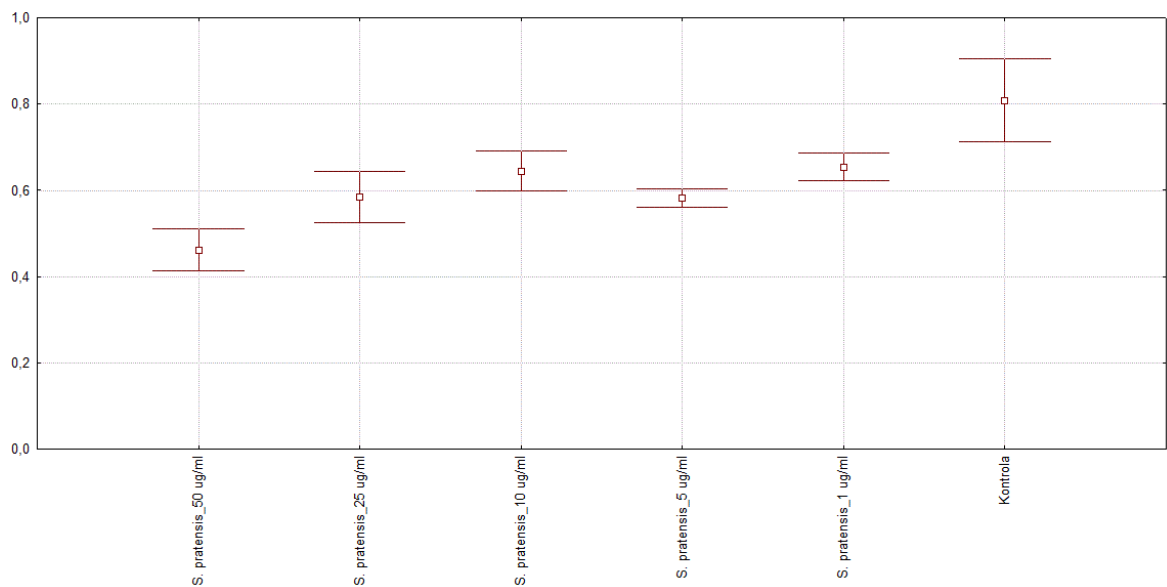
Předposledním zkoumaným květem pro NIH/3T3 linie byl *S. pratensis*, kterého účinek je znázorněn v tabulce 21 dle jednotlivých koncentrací. Nejnížší průměrné hodnoty proliferace NIH/3T3, byly zjištěny u koncentrace 50 µg/ml (0,3631) se směrodatnou odchylkou ± 0,0649. U všech koncentrací, výjimkou koncentrace 1 µg/ml, byl statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou (0,6306 ± 0,0932) a průměrnou hodnotou absorbance květu. Nejvyšší absorbance byla naměřena u koncentrace 1 µg/ml (0,5713 ± 0,0031), která se překrývá s kontrolním měřením a proto zde nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl. Avšak u této koncentrace je velmi malá směrodatná odchylka, tak lze tento výsledek považovat za velmi přesný. Z grafu 33 je zřetelná velká variabilita mezi měřeními a lze pozorovat, že koncentrace 25 µg/ml a 5 µg/ml snižují proliferaci ve větší míře než koncentrace 50 µg/ml a 10 µg/ml. Tyto hodnoty byly naměřeny po 4 dnech působení NIH/3T3.

Po 6 dnech působení NIH/3T3 byly zjištěny nejnížší průměrné hodnoty absorbance *S. pratensis* u koncentrace 50 µg/ml (0,4617) se směrodatnou odchylkou ± 0,0510. U všech koncentrací byl statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou (0,8083 ± 0,1014) a průměrnou hodnotou absorbance. Z grafu 34 je zřetelné postupné zvyšování absorbance, se snižující se koncentrací vzorku. Vyjimku tvoří koncentrace 5 µg/ml, kde došlo k poklesu absorbance (0,5812). Tento vzorek však měl velmi malou směrodatnou odchylku (± 0,0227) a proto se dá považovat za velmi přesný. Obecně lze u *S. pratensis* vyjádřit statisticky významný vliv na proliferaci koncentrací PhC nad 5 µg/ml po 4 dnech a koncentrací 1 µg/ml po 6 dnech působení NIH/3T3.

Graf 33: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. pratensis* 4. den (průměr \pm SD).



Graf 34: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *S. pratensis* 6. den (průměr \pm SD).



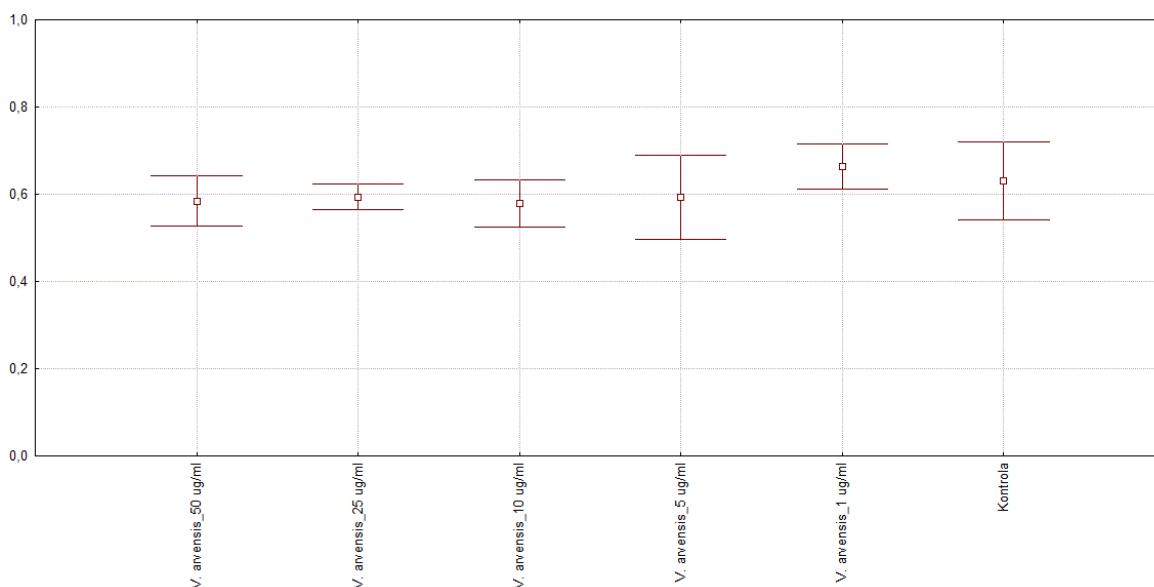
Tabulka 22: Vliv extraktů z *V. arvensis* na NIH/3T3 (průměr ± SD).

Koncentrace PhC	4. den	6. den
<i>V. arvensis</i> 50 µg/ml	0,5846 ± 0,0604	0,6981 ± 0,0566 **
<i>V. arvensis</i> 25 µg/ml	0,5941 ± 0,0305	0,6033 ± 0,0705 **
<i>V. arvensis</i> 10 µg/ml	0,5796 ± 0,0567	0,6642 ± 0,0918 **
<i>V. arvensis</i> 5 µg/ml	0,5929 ± 0,1008	0,6557 ± 0,0548 **
<i>V. arvensis</i> 1 µg/ml	0,6632 ± 0,0548	0,6138 ± 0,0488 **
Kontrola	0,6306 ± 0,0932 *	0,8083 ± 0,1014 *

Hodnoty s rozdílnými indexy vykazující průkazné rozdíly: $p \leq 0,05$ (*, **)

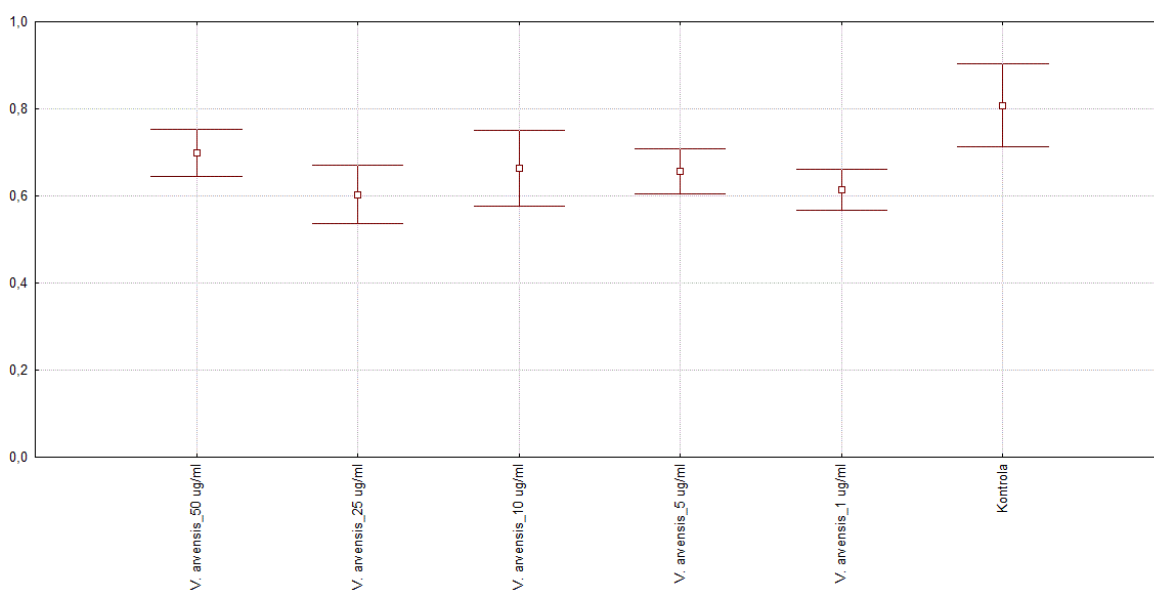
Jako poslední zkoumaný vzorek u NIH/3T3 linie byl *V. arvensis*. Opět se výsledky porovnávaly s kontrolním měřením s průměrnou absorbancí 0,6306 a se směrodatnou odchylkou $\pm 0,0932$ (pro hodnocení po 4 dnech), a s průměrnou absorbancí 0,8083 se směrodatnou odchylkou $\pm 0,1014$ při vyhodnocení po 6 dnech. V případě vyhodnocení po 4 dnech vykazovaly všechny koncentrace podobnou účinnost v porovnání s kontrolním měřením, a to v rozmezí absorbance 0,5796 až 0,6632, a proto u nich nebyl shledán statisticky průkazný rozdíl, jak je patrné z tabulky 22. Zato jejich směrodatné odchylky byly velmi různorodé. V grafu 35 lze zřetelně vidět podobnost v účinnosti, avšak ani jednu koncentraci nelze považovat za statisticky významně účinnou na proliferaci.

Graf 35: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *V. arvensis* 4. den (průměr ± SD).



V případě vyhodnocení po 6 dnech vykazovaly všechny koncentrace opět podobnou účinnost v rozmezí absorbance 0,6033 až 0,6981, avšak zde byl sledován statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou ($0,8083 \pm 0,1014$) a průměrnou hodnotou květu (viz. tabulka 22). U všech těchto koncentrací byly jejich směrované odchylky velmi různorodé. Z grafu 36 lze zřetelně vidět podobnost v účinnosti. Obecně lze u *V. arvensis* vyjádřit statisticky významný vliv na proliferaci NIH/3T3 koncentrací PhC nad $1 \mu\text{g/ml}$ po 4 i 6 dnech působení.

Graf 36: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z *V. arvensis* 6. den (průměr \pm SD).



9 DISKUSE

V rostlinách se nachází několik set různých fenolických sloučenin [SCALBEL a WILLIAMSON, 2000; CAI *et al.*, 2004]. Předkládaná práce byla zaměřena na stanovení vlivu polyfenolů extraktů ze šesti různých jedlých květů na tři buněčné linie. Z jedlých květů byl vybrán *S. nigra*, *A. schoenoprasum*, *R. acetosa*, *T. repens*, *S. pratensis* a *V. arvensis*. Z každého vzorku bylo naředěno pět koncentrací celkových fenolických sloučenin (50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml a 1 µg/ml), které se nechaly působit po dobu 4 a 6 dnů na lidské keratinocyty (HaCaT, CLS Catalog No. 300493; Germany) po dobu 7 a 11 dnů na hepatocyty (HepG2, ATCC HB-8065) a v případě myšších embryonálních fibroblastů (NIH/3T3, ATCC CRL-1658) opět po dobu 4 a 6 dnů. Výsledky naznačují, že testované jedlé květy jsou dobrým zdrojem fenolických sloučenin, a že jejich koncentrace a složení se liší podle jednotlivých druhů.

Předkládaná práce nebyla zaměřena na zkoumání obsahu polyfenolů v jedlých květech, ale na hodnocení jejich vlivů. Výsledky s obsahem polyfenolů byly prezentovány v předchozích pracích. Zkoumané květy obsahují: kyselinu galovou, kyselinu kávovou, kyselinu vanilovou, kyselinu skořicovou, kyselinu kumarovou, kyselinu ferulovou, kyselinu sinapovou, resveratrol, rutin, katechin a kvercetin. Jedlý květ *S. nigra* obsahuje kyselinu galovou (31,19 µg/g), kyselinu kávovou (161,27 µg/g), kyselinu vanilovou (52,87 µg/g) a kyselinu skořicovou (1,41 µg/g). *A. schoenoprasum* obsahuje 4 druhy polyfenolů: kyselinu galovou (29,88 µg/g), kyselinu kumarovou (30,07 µg/g), kyselinu ferulovou (131,43) a rutin (3,00 µg/g). Ve vzorku *R. acetosa* byly opět stanoveny 4 druhy polyfenolů: kyselina vanilová (34,41 µg/g), kyselina sinapová (1507,61 µg/g), resveratrol (10,09 µg/g) a katechin (19,93 µg/g). *T. repens* obsahuje kyselinu galovou (24,29 µg/g), kyselinu kávovou (30,84 µg/g), katechin (49,73 µg/g) a kvercetin (143,00 µg/g). V květu *S. pratensis* se nachází nejméně polyfenolů, ze zkoumaných květů, a to kyselina galová (4,02 µg/g), kyselina skořicová (8,08 µg/g) a katechin (6,96 µg/g). Jako poslední květ byl zkoumán *V. arvensis*, ve které se nachází kyselina galová (1,47 µg/g), kyselina kumarová (7,12 µg/g), resveratrol (1042,29 µg/g) a rutin (11,40 µg/g) [KUCEKOVÁ *et al.*, 2011].

Nejvyšší množství polyfenolů v pažitce zaujímá kyselina ferulová, která je jednou z nejčastějších fenolických kyselin, které se nachází převážně ve volné formě. Kyselina ferulová má širokou škálu léčebných vlastností, jako je působení proti cukrovce, kardiovaskulárním onemocněním a rakovině [ITAGAKI *et al.*, 2009], dále má antioxidační, pro-

tinádorovou a protizánětlivou činnost [ROUSSOU *et al.*, 2004]. Podle Lin *et al.* (2010) má ferulová kyselina schopnost inhibovat proliferaci nádorových buněk, což odpovídá výsledkům zjištěným v této práci. Další polyfenoly (kyselina galová, kumarová a rutin) zjištěné v *A. schoenoprasum* jsou v ní zastoupeny v o mnoho nižším množství než kyselina ferulová. V případě působení extraktu z *A. schoenoprasum* na HaCaT již koncentrace 5 µg/ml vykazují antiproliferační účinek a při působení na HepG2 je to při koncentracích nad 25 µg/ml. Při použití NIH/3T3 jsou to koncentrace nad 1 µg/ml při delším působení.

Dalším zkoumaným květem byl *T. repens*, který obsahuje polyfenoly, jako jsou kyselina galová, kyselina kávová, katechin a quercetin. Nejvyšší obsah z nich má kvercetin (143 µg/g). Kvercetin je polyfenolický flavonoid a je známý pro jeho antikarcinogenní účinky, antioxidační aktivitu a inhibici enzymů, které aktivují karcinogeny [CANIVENS-LAVIER *et al.*, 1996; SHIH *et al.*, 2000; MOON *et al.*, 2006]. Většina těchto účinků byla zkoumána na hlodavcích nebo *in vitro*. Jiné studie popisují účinek kvercetinu na člověka, např. na rakovinu plic [De STEFANI *et al.*, 1999], chronická onemocnění jako jsou srdeční onemocnění, astma a diabetes [KNEKT *et al.*, 2002]. Uvedené studie jsou v souladu s výsledky této práce. Existují však i hranice v oblasti činnosti kvercetinu, jelikož další studie ukazují, že kvercetin nemá pozitivní vliv na epitelární rakovinu vaječníků [MURAKAMI *et al.*, 2008]. V případě působení extraktu *T. repens* na HaCaT linie bylo účinné při koncentracích nad 50 µg/ml, zatímco u buněk HepG2 již od koncentrací 25 µg/ml. V případě působení na buňky NIH/3T3 se za významný vliv na proliferaci dají považovat koncentrace od 1 µg/ml.

Vzorek *V. arvensis* obsahuje: kyselinu galovou, kumarovou, resveratrol a rutin. I když obsah kyseliny galové byl velmi malý (1,47 µg/g), tak je prokázáno, že tato kyselina má významný inhibiční účinek na buněčnou proliferaci, apoptózu indukovanou v řadě nádorových buněčných liniích a selektivní cytotoxicitu proti nádorovým buňkám s vyšší citlivostí, než je obvyklé u buněk *in vitro* [SALUCCI *et al.*, 2002]. Galová kyselina je uvedena i u Saxena *et al.* (2008) jako sloučeniny s protinádorovou aktivitou proti hormonálně podmíněné rakovině prsu. V další studii Yeh *et al.* (2005) popsal růstový inhibiční účinek fenolických kyselin, včetně kyseliny galové, na HepG2 buňky. Nejvyšší obsah polyfenolů ve vzorku *V. arvensis* zaujímal resveratrol (1042,29 µg/g), který působí jako antioxidant, antikarcinogen a zároveň má protinádorové vlastnosti [BURNS *et al.*, 2002]. Ostatní zjištěné polyfenoly mají zanedbatelný obsah oproti resveratrolu. Jako pozitivní účinek na proliferaci lze považovat koncentrace polyfenolů nad 10 µg/ml v případě působení HaCaT,

v případě HepG2 všechny koncentrace s výjimkou koncentrace 10 µg/ml a u NIH/3T3 jsou to koncentrace nad 1 µg/ml při delším působení.

Ve vzorku *S. nigra* nejvyšší množství polyfenolů zaujímá kyselina kávová (161,27 µg/g). Nejběžnějším esterem kávové kyseliny je kyselina chlorogenová, která je přítomna v řadě druhů zeleniny a ovoce a také v kávě. Šálek instantní kávy obsahuje 50 až 150 mg kyseliny chlorogenové [CLIFFORD, 1999]. Další polyfenoly (kyselina galová, kyselina vanilová, kyselina skořicová) byly rovněž zjištěny ve vzorku *S. nigra*, ale jejich obsah je poměrně nízký, v porovnání s kyselinou kávovou. Působení extraktu *S. nigra* na HaCaT bylo účinné při koncentracích vyšších než 1 µg/ml, zatímco u buněk HepG2 to byly koncentrace vyšší než 25 µg/ml. V případě působení na buňky NIH/3T3 se dají za významnou účinnost považovat všechny koncentrace vyšší než 1 µg/ml, avšak až po 6 denním působení.

Dalším zkoumaným jedlým květem byl *S. pratensis*, který obsahoval kyselinu galovou, kyselinu skořicovou a katechin. I když všechny tyto polyfenoly byly ve velmi nízkém množství, tak je prokázáno, že katechiny snižují celkovou hladinu cholesterolu v krvi [MURAMATSU *et al.*, 1986]. Hlavním zdrojem katechinu jsou čaje, kde je brán jako účinný lapač volných kyslíkových radikálů a mohou také nepřímo působit jako antioxidanty, prostřednictvím jejich účinků na transkripční faktory a enzymatickou aktivitu. Účinky čaje, převážně toho zeleného, tlumí oxidativní stres a oxidativní poškození DNA [HIGDON a FREI, 2003]. V případě použití HaCaT lze považovat za významnou účinnost na proliferaci koncentrace polyfenolů nad 1 µg/g. Při použití buněčné linie NIH/3T3 jsou to koncentrace nad 5 µg/ml. V případě použití HepG2 je působení těchto linií při koncentraci 25 µg/g.

Jako poslední byl zkoumán *R. acetosa*, ve kterém je obsažena kyselina vanilová, kyselina sinapová, resveratrol a katechin. Nejhojnějším polyfenolem ve šťovíku byla kyselina sinapová (1507,61 µg/g). Množství kyseliny sinapové je tak značné, že obsah ostatních polyfenolů je zanedbatelný. Pozitivní účinek na snižování proliferace HaCaT a HepG2 buněk má extrakt *R. acetosa* při koncentracích vyšších než 10 µg/g. Při použití NIH/3T3 buněk se jsou to koncentrace vyšší než 1 µg/ml při působení těchto buněk 6 dnu.

Dále bylo zjištěno, že více než celkový obsah polyfenolů v jedlých květech má větší vliv zastoupení jednotlivých polyfenolů ve směsi. V léčbě nádorových buněk záleží i na velkém množství vedlejších faktorů. Mnoho studií dokazuje, že je důležité, jaký je typ buněk, které jsou jejich působení vystaveny [HIDA *et al.*, 1998]. V případě lidských keratinocytů bylo

u všech vzorků prokázáno, že se snižující se koncentrací polyfenolů se zvyšuje absorbance extraktu květu. Velké vychýlení u většiny vzorků na této buněčné linii bylo zaznamenáno při koncentraci 10 $\mu\text{g/g}$, avšak u všech výsledků byly poměrně nízké směrodatné odchylky, tak se tyto výsledky považují za velmi přesné. Při použití lidských hepatocytů byly výsledky velmi různorodé s velkými směrodatnými odchylkami, a proto lze říci, že antiproliferační účinek polyfenolů na HepG2 závisí na různých koncentracích. V případě myších fibroblastů se podobnost výsledků velmi blížila lidským keratinocytům. V této práci dosáhl nejvyššího antiproliferačního účinku jedlý květ *A. schoenoprasum* a to hlavně v působení na lidské kartinocyty.

Výsledky experimentu také ovlivní použití různých technik analýzy genové exprese, jednotlivé interpretace výsledků [ERMERT *et al.*, 2003], ale také výskyt různých izomerů [HASTÜRK *et al.*, 2002]. Byly objeveny i studie, které naznačují, že některé polyfenoly mohou ovlivňovat proliferaci pouze v nízkých koncentracích [MELZUCH *et al.*, 2001].

Výsledky potvrzují, že již koncentrace polyfenolů nad 10 $\mu\text{g/ml}$ mohou potlačit proliferaci nádorových buněk významnou mírou. Ze závěrů většiny studií vychází, že polyfenoly z jedlých květů by měly působit na proliferaci velmi dobře, a je možné je použít pro léčbu nádorových onemocnění. Tato práce potvrdila, že polyfenoly extrahované z jedlých květů účinně potlačují proliferaci eukaryotických buněk avšak ne v každém případě. Zatímco u některých květů byla proliferace významně ovlivněna již koncentrací polyfenolů 1 $\mu\text{g/ml}$, v případě jiných květů neměli účinek na proliferaci ani vyšší koncentrace. Zásadní vliv na proliferaci tedy nemá jen koncentrace polyfenolů, ale i polyfenolové složení jednotlivých extraktů. Zároveň může být proliferace ovlivněna i jinými látkami obsaženými v extraktech, které ale nebyly v této práci stanovené. Zatímco buněčná linie HaCaT působí příznivě na proliferaci ve většině případů již při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$, tak v případě buněčné linie HepG2 je to až od koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$. NIH/3T3 linie vykazuje podobný vliv na proliferaci jako HaCaT, ale ne v tak velké míře a spíše až po delší době jejího působení.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo popsat vliv polyfenolů extrahovaných z jedlých květů na proliferační aktivitu tří různých buněčných linií. U hodnocení antiproliferačního efektu *in vitro* bylo použito pět různých koncentrací roztoků polyfenolů (50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml a 1 µg/ml). Studováno bylo šest jedlých květů (*S. nigra*, *A. Schoenoprasum*, *R. Acetosa*, *T. Repens*, *S. pratensis* a *V. Arvensis*) a použity byly tři typy buněčných linií: lidské keratinocyty (HaCaT), lidské hepatocyty (HepG2) embryonální myší fibroblasty (NIH/3T3). K určení míry proliferace byl použit MTT test. Tento test je založen na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly hvězdicovitého tvaru).

V práci bylo zjištěno, že antiproliferační činnost není závislá výhradně na celkovém obsahu fenolových sloučenin nebo složení, ale může být také ovlivněna obsahem účinných látek obsažených v jedlých květech, které v této práci nebyly zkoumány. V celkovém hodnocení se ukázalo, že na životaschopnost buněk mají vliv jen určité koncentrace květů. Nejvyšší antiproliferační účinek měla koncentrace 50 µg/ml. Z pohledu použité koncentrace polyfenolů vyšel jako nejúčinnější extrakt z květu *A. schoenoprasum*, který působil největší mírou i v nízkých koncentracích, a nejvyšší proliferační účinek měl na lidské keratinocyty.

Skutečnost, že přírodní fenolické látky obsažené v jedlých květech (*S. nigra*, *A. schoenoprasum*, *R. acetosa*, *T. repens*, *S. pratensis* a *V. arvensis*) inhibují proliferaci buněk, je užitečná pro léčbu a prevenci nádorových onemocnění a při dalším využití v medicíně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADLERCREUTZ, H., MAZUR, W. *Phyto-oestrogens and Western diseases*. Ann Med. (1997) Apr;29(2):95-120. Review.
- ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2.vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing (2001) 630 s., ISBN 80-902906-2-0.
- ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science (2002). ISBN 0-8153-3218-1.
- ARTS, I. C., HOLLMAN, P. C., KROMHOUT, D. *Chocolate as a source of tea flavonoids*. Lancet (1999) Aug 7;354(9177):488.
- ARTS, I. C., Van de PUTTE, B., HOLLMAN, P. C. H. *Catechin contents of fous connonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple fous, and processed fous*. J Agric Food Chem. (2000) May;48(5):1746-51.
- ASAMI, D. K., HONG, Y. J. , BARRETT, D. M., MITCHELL, A. E. *Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberrry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices*. J Agric Food Chem. (2003) Feb 26;51(5):1237-41.
- AUSUBEL, F. M, BRENT, R. KINGSTONE, R., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH J. A., STRUHL, K. *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*. 5th ed. New York: Wiley, (2002). ISBN 04-712-5092-9.
- AXELSON, M., SJÖVALL, J., GUSTAFSSON, B. E., SETCHELL, K. D. R. *Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants*. Nature. (1982) Aug 12;298(5875):659-60.
- 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*. J Cell Physiol. (1976) Oct;89(2):235-49.
- BERKE, G. *Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Lymphocyte-triggered internal target disintegration*. Immunol Today. (1991) Nov;12(11):396-9; discussion 402. Review.

- BIRT, D. F., HENDRICH, S., WANG, W. *Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids*. Pharmacol Ther. (2001) May-Jun;90(2-3):157-77. Review.
- BODNAR, A. G., OUELLETTE, M., FROLKIS, M., HOLT, S.E., CHIU, C.-P., MORIN, G.B., HARLEY, C.B., SHAY, J.W., LICHSTEINER, S., WRIGHT, W.E. *Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells*. Science. roč. 279, č. 5349, s. 349-352. ISSN 00368075. DOI: 10.1126/science.279.5349.349. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.279.5349.349> [online].[cit. 2012-08-04].
- BOOTH, C., EVANS, G. S., POTTEN, C. S. *Growth factor regulation of proliferation in primary cultures of small intestinal epithelium*. In Vitro Cell Dev Biol Anim. (1995) Mar;31(3):234-43.
- BORRIELLO, A., CUCCIOLLA, V., DELLA, R. F., GALLETTI, P. *Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis*. Nutr Metab Cardiovasc Dis. (2010) Oct;20(8):618-25. Review.
- BRAVO, L. *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutr Rev. (1998) Nov; 56(11):317-33. Review.
- BURDA, S., OLESZEK, W., LEE, C. Y. *Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry (1990) 38 (4),945-948.
- BURNS, J., YOKOTA, T., ASHIHARA, H., LEAN, M. E. J., CROYIER, A. *Plant foods and herbal sources of resveratrol*. J Agric Food Chem. (2002) May 22;50(11):3337-40.
- CAI, Y. Z., LUO, Q., SUN, M., CORKE, H. *Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer*. (2004). Life Sci., 74, 2157- 2184.
- CANIVENC-LAVIER, M. C., VERNAVAVUT, M. F. , TOTIS, M., SIESS, M.H., MAGDALOU, J. a SUSCHETET, M. *Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver*. Toxicology. (1996) Nov 15;114(1):19-27.
- CARDOZO, T., PAGANO, M. *The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine*. Nat Rev Mol Cell Biol. (2004) Sep;5(9):739-51. Review.

- 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 Nov;15(11):1349-458.
- CHEN, G., PALMER, A. F. *Hemoglobin-based oxygen carrier and convection enhanced oxygen transport in a hollow fiber bioreactor*. Biotechnol Bioeng. (2009) Apr 15;102(6):1603-12.
- CHERRY, R. S., & PAPOUTSAKIS, E. T. *Understanding and controlling fluid-mechanical injury of animal cells in bioreactors*. In Spier, R. E., & Griffiths, J. B., Animal cell biotechnology, Vol. 4. London: Academic Press, (1990); pp. 71–121.
- CLIFFORD, M. N. *Anthocyanins in focus*. (1996):1-19 Symposium on Polyphenols and Anthocyanins as Food Colourants and Antioxidants Brussels, Belgium, EU.
- CLIFFORD, M. N. *Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden*. J. Sci. Food. Agric. (1999); 79:362-372.
- COOPER, P. D., BURT, A. M., & WILSON, J. N. *Critical effect of oxygen tension on rate of growth of animal cells in continuous suspended culture*. Nature. (1958) Nov 29;182(4648):1508-9.
- COOPER, G. M. *The Cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington (DC) : ASM Press, (2000). ISBN 08-789-3106-6.
- 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) Jul;38(1):77-81.
- CRIQUI, M. H., RINGEL, B. L. *Does diet or alcohol explain the French paradox?*. Lancet. (1994) Dec 24-31;344(8939-8940):1719-23.
- CROZIER, A., LEAN, M., McDONALD, M. S., BLACK, C. *Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery*. J. Agric. Food Chem (1997); 45:590–5.
- DARZYNKIEWICZ, Z. et al. *Assays of cell viability discrimination of cells dying by apoptosis*. Methods Cell Biol. (1994) ;41:15-38. Review.

- DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, (1983). 629 s
- DAVISEM, J. M. *Basic Cell culture: a practical approach*. 2nd ed. New York: Oxford University Press (2002). 381 s. ISBN: 01-996-3853-5.
- De RIDDER, L., & MAREEL, M. *Morphology and ¹²⁵I concentration of embryonic chick thyroids cultured in an atmosphere of oxygen*. Cell Biol Int Rep. (1978) Mar;2(2):189-94.
- De STEFANI, E., BOFFETTA, P., DENEOPELLEGRINI, H., MENDILAHARSU, M., et al. *Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay*. (1999). Nutr Cancer. 1999;34(1):100-10.
- DIXON, R., STEELE, CH. *Flavonoids and isoflavonoids- a gold mine for metabolite engineering*. Trends Plant Sci. (1999) Oct;4(10):394-400.
- DIXON, A. R., XIE, D-Y., SHARMA, S. B. *Proanthocyanidins- a final frontier in flavonoid research?* New Phytol. (2005) Jan;165(1):9-28. Review.
- EAGLE, H. *The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells*. J Cell Physiol. (1973) Aug;82(1):1-8.
- EISINGER, M., LEE, J. S., HEFTON, J. M., DARZYJIEWICZ, A., CHIAO, J. W., DEHARVEN, E. *Human epidermal cell cultures: Growth and differentiation in the absence of dermal components or medium supplements*. Proc Natl Acad Sci U S A. (1979) Oct;76(10):5340-4.
- ERDMAN, J. W., BALENTINE, D., ARAB, L., et al. *Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, Washington, DC*. J Nutr. (2007) Mar;137(3 Suppl 1):718S-737S.
- ERMERT, L., DIERKES, C. and ERMERT, M. *Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors*. Clin Cancer Res. (2003) May;9(5):1604-10.
- EVANS, BA, GRIFFITHS, K., MORTON, MS. *Inhibition of 5 alpha-reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids*. J Endocrinol. (1995) Nov;147(2):295-302.
- FOGH, J. *Contamination in tissue culture*. New York: New York Academy Press; (1973).

- FOSTER, R., & MARTIN, G. S. *A mutation in the catalytic domain of pp60^{v-src} is responsible for the host- and temperature- dependent phenotype of the Rous sarcoma virus mutant tsLA33-1*. *Virology*. (1992) Mar;187(1):145-55.
- FRANKEL, E. N., WATERHOUSE, A. L., TEISSEDRE, P. L. *Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins*. *J. Agric. Food Chem.* (1995); 43:890-894.
- FREEMAN, W. H. *Molecular Cell Biology*. (2000);4. vyd. NBK21716. ISBN-10:0-7167-3136-3.
- FRESHNEY, R. I. a FRESHNEY, M. G. In Freshney, R. I. (ed.). *Culture of epithelial cells*. 2nd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, chs. 6, 10, 11, 12, 13. (2002). ISBN: 978-0-471-22120-3.
- FRESHNEY, R. I. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*. 5th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss (2005). 642 s. ISBN: 978-0-471-45329-1.
- FRESHNEY, R. I. *Culture of animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Application*. 5th Ed. Hoboken NJ (2010); ISBN 978-0-047-52812-9.
- FRIEDMAN, M. *Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols*. A review. *J. Agric. Food Chem.*, (2003) , 51 (16), 4504-4526.
- FUHR, U., KUMMERT, A. L. *The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions?*. *Clin Pharmacol Ther.* (1995) Oct;58(4):365-73.
- FUKAMACHI, H. *Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture*. *J Cell Sci.* (1992) Oct;103 (Pt 2):511-9.
- GERDES, J. et al. *Cell cycle analysis of a cell proliferation: associated human unclear antigen defined by the monoclonal antibody*. *J Immunol.* (1984) Oct;133(4):1710-5.
- GOOD, N. E., WINGET, G. D., WINNTER, W., CONNOLLY, T. N., IWAZA, S., & SINGH, R. M. M., *Hydrogen ion buffers and biological research*. *Biochemistry*. (1966) Feb;5(2):467-77.
- GRESELE, P., CERLETTI, C., GUGLIELMINI, G., PIGNATELLI, P., de GAETANO, G., VIOLI, F. *Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update*. *J Nutr Biochem.* (2011) Mar;22(3):201-11. Epub 2010 Nov 26. Review.

- HAKIMUDDIEN 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*. Nutr Res. (2008) Oct;28(10):702-13.
- HAMMERSTONE, J. F., LAZARUS, S. A., SCHMITZ, H. H. *Proanthocyanidin content and variation in some commonly consumed foods*. J Nutr. (2000) Aug;130(8S Suppl):2086S-92S.
- HARA, Y., LUO, S. J., WICKREMASINGHE, R. L., YAMANISHI, T. *Special issue on tea*. Food Rev. Int. (1995); 11:371-542.
- HARBORNE, J. B. *The flavonoids: recent advances*. In: Goodwin TW, ed. Plant Pigments. London, England: Academic Press, (1988), p. 299–343.
- 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) Feb 15;94(4):1023-31.
- HERMANN, H. *On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables*. Z. Lebensm. Unters. For. 186, 1–5. (1988).
- HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. *Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands*. J. Agric. Food Chem. (1992); 40:2379-2383.
- HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B, KROMHOUT, d. *Intake of potencially anticarcinogenic flavonoids and their determinant in adults in the Netherlands*. Nutr Cancer. (1993); 20(1):21-9.
- HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B., KROMHOUT, D. *Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherland*. Nutrition and Cancer. (1993), roč. 20, č. 1, s. 21-29. ISSN 0163-5581.
- HERTOG, M. G. L., KROMHOUT, D., ARAVANIS, C., et al. *Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study*. Arch Intern Med. (1995) Feb 27;155(4):381-6. Erratum in: Arch Intern Med 1995 Jun 12;155(11):1184.

- 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); INRA, Paris (France) 87: 117–131.
- 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) Sep 1;58(17):3761-4.
- HIGDON, J. V., FREI, B. *Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions*. Crit Rev Food Sci Nutr. (2003); 43(1):89-143. Review.
- HOLLMAN, P. C. H., de VRIES, J. H. M., van LEEUWEN, S. D., MENGELERS, M. J. B., KATAN, M. B. *Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers*. Am J Clin Nutr. (1995) Dec;62(6):1276-82.
- HOLLMAN, P. C. H., Van TRIJP, J. M. P., BUYSMAN, M.N.C.P., van der GAAG, M. S., MENGELERS, M.J.B., de VRIES, J.H.M., KATAN, M. B. *Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man*. FEBS Lett. (1997) Nov 24;418(1-2):152-6.
- HORST, D., BECKER, H. D., HOHENBERGER, W., JUNGINGER, T., SCHLAG, P. M. *Chirurgická onkologie*, 1. vyd. Praha: Grada (2005). 852 s. ISBN: 8024707209.
- HYVONEN, T., ALAKUIJALA, L., ANDERSSON, L., KHOMUTOV, A. R., KHOMUTOV, R. M. & ELORANTA, T. O. *1-Aminoxy- 3-aminopropane reversibly prevents the proliferation of cultured baby hamster kidney cells by interfering with polyamine synthesis*. J Biol Chem. (1988) Aug 15;263(23):11138-44.
- IYAMA, K., LAM, T. B. T., STONE, B. A. *Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in beak internodes* (1990); 733-739.
- ITAGAKI, S., KUROKAWA, T., NAKATA, C. et al. *In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors*. Food Chem., 114, 466 – 471. (2009), DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.073
- JANČA, J., ZENTRICH, J. A. *Herbář léčivých rostlin: 1. díl* . 1. vyd. Praha: EMINENT (1997). 288 s. ; ISBN:8085876027.
- JANČA, J., ZENTRICH, J. A. *Herbář léčivých rostlin: 2. díl* . 1. vyd. Praha: EMINENT (1997). 287 s. ; ISBN:8085876043.

- JANČA, J., ZENTRICH, J. A. *Herbář léčivých rostlin: 3. díl*. 1. vyd. Praha: EMINENT (1997). 287 s. ; ISBN:8085876140.
- JANČA, J., ZENTRICH, J. A. *Herbář léčivých rostlin: 4. díl*. 1. vyd. Praha: EMINENT (1997). 287 s. ; ISBN:8085876205.
- JANG, M., CAI L., UDEANI G. O., SLOWING K. V., THOMAS, C. F., BEECHER, C. W. W., FONG, H. H. S., FARNSWORTH, N. R., KINGHORN, A. D., MEHTA, R. G., PEZZUTO, J. M. *Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes*. Science. (1997) Jan 10;275(5297):218-20.
- KAEFFER, B. *Mammalian intestinal epithelial cells in primary culture: A mini-review*. In Vitro Cell Dev Biol Anim. (2002) Mar;38(3):123-34. Review.
- KAMINSKA, B., KACZMAREK, L., & GRZELAKOWSKA-SZTABERT, B. *The regulation of G0 –S transition in mouse T lymphocytes by polyamines*. Exp Cell Res. (1990) Dec;191(2):239-45.
- KARMIOL, S. Development of serum-free media in masters, *Animal Cell Culture*, 3rd Ed., Oxford University Press, (2000) 105–121.
- KERR, F. R., WINTERFORD, C. M., HARMON, B. V. *Apoptosis: Its significance in cancer therapy* (2006); Publisher: WILEY-LISS, 10,1002/1097.
- KERR, J. H. R., WZLLIE, A. H., CURRIE, A. R. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer. (1972) Aug;26(4):239-57. Review.
- KING, A., YOUNG, G. *Characteristics and occurrence of phenolic phytochemical*. J. AM. Diet Assoc., (1999); roč. 99, č. 2, s. 213-218.
- KNEKT, P., KUMPULAINEN, J., JÄRVINEN, R., et al. *Flavonoid intake and risk of chronic diseases*. Am. J. Clin. Nutr., 76, (2002), 560 – 568.
- KNEKT, P., JÄRVINEN, R., REUNANEN, A., et al. *Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study*. BMJ. (1996) Feb 24;312(7029):478-81..
- KOWLURU, R. A., KOWLURU, A., CHAKRABARTI, S., KHAN, Z. *Potential contributory role of H-Ras, a small G-Protein, in the development of retinopathy in diabetic rats*. Diabetes. (2004) Mar;53(3):775-83.

- KRÄHENBÜHL, O., TSCHOPP, J. *Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation.* Immunol Today. (1991) Nov;12(11):399-402; discussion 403. Review.
- KRAUS, V., FOFFOVÁ, Z., VURM, B., *Nová encyklopedie českého a moravského vína.* 2. díl. 1.vyd. Praha: Praga Mystica (2005-2008). 311s. ISBN: 978-80-86767-09-3.
- KROON, P. A., FAULDS, C. B., RYDEN, P., ROBERTSON, J. A., WILLIAMSON, G. *Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon.* J. Agric. Food Chem. (1997); 45:661-667.
- KUCEKOVÁ, Z., MLČEK, J., HUMPOLÍČEK, P., ROP, O., VALÁŠEK, P., SAHA, P. *Phenolic Compounds from Allium schoenoprasum, Tragopogon pratensis and Rumex acetosa and Their Antiproliferative Effects.* Molecules (2011) 16, 9207-9217.
- KÜHNAU, J. *The flavonoids: A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition.* World Rev Nutr Diet. (1976);24:117-91. Review.
- KYZLINK, V. *Skladování a zpracování zahradnických plodin.* Praha:, SPN (1968) 443s. ISBN: 978-0-444-98844-7.
- LESKO, J.: *Práce s tkanivovými kulturami.* Vydavateľstvo slovenskej akadémie vied Bratislava (1975) 212 s. ISBN: 937-90-3988-032-2.
- LEUPOLD, G., DRAWERT, F. *Zur analytisch phenolischer Verbindungen im Bier.* Brauwissenschaft (1981); 34:205-210.
- LEW, D. J., REED, S. I. *A cell cycle check point monitors cell morphogenesis in budding yeast.* J Cell Biol. (1995) May;129(3):739-49. PubMed PMID: 7730408.
- LGC Standard Offices [online].[cit. 2011-23-12]. Dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/>
- LIN, J., REXRODE, K. M., HU, F., et al. *Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women.* Am J Epidemiol. (2007) Jun 1;165(11):1305-13. Epub 2007 Mar 22.
- LIN, X. F., MIN, W. a LUO, D. *Anticarcinogenic effect of ferulic acid on ultraviolet-B irradiated human keratinocyte HaCaT cells.* J. Med. Plants Res., 4, (2010), 1686 – 1694.
- LIU, S., LU, H., YHAO, Q., HE, Y., NIU, J. DEBNATH, A. K., WU, S., JIANG, S. *Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by*

- targeting gp41*. Biochim Biophys Acta. 2005 May 25;1723(1-3):270-81. Epub (2005) Mar 24. Erratum in: Biochim Biophys Acta. 2007 Feb;1770(2):312.
- LUND TD, MUNSON DJ, HALDY ME, SETCHELL KDR, LEPHART ED, HANDA RJ. *Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback*. Biol Reprod. (2004) Apr;70(4):1188-95. Epub 2003 Dec 17.
- LUNDER, T. L. *Catechins of green tea*. (1992); ISBN: 9780841213630.
- LUŠTINEC, J., TÁRSKÝ, V.: *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum (2003). 261 s. ISBN: 80-246-0563-5.
- MACHEIX, J. - J., FLEURIET, A., BILLOT, J. *Fruit Phenolics*. (1990) CRC Press Boca Raton, Fla. ISBN: 10 0849349680
- MAILLARD, M.- N., BERSSET, C. *Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt*. J. Agric. Food Chem. (1995); 43:1789-1793.
- MAKELA, S., POUNTANEN, M., KOSTIAN ML, LEHTIMAKI, N., STRAUSS, L., SANTTI, R., VIHLO, R. *Inhibition of 17beta-hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells*. Proc Soc Exp Biol Med. (1998) Mar;217(3):310-6.
- MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr. (2004) May;79(5):727-47. Review.
- MARLER, J. J., UPTON, J., LANGER, R., VACANTI, J. P. *Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration*. Adv Drug Deliv Rev. (1998) Aug 3;33(1-2):165-182.
- MARQUIS, C. P. *Mammalian Cell Culture: Department of Biotechnology*. University of New South Wales, Sydney. (1994).
- 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. Review.
- 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., THEOHARIDES, T. C. *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.* Pharmacol Rev. (2000) Dec;52(4):673-751. Review.
- MOON, Y. J., WANG, X. a MORRIS, M.E. *Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism.* Toxicol In Vitro. (2006) Mar;20(2):187-210. Epub 2005 Nov 11. Review.
- MUNGER, K., HOWLEY, P. M. *Human papillomavirus immortalization and transformation functions.* Virus Res. (2002) Nov;89(2):213-28. Review.
- MURAMATSU, K., FUKUYO, M., HARA, Y. *Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats.* J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). (1986) Dec;32(6):613-22.
- MURAKAMI, A., ASHIDA, H. a TERAOKA, J. *Multitargeted cancer prevention by quercetin.* Cancer Lett. (2008) Oct 8;269(2):315-25. Epub 2008 May 7. Review.
- NAGAVANI, V., MADHAVI, Y., BHASKAR Rao, D., KOTESWARA Rao, P., RAGHAVA Rao, T. *Free radical scavenging activity and qualitative analysis of polyphenols by RP-HPLC in the flowers of Couroupita guianensis Aubl.* (2010); ISSN: 1579-4377.
- NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty.* 3.vyd., přeprac. vyd. V nakl. H. Jinočany : H (2000). 554 s. ISBN 8086022463.
- NESS, A. R., POWLES, J. W. *Fruit and vegetables and cardiovascular disease: a review.* Int J Epidemiol. (1997) Feb;26(1):1-13. Review.
- 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.
- PAUS, R., ROSENBAUM, T., HAAS, N., CZARNETZKI, B. M. *Patterns of cell death: the significance of apoptosis for dermatology.* Exp Dermatol. (1993) Feb;2(1):3-11. Review.
- PELEG, H., NAIM, M., ROUSEFF, R. L. and ZEHAVI, U. *Distribution of bound and free phenolic acid in oranges (Citrus sinensis) and grapefruits (Citrus paradisi).* J. Sci. Food Agric. (1991); 57, 417-426.

- PESCHIAROLI, A., DORRELLO, N. V., GUARDAVACCARO, D., VENERE, M., HALAZONETIC, T., SHERMAN, N. E., PAGANO, M. *SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response*. Mol Cell. (2006) Aug 4;23(3):319-29.
- PETERSON, J. M. S., DWYER, J. *Flavonoids: Dietary occurrence and biochemici aktiviti*. Boston University (1998); 1995- 2018.
- POTTER, L. W. *Tannins*. In Methods in Plant Biochemistry, I: Plant Pphenolics, (J. B. Harborne, ed.) (1989); pp. 389–419, Academic Press, London, UK.
- PREISSMANN, A., WIESMANN, R., BUCHLOZ, R., WERNER, R. G., & NOE, W. *Investigations on oxygen limitations of adherent cells growing on macroporous micro-carriers*. Cytotechnology. (1997) Jul;24(2):121-34.
- RAFF, M. C. *Social controls on cell survival and cell dech*. (1992); 397-400.
- REINLI, K., BLOCK, G. *Phytoestrogen content of foods: a compendium of literature values*. Nutr Cancer. (1996);26(2):123-48. Review.
- RENAUD, S., De LORGERIL, M. *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet. (1992) Jun 20;339(8808):1523-6.
- RIMM, E. B., KATAN, M. B., ASCHERIO, A., et al. *Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals*. Ann Intern Med. (1996) Sep 1;125(5):384-9.
- RODRÍGUEZ – BERNALDO DE QUIRÓS, A.: *HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging essay*, 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.
- ROUSSEFF, R. L., MARTIN, S. F., YOUTSEY, C. O. *Quantitative survey of narirutin, naringin, heperidin, and neohesperidin in Citrus*. J. Agric. Food Chem. (1987); 35:1027-1030.
- ROUSSOU, I.; LAMBROPOULOS, I.; PAGOULATOS, G. N.; ROUSSIS, I. G. *Decrease of heat shock protein levels in hela tumor cells by red wine extracts*. J Agric Food Chem. (2004) Feb 25;52(4):1017-24.

- ROWLAND, I., FAUGHNAN, M., HOEY, L., WAHALA, K., WILLIAMSON, G., CASSIDY, A. *Bioavailability of phyto-oestrogens*. Br J Nutr. (2003) Jun;89 Suppl 1:S45-58. Review.
- ROY, M. K., et al., *ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content*. Int J Food Sci Nutr. 2010 Mar;61(2):109-24.
- SALUCCI, M., STIVALA, L. A., MAIANI, G., BUGIANESI, R. a VANNINI, V. *Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2)*. Br J Cancer. (2002) May 20;86(10):1645-51.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. Ed. Col. Spr. Har. Lab., New York, (1989). 1832s.
- SANTOS-BUELGA, C. & SCALBERT, A. *Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health*. J. Food Sci. Agric (2000). 80: 1094–1117.
- SAXENA, H. O., FARIDI, U., SRIVASTAVA, S., KUMAR, J.K., et al. *Gallic acid-based indanone derivatives as anticancer agents*. Bioorg Med Chem Lett. (2008) Jul 15;18(14):3914-8. Epub 2008 Jun 14.
- SCALBERT, A. a WILLIAMSON, G. *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. J. Nutr., 130, (2000), 2073 – 2085.
- SCALBERT, A., JOHNSON, I., SALTMARSH, M., *Dietary polyphenols and Health: Proceedings of the 1st international conference on polyphenols and health* (2005), American Society for Clinical Nutrition.
- SCHAEFFER, W. I. *Terminology associated with cell, tissue, and organ culture, molecular biology, and molecular genetics*. Tissue Culture Association Terminology Committee. In Vitro Cell Dev Biol. (1990) Jan;26(1):97-101.
- SCHWARTZMAN, R. A., CIDLOWSKI, J. A. *Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death*. Endocrine Rev. University of North Carolina at Chapel Hill Chapel Hill. (1993); 14, 133.
- SERAFINI, M., GHISELLI, A., FERRO-LUZZI, A. *In vivo antioxidant effect of green and black tea in man*. Eur J Clin Nutr. (1996) Jan;50(1):28-32.

- SESSO, H. D., GAZIANO, J. M., LIU, S., et al. *Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women*. Am J Clin Nutr. (2003) Jun;77(6):1400-8.
- SHAHIDI, F., NACZK, M. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications* (1995) Technomic Publishing Co. Inc Lancaster. 331 s. ISBN: 1566762790.
- SHEN, Y., SHENK, T. E. *Viruses and apoptosis*. Curr Opin Genet Dev 5, Princeton University, New Jersey 08544-1014 (1995); 105–111.
- SHIH, H., PICKWELL, G. V. a QUATTROCHI, L. C. *Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer*. Arch Biochem Biophys. (2000) Jan 1;373(1):287-94.
- SINGLETON, V. L. *Naturally occurring food toxicants: Phenolic substances of plant origin common in foods*. Adv Food Res. (1981);27:149-242. Review.
- SOCHOR, J., et al. *Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages*. Molecules. (2010) Nov 29;15(12):8618-40.
- SOSULSKI, F., KRYGIER, K., HOGGE, L. *Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours*. J Agric Food Chem (1982); 30:337–40.
- SOUCI, S. W., FACHMANN, W., KRAUT, H. *Food Composition and Nutrition Tables*. (1986) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart, Germany.
- SPANOS, G. A., WROLSTAD, R. E. *Phenolics of apple, pear, and white grape juice and their changes with processing and storage: a review*. J. Agric. Food Chem. (1992); 40:1478-1487.
- 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.
- STEINMETZ, K. A., POTTER, J. D. *Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review*. J Am Diet Assoc. (1996) Oct;96(10):1027-39. Review.
- STICH, H. F. *The beneficial and hayardous effects of simple phenolic compounds*. Mutat Res. (1991) Mar-Apr;259(3-4):307-24. Review.
- 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 .
- ŠÁRŠÚNOVÁ M., TÖLGYESSY : *HPLC in Pharmacy and biochemistry*, 3. Vyd.. A. Hüthling Buch Verlag, Heidelberg (1990) 335s.
- TÁBORSKÁ, E. *Biochemie I: semináře*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita (2005). 88 s. ISBN 8021030569.
- TOMAS-BARBERAN, F. A., CLIFFORD, M. N. *Flavanones, chalcones and dihydrochalcones—nature, occurrence and dietary burden*. J Sci Food Agric (2000); 80:1073–80
- TOZER, B. T., & PRIT, S. J. *Suspension culture of mammalian cells and macromolecular growth promoting fractions of calf serum*. Nature. (1964) Jan 25;201:375-8.
- TROWELL, O. A. *The culture of mature organs in a synthetic medium*. Exp Cell Res. (1959) Jan;16(1):118-47.
- UNCHERN, S. *Basic techniques in animal cell culture*. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences. (1999).
- Van FURTH, R., Van YWET, T. L. *Immunocytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells*. J Immunol Methods. (1988) Apr 6;108(1-2):45-51.
- VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. *Chemie potravin II.*, Vyd. 3., Tábor: OSSIS (2009) 644s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- VERMES, I., HAANAN, C. *Apoptosis and programmed cell death in health and disease*. Adv. Clin. Chem. (1994); 31, 177.
- WAYMOUTH, C. *Osmolality of mammalian blood and of media for culture of mammalian cells*. In Vitro. (1970) Sep-Oct;6(2):109-27. Review.
- WESSELLS, J., YAKAR, S., JOHNSON, P. F. *Critical prosurvival roles for C/EBP β and insulin-like growth factor I in macrophage tumor cells*. Mol Cell Biol. (2004) Apr;24(8):3238-50. PubMed PMID: 15060147.
- WILLIAMSON, G., MANACH, C. *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 97 bioavailability studies*. Am J Clin Nutr. (2005) Jan;81(1 Suppl):243S-255S. Review.

- WRIGHT, W. E., SHAY, J. W. *Historical claims and current interpretations of replicative aging*. Nat Biotechnol. (2002) Jul;20(7):682-8. Review.
- WYLLIE, A. H., KERR, J. F. R., CURRIE, A. R. *Cell Death: The Significance of apoptosis*. International Review of cytology (2008).
- YAMADA K. M., & GEIGER, B. *Molekular interactions in cell adhesion complexes*. Cur. Opin. Cell Biol. (1997) 9: 76-85.
- YEH, C.T., HUANG, S.M. a YEN, G.C. *Induction of phenolsulfotransferase Expression by phenolic acids in human hepatoma HepG2 cells*. J Agric Food Chem. (2005) Jun 15;53(12):4766-73.
- YOCHUM, L., KUSHI, L. H., MEYER, K., et al. *Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women*. Am J Epidemiol. (1999) May 15;149(10):943-9. Erratum in: Am J Epidemiol 1999 Aug 15;150(4):432.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
PDGF	Platelet-derived growth factor- krevní destičky odvozené od růstového faktoru
EGF	Epidermal growth factor (růstový faktor)
NGF	Nerve growth factor (růstový faktor)
ATP	Adenosintrifosfát
DHT	Dihydrotestosteron
HaCaT	Lidské keratinocyty
HepG2	Hepatocyty
NIH/3T3	Myší fibroblasty
CDK	proteinkináza regulovaná cyklinem (cyclin dependent kinase)
SD	Standard deviation (směrodatná odchylka)
PhC	Phenolic Compounds (polyfenoly)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromid (test cytotoxicity)
UV	Ultrafialové záření
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ATCC	American type culture collection

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec kumarinu.....	12
Obrázek 2: Strukturní vzorec: A. Kyselina skořicová, B. Kyselina kávová, C. Kyselina ferulová	15
Obrázek 3: Kyselina chlorogenová.....	16
Obrázek 4: Strukturní vzorec flavanu.....	17
Obrázek 5: Obecná struktura hlavních flavonoidních látek.....	18
Obrázek 6: Strukturní vzorec flavonu.....	18
Obrázek 7: Strukturní vzorec kvetenu.	19
Obrázek 8: Strukturní vzorec kyanidinu.....	19
Obrázek 9: Strukturní vzorec flavanonu	20
Obrázek 10: Strukturní vzorec kvercetinu	24
Obrázek 11: Strukturní vzorec katechinu.	25
Obrázek 12: Strukturní vzorec proanthokyanidinu A.....	26
Obrázek 13: Strukturní vzorec genisteinu	27
Obrázek 14: Strukturní vzorec sanidinu	27
Obrázek 15: Strukturní vzorec resveratrol.....	27
Obrázek 16: Strukturní vzorec hydroxytyrosolu a oleuropeinu.....	28
Obrázek 17: Schéma buněčného cyklu.....	34
Obrázek 18: Schéma průběhu mitózy.....	35
Obrázek 19: Postup změn, které vedou k nekróze buňky.....	38

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení polyfenolů.....	14
Tabulka 2: Obsah polyfenolů v potravinách a nápojích (mg)	22
Tabulka 3: Vzorky a důležité látky v nich.....	32
Tabulka 4: Některé růstové faktory a jejich funkce.....	37
Tabulka 5: Vliv extraktů z <i>S. nigra</i> na HaCaT (průměr ± SD).....	54
Tabulka 6: Vliv extraktů z <i>A. schoenoprasum</i> na HaCaT (průměr ± SD).....	56
Tabulka 7: Vliv extraktů z <i>R. acetosa</i> na HaCaT (průměr ± SD).....	58
Tabulka 8: Vliv extraktů z <i>T. repens</i> na HaCaT (průměr ± SD).	59
Tabulka 9: Vliv extraktů z <i>S.pratensis</i> na HaCaT (průměr ± SD).....	61
Tabulka 10: Vliv extraktů z <i>V. arvensis</i> na HaCaT (průměr ± SD).....	63
Tabulka 11: Vliv extraktů z <i>S. nigra</i> na HepG2 (průměr ± SD).....	65
Tabulka 12: Vliv extraktů z <i>A. schoenoprasum</i> na HepG2 (průměr ± SD).....	67
Tabulka 13: Vliv extraktů z <i>R. acetosa</i> na HepG2 (průměr ± SD).....	69
Tabulka 14: Vliv extraktů z <i>T. repens</i> na HepG2 (průměr ± SD).	70
Tabulka 15: Vliv extraktů z <i>S. pratensis</i> na HepG2 (průměr ± SD).....	72
Tabulka 16: Vliv extraktů z <i>V. arvensis</i> na HepG2 (průměr ± SD).....	74
Tabulka 17: Vliv extraktů z <i>S. nigra</i> na NIH/3T3 (průměr ± SD).....	76
Tabulka 18: Vliv extraktů z <i>A. schoenoprasum</i> na NIH/3T3 (průměr ± SD).....	77
Tabulka 19: Vliv extraktů z <i>R. acetosa</i> na NIH/3T3 (průměr ± SD).....	79
Tabulka 20: Vliv extraktů z <i>T. repens</i> na NIH/3T3 (průměr ± SD).	81
Tabulka 21: Vliv extraktů z <i>S. pratensis</i> na NIH/3T3 (průměr ± SD).....	83
Tabulka 22: Vliv extraktů z <i>V. arvensis</i> na NIH/3T3 (průměr ± SD).	85

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. nigra</i> 4. den (průměr ± SD).	55
Graf 2: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. nigra</i> 6. den (průměr ± SD).	56
Graf 3: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>A. schoenoprasum</i> 4. den (průměr ± SD).	57
Graf 4: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>A. schoenoprasum</i> 6. den (průměr ± SD).	57
Graf 5: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>R. acetosa</i> 4. den (průměr ± SD).	58
Graf 6: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>R. acetosa</i> 6. den (průměr ± SD).	59
Graf 7: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>T. repens</i> 4. den (průměr ± SD).	60
Graf 8: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>T. repens</i> 6. den (průměr ± SD).	60
Graf 9: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. pratensis</i> 4. den (průměr ± SD).	61
Graf 10: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. pratensis</i> 6. den (průměr ± SD).	62
Graf 11: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>V. arvensis</i> 4. den (průměr ± SD).	63
Graf 12: Proliferace HaCaT, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>V. arvensis</i> 6. den (průměr ± SD).	64
Graf 13: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. nigra</i> 7. den (průměr ± SD).	65
Graf 14: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. nigra</i> 11. den (průměr ± SD).	66
Graf 15: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>A. schoenoprasum</i> 7. den (průměr ± SD).	68
Graf 16: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>A. schoenoprasum</i> 11. den (průměr ± SD).	68

Graf 17: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>R. acetosa</i> 7. den (průměr ± SD).	69
Graf 18: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>R. acetosa</i> 11. den (průměr ± SD).	70
Graf 19: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>T. repens</i> 7. den (průměr ± SD).	71
Graf 20: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>T. repens</i> 11. den (průměr ± SD).	71
Graf 21: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. pretensis</i> 7. den (průměr ± SD).	73
Graf 22: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. pretensis</i> 11. den (průměr ± SD).	73
Graf 23: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>V. arvensis</i> 7. den (průměr ± SD).	75
Graf 24: Proliferace HepG2, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>V. arvensis</i> 11. den (průměr ± SD).	75
Graf 25: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. nigra</i> 4. den (průměr ± SD).	76
Graf 26: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. nigra</i> 6. den (průměr ± SD).	77
Graf 27: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>A. schoenoprasum</i> 4. den (průměr ± SD).	78
Graf 28: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>A. schoenoprasum</i> 6. den (průměr ± SD).	79
Graf 29: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>R. acetosa</i> 4. den (průměr ± SD).	80
Graf 30: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>R. acetosa</i> 6. den (průměr ± SD).	81
Graf 31: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>T. repens</i> 4. den (průměr ± SD).	82
Graf 32: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>T. repens</i> 6. den (průměr ± SD).	82

Graf 33: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. pratensis</i> 4. den (průměr ± SD).....	84
Graf 34: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>S. pratensis</i> 6. den (průměr ± SD).....	84
Graf 35: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>V. arvensis</i> 4. den (průměr ± SD).....	85
Graf 36: Proliferace NIH/3T3, vyjádřená hodnotou absorbance, za přítomnosti extraktů z <i>V. arvensis</i> 6. den (průměr ± SD).....	86