

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Vliv extraktů z ovoce a zeleniny na produkci NO u RAW 264.7 buněk

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Linda Hadincová

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Prohlášení: Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv extraktů z ovoce a zeleniny na produkci NO u RAW 264.7 buněk" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne: 9.4.2015

.....

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce panu doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. (Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky), za jeho cenné rady a odborné vedení. Poděkování patří také panu Ing. Ivo Doskočilovi (Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky) za odborné vedení experimentální práce.

Vliv extraktů z ovoce a zeleniny na produkci NO u RAW 264.7 buněk

Souhrn

Současný trend zaměřený na zdravý životní styl nahrává zvýšení spotřeby ovoce a zeleniny přítomné v potravě. Ovoce a zelenina mají předpoklad hrát důležitou úlohu v současných jídelničkách jako hlavní zdroj rostlinných fenolových sloučenin, kterým jsou připisovány antioxidační, anti-proliferační a protizánětlivé vlastnosti. Mezi formy příjmu se v poslední době stávají nejrůznější šťávy, džusy, koktejly, nejlépe připravené doma z čerstvých surovin. Jedná se o snadný a rychlý způsob příjmu rostlinných fenolových sloučenin, které jsou schopny zhaset volné radikály a působit preventivně proti kardiovaskulárním onemocněním, arterioskleróze, nádorovým onemocněním a mnoha dalším. Takovým volným radikálem je i oxid dusnatý (NO) přítomný při zánětlivých onemocněních zejména v makrofázích.

Tato diplomová práce se zabývá vlivem ovocných a zeleninových extraktů na produkci oxidu dusnatého, která byla zjišťována na buněčné linii myších makrofágů RAW264.7. Buněčná linie byla stimulována lipopolysacharidem (LPS), získaným z gram-negativních bakterií, který společně s buněčnými liniemi podporuje vznik NO v tkáních. Ke stimulované buněčné linii byly přidány vzorky ovocných a zeleninových extraktů a následně byla sledována schopnost inhibice produkce NO buňkami vlivem působení látek obsažených v aplikovaných extraktech. Ze zkoušených vzorků ovocných extraktů nejvyšší schopnost inhibice produkce NO při koncentraci 1000 µg/ml vzorek jablka, schopný inhibovat produkci NO o 36 % a ze zeleniny vzorek extraktu z brokolice, který inhiboval produkci NO o 21 % více ve srovnání s kontrolním vzorkem. Z výsledků je patrné, že některé ovocné a zeleninové extrakty jsou schopny inhibovat produkci NO na buněčné linii RAW264.

Klíčová slova: oxid dusnatý (NO); buněčná linie RAW 264.7; ovocné extrakty, zeleninové, extrakty, volné radikály, produkce inhibice NO

Effect of fruit and vegetable extracts on NO production in RAW 264.7 cells

Summary

The current trend focused on healthy lifestyle assists to an increase of consumption of fruit and vegetables present in the diet. Fruit and vegetables have a premise to play an important role in current diet as the main source of plant phenolic compounds, which are attributed to the antioxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory characteristics. Among the forms of intake has recently become a variety of juices, cocktails, best prepared at home from fresh ingredients. This is an easy and fast way of intake of plant phenolic compounds which are able to quench free radicals and act preventively against cardiovascular disease, arteriosclerosis, cancer and many others. Such free radical is a nitric oxide (NO) present during inflammatory diseases especially in macrophages.

This thesis deals with the effect of fruit and vegetable extracts on nitric oxide production, which was detected on the cell line RAW264.7 murine macrophages. The cell line was stimulated with lipopolysaccharide (LPS) derived from gram-negative bacteria, which together with cell lines supports the formation of NO in the tissues. The samples of fruit and vegetable extracts were added to stimulated cell line, subsequently was monitored ability of NO production inhibition by cells under the influence of substances contained in extracts applied. There was found, from tested fruit extracts, the highest ability to inhibit NO production in a concentration of 1000 micrograms / ml by sample of apple extract, which has capability of inhibition NO production by 36%. The sample of vegetable extract of broccoli inhibited NO production by 21% compared to a control sample. The results show that certain fruit and vegetable extracts are capable of inhibiting NO production by cell line RAW264.

Keywords: nitric oxide (NO), cell line RAW 264.7, fruit extracts, vegetable extracts, free radicals, inhibition of NO production

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární rešerše	9
2.1 Význam ovoce a zeleniny ve výživě.....	9
2.2 Nutričně významné látky v ovoci a zelenině	10
2.2.1 Vlákna.....	10
2.2.2 Vitaminy	12
2.2.3 Rostlinné fenolové sloučeniny.....	14
2.3 Role vybraných látek v ovoci a zelenině v regulaci oxidačního stresu.....	17
2.3.1 Flavonoidy	17
2.4 Význam NO v organismu a jeho role v zánětlivých a oxidačních procesech	20
2.4.1 NO jako marker buněčného stresu.....	22
2.5 Role vybraných látek v ovoci a zelenině v regulaci metabolismu NO	23
2.5.1 Vitaminy	24
2.5.2 Rostlinné fenolové sloučeniny.....	24
3. Materiál a metody	25
3.1 Materiál	25
3.1.1 Rostlinný materiál.....	25
3.1.2 Chemický, biologický a ostatní materiál	25
3.2 Metodika	25
3.2.1 Příprava extraktů.....	25
3.2.2 Kultivace buněčných linií	26
3.2.3 Test inhibice NO.....	26
3.2.4 Stanovení cytotoxicity (MTT test).....	26
3.2.5 Statistické vyhodnocení	27
4. Výsledky.....	28
4.1 Výsledky stanovení inhibice NO	28

4.2	Výsledky cytotoxicity	28
5.	Diskuze	30
6.	Závěr	36
7.	Použitá literatura	37
8.	Seznam zkratk	49
9.	Seznam obrázků	50
10.	Seznam tabulek a grafů	50

1. Úvod

Současná doba se vyznačuje zvyšující se oblibou přechodu na tzv. zdravý životní styl. Ten bývá zaměřen na kombinaci pohybu a vhodného stravovacího režimu, který je bohatý především na ovoce, zeleninu a další složky, jako jsou například luštěniny, ryby atd. A však ovoce a zelenina by měly tvořit převážnou část moderního jídelníčku v kombinaci s ostatními potravinami. V poslední době vzrůstá obliba ovocných a zeleninových šťáv, připravovaných z čerstvých potravin přímo v domácnostech. Džusy obsahují velmi důležitou vlákninu, řadu vitaminů a dalších látek potřebných pro zdraví organismu (Gardner *et al.*, 2000). Mezi tyto látky patří zejména fenolové sloučeniny, kterých jsou džusy významným zdrojem. Tyto fenolové sloučeniny mají antioxidační, antiproliferační a působí preventivně u celé řady onemocnění, jakými jsou například kardiovaskulární onemocnění, nádorová onemocnění, ateroskleróza a protizánětlivé účinky (Zheng *et al.*, 2001). Kromě toho mohou mít i vliv na vznik zánětů, stejně jako například oxid dusnatý (Biesalski, 2007). Oxid dusnatý (NO) vzniká v těle primárně přeměnou aminokyseliny argininu na citrulin. Arginin se poté společně s ostatními aminokyselinami dostává do krevního oběhu. Díky tomu se arginin dostane ke každé buňce a zde se pak část využije na syntézu NO a část na syntézu proteinů (Wiesinger, 2001).

Oxid dusnatý má na organismus jak pozitivní, tak i negativní vliv. Pozitivně působí například na imunitní systém, kardiovaskulární soustavu, vasodilataci cévní stěny a další (Kelm, 1999). Také se podílí na podpoře nervového systému, kde pozitivně působí na paměť a schopnosti učení se (Li *et al.*, 2005). Avšak v případě jeho nadprodukce se může chovat jako volný radikál a zapříčinit tak vzniku zánětlivých onemocnění. Jedním z radikálů, který může vznikat za účasti oxidu dusnatého je tzv. peroxynitrit. Peroxynitrit sám o sobě není přímo volným radikálem, ale má silné oxidační vlastnosti a může působit rovněž jako nitrační činidlo a napadat tak velmi široké spektrum buněk, včetně DNA a bílkovin (Szabo *et al.*, 2007). Formování tohoto radikálu *in vivo* podmínkách je přisuzováno reakcím mezi volnými radikály peroxidu a volnými radikály oxidu dusnatého. Více než radikál NO je právě peroxynitrit zodpovědný také například za nitraci a hydroxylaci tyrozinu. Dochází tím pak ke vzniku hydroxidového anionu a nitroniového kationu, který je pak schopný napadat fenolové sloučeniny (Knapp *et al.*, 2001). Peroxynitrit může představovat rozhodující patogenní mechanismus například při mrtvici, infarktu myokardu, diabetu, chronických zánětlivých onemocněních, rakovině a dalších (Kone, 1997).

2. Literární rešerše

2.1 Význam ovoce a zeleniny ve výživě

Ovoce i zelenina patří mezi bohaté zdroje přírodních látek. Jsou bohatým zdrojem důležitých vitaminů a minerálů (tab. 1), jakými jsou železo, vápník, hořčík a další (Gardner *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2006).

Tab. 1 Nutriční složení s ohledem na vitaminy a minerály ovoce na 100g (Gardner *et al.*, 2000)

Ovoce	Vit A (IU)	Vit B1 (mg)	Vit B2 (mg)	Vit B3 (mg)	Vit B5 (mg)	Vit B6 (mg)	Vit C (mg)	Vláknina (g)	Železo (g)	Draslík (g)	Hořčík (g)
Citrón	29	0,04	0,02	0,1	0,19	0,080	53	0,4	0,6	138	9
Jablko	53	0,01	0,01	0,1	0,06	0,048	6	7	0,2	115	5
Pomeranč	205	0,09	0,04	0,3	0,25	0,060	53	2	0,1	181	10
Jahody	27	0,02	0,07	0,2	0,34	0,059	57	14	0,4	166	10
Banán	81	0,05	0,1	0,5	0,26	0,587	9	3	0,3	396	29
Třešně	214	0,05	0,06	0,4	0,13	0,036	7	1,5	0,4	224	11
Meloun (vodní)	366	0,08	0,02	0,2	0,21	0,144	10	0,3	0,2	116	11
Meruňky	2612	0,03	0,04	0,6	0,24	0,054	6	2,1	0,5	296	8
Hroznové víno	73	0,09	0,06	0,3	0,02	0,110	11	1,7	0,3	185	6
Kiwi	-	0,02	0,01	0,2	-	-	118	2,8	0,4	370	19

Kromě vitaminů a minerálů jsou tyto potraviny zdrojem vlákniny. Tyto látky mohou sloužit k ochraně lidského organismu, například před kardiovaskulárními onemocněními (Woodside *et al.*, 2013), dále také před Alzheimerovou chorobou a nádorovými onemocněními (Liu, 2003).

Některé studie prováděné zejména ve spojených státech, spojují konzumaci ovoce a zeleniny s možnými účinky proti úbytku kostní hmoty v období ženské menopauzy (Macdonald *et al.*, 2004). Další studií, která prováděla výzkum na ženách ve spojení s konzumací zeleniny, bylo zjištěno, že vyšší příjem zeleniny může snižovat rizika vzniku karcinomu tlustého střeva. Výsledkem této studie bylo zjištění, že u žen u nichž činil denní příjem více, jak pět porcí bylo riziko vzniku adenomu menší než u žen s jednou porcí zeleniny denně (Michels *et al.*, 2006). Kromě již zmíněných účinků ovoce a zeleniny se také objevují nové studie, zabývající se přínosem větší konzumace těchto potravin v boji proti chronické obstrukční nemoci plic. Například Van Duyn *et al.* (2000) uvádí jako prevenci proti těmto onemocněním zvýšenou konzumaci listové a brukvovité zeleniny a citrusových plodů.

Důležité pro podporu příjmu ovoce nebo zeleniny jedincem je výchova a to již od raného dětství ke zdravému životnímu stylu. Velkou roli při výběru potravin může hrát sledování televizních reklam, které mohou ovlivňovat výběr jídel (Blanchette *et al.*, 2005). Na tuto problematiku, která se týká právě ovlivnění příjmu ovoce a zeleniny u dětí a dospívajících, bylo vypracováno mnoho studií. Výsledkem bylo zjištění, že podpora rodičů a výchova hraje velkou roli pro podporu zdravého stravování a většího příjmu ovoce či zeleniny (Pearson *et al.*, 2009).

2.2 Nutričně významné látky v ovoci a zelenině

2.2.1 Vlákna

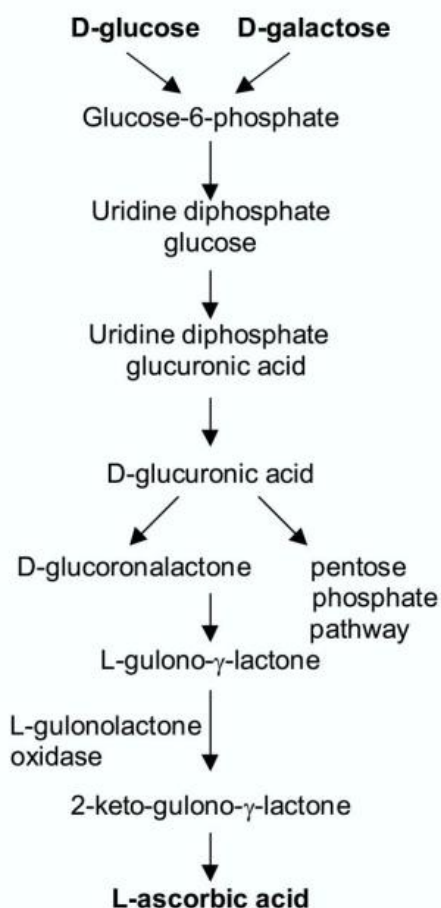
Ovoce i zelenina jsou jedním z důležitých zdrojů vlákniny. Vlákna patří mezi rostlinné polysacharidy, přičemž největší zastoupení z nich mají lignin, pektiny, celulózy a hemicelulózy. Například lignin byl zjištěn ve větším množství v pokrutinách z třešně nebo černého rybízu (Nawirska *et al.*, 2005). Hlavní funkcí vlákniny v těle je její působení v tlustém střevě. Zde, díky přítomnosti vlákniny dochází ke zvětšení objemu stolice, a tím se ředí toxické látky vznikající při trávení (Davis *et al.*, 2006). Absorpční schopnosti vlákniny mají také své uplatnění při vstřebávání sacharidů z přijímané potravy, tím se zpomaluje nárůst hladiny glukózy v krvi. Dále se menší mírou podílí na snižování hladiny cholesterolu. Dokáže vstřebávat žlučové kyseliny, a díky tomu narůstá potřeba organismu tvořit nové kyseliny získané oxidací cholesterolu (Padayatty *et al.*, 2008).

Účinky vlákniny byly předmětem mnoha studií zaměřujících se jak na kardiovaskulární choroby, tak především na nádorová onemocnění. U kardiovaskulárních chorob byla zjišťována možná spojitost s příjmem vlákniny a změnou zdravotního stavu u jedinců, u kterých bylo zvýšené riziko vzniku kardiovaskulární choroby. Jednalo se především o redukci váhy a jídelníčku v příjmu nasycených, polynenasycených mastných kyselin (Galvez *et al.*, 2005). Další studie, která se zabývala touto problematikou, přidělila rizikové skupině osob, ve věkovém rozmezí 69 – 74 let, na dobu 3 měsíců speciální jídelníček ve stylu středomořské kuchyně. Tato strava byla bohatá na ovoce, zeleninu a luštěniny. Výsledky testování prokázaly úbytek tělesné hmotnosti, snížení krevního tlaku, snížení hladiny cholesterolu v krvi. Denní příjem vlákniny se u testovaných jedinců pohyboval v rozmezí 6 – 65 gramů (Estruch *et al.*, 2009). Jako příklad je možné zmínit studii (Pierce *et al.*, 2007), která se zabývala úpravou stravy žen, u kterých byla vysoká pravděpodobnost

výskytu rakoviny prsu, nebo již tuto nemoc dříve prodělaly a byl možný její návrat. Jejich denní dávky ovoce a zeleniny ve stravě byly navýšeny o více jak 65 %, tím se zvýšil i objem příjmu vlákniny. Zároveň byl v jejich stravě snížen příjem tuku. Závěrem této studie bylo zjištění, že u žen, u kterých hrozil návrat rakoviny, bylo sníženo toto riziko průměrně o 5 – 10 % (Pierce *et al.*, 2007) Další studie zaměřená na působení vlákniny zkoumala účinky zvýšeného příjmu na vznik karcinomu tlustého střeva. Výsledkem bylo zjištění, že u osob, které konzumovaly průměrně 2,5 porce ovoce či zeleniny denně, bylo riziko vzniku rakoviny tlustého střeva nižší, než u osob s denním příjmem 1,5 porce (Terry *et al.*, 2001).

2.2.2 Vitaminy

Z vitaminů v ovoci a zelenině má největší zastoupení vitamin C, dále pak komplexy vitaminů B a další. Vitamin C se řadí mezi jeden z nejdůležitějších vitaminů rozpustných ve vodě. Bohužel lidský organismus si tento vitamin nedokáže sám syntetizovat z glukosy nebo galaktosy jako jiní živočichové nebo rostliny. Tudíž ho musí přijímat ve stravě nebo jako doplněk stravy ve formě tablet, či jiných přípravků (Gardner *et al.*, 2000).



Obr. 1: Syntéza kyseliny L-askorbové (Garcia-Diaz *et al.*, 2014)

Vitaminu C jsou přisuzovány nejrůznější fyziologické funkce. Funguje především jako antioxidant a také jako antikancerogen. Denní doporučená dávka vitaminu C pro dospělého člověka činí přibližně 100 – 120 mg (Garcia-Diaz *et al.*, 2014). Díky svým antioxidačním účinkům dokáže eliminovat výskyt volných radikálů kyslíku. Jeho účinky však působí také na redukci oxidované formy LDL cholesterolu. Při tomto působení pak dokáže zvýšit hladinu potřebného HDL cholesterolu. Díky tomu dokáže chránit před vznikem kardiovaskulárních onemocnění a dalším obtížím spojených se zvýšenou hladinou cholesterolu (Wannamethee *et al.*, 2006). Tento vitamin hraje také důležitou roli pro funkci imunitního systému. Při infekci

dochází ke zvýšení proliferace T buněk. Dojde ke zvýšení aktivity fagocytů a tím dojde k ochraně buněčných membrán před případným oxidačním poškozením (Wannamethee *et al.*, 2006).

U vitamínu C byly dále zkoumány možné spojitosti se snížením rizika vzniku diabetu druhého typu. Zvýšená konzumace vitamínu C ve formě ovoce nebo zeleniny by mohla podle provedených studií snižovat možná rizika vedoucí k tomuto onemocnění. Ovšem tato studie je spojená s celkovou úpravou životního stylu, nepostačuje pouze zvýšená konzumace ovoce nebo zeleniny (Harding *et al.*, 2008). Bohužel vitamín C nepatří mezi stabilní látky, takže se jeho obsah může měnit. Jeho obsah klesá se vzrůstající teplotou přípravy ovoce nebo zeleniny, ale také například při tepelné konzervaci vyráběných džusů (Burdurlu *et al.*. Nejšetrnější tepelnou úpravou, při které nedochází až k tak velkým ztrátám je například dušení v páře. Ztráty vitamínu C během skladování za různých teplot byly sledovány na citrusových šťávách, výsledky testování jsou zřejmé z následující tabulky (Tab. 2) (Burdurlu *et al.*, 2006).

Tab. 2: Ztráty vitamínu C během skladování [mg/100 g] (Burdurlu *et al.*, 2006)

Druh ovoce	Teplota [°C]	Skladování (Týdny)									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Pomeranč	28	232,9	242,1	226,4	218,5	214,0	210,0	207,0	194,9	189,9	
	37	232,9	208,0	196,6	138,9	121,5	106,2	91,3	69,0	52,4	
	45	232,9	198,8	153,4	95,2	72,9	56,3	39,3	39,3	38,4	
Citron	28	225,0	198,8	188,8	173,5	166,9	163,8	148,1	139,8	122,8	
	37	225,0	188,3	153,4	118,8	80,4	73,4	101,8	49,8	54,6	
	45	225,0	191,4	152,9	109,2	112,7	80,4	65,9	50,6	45,0	
Grapefruit	28	205,8	194,0	184,4	164,3	160,0	159,1	155,0	139,9	144,0	
	37	205,8	180,0	136,8	119,9	108,3	95,7	82,1	60,7	55,5	
	45	205,8	152,0	115,8	90,9	71,2	44,1	41,9	36,7	31,4	
Mandarinka	28	97,9	95,3	80,4	80,9	81,5	73,0	77,0	70,0	65,0	
	37	97,9	88,7	68,6	60,3	55,0	34,1	38,5	38,4	23,1	
	45	97,9	68,6	51,5	40,6	30,1	24,0	18,7	13,9	14,8	

Aby se předešlo při konzervaci ovoce nebo zeleniny a produktů z nich větším ztrátám na obsahu vitamínu C, byly zkoušeny různé metody, jak tomuto ději zamezit. Jednou z těchto metod bylo i využití působení tepla a ultrazvuku. Tato metoda byla testována na výhoncích řeřichy. Byly zaznamenány menší ztráty vitamínu než při použití metody blanšírování. Došlo totiž ke zkrácení času působení vyšších teplot na danou surovinu, a tím i k menším ztrátám cenných látek (Cruz, *et al.*, 2008). Ztrátám lze předejít kupříkladu skladováním ovoce nebo zeleniny v mrazících teplotách, čímž se zabrání případné oxidaci (Vieira, *et al.*, 2000).

Dalšími z důležitých skupin vitaminů zastoupených v ovoci a zelenině jsou již komplexy vitaminů B. Jedním ze zástupců těchto komplexů je například vitamin B9 neboli kyselina listová. Kyselina listová je ve vodě rozpustný vitamin, který je nezbytný pro syntézu nukleových kyselin, dále pro krvetvorbu a v neposlední řadě je nezbytný také pro vývoj a růst plodu (Martinez-Frias, 2006). Kyselinu listovou můžeme nalézt především v listové zelenině, jako například ve špenátu. Dalšími zdroji zeleniny, kde se tento vitamin vyskytuje, jsou například rajčata, řepa, květák, dýně a další. V ovoci se nejvíce vyskytuje v avokádu, mangu, můžeme ho však nalézt i v malinách či angreštu (Terry, *et al.*, 2001).

2.2.3 Rostlinné fenolové sloučeniny

Kromě vitaminů, které jsou pro zdraví velice důležité, se v ovoci a zelenině nachází řada dalších látek, které mohou mít pozitivní účinky na lidský organismus. Mezi tyto látky se řadí například fenolové sloučeniny. Ve spotřebě jsou z jedné třetiny zastoupeny především fenolové kyseliny a ze zbývajících dvou třetin pak flavonoidy. Denní příjem fenolových sloučenin byl odhadnut na přibližně 1 g denně (Perez-Jimenez *et al.*, 2011).

U bílo-zelené zeleniny čeledi cibulovité obsahující allylové sulfidy, které mohou inhibovat růst rakovinotvorných buněk (Soto-Vaca *et al.*, 2012). Mezi látky, prospěšné v boji proti rakovinnému bujení, můžeme zařadit například fenolové sloučeniny. Tyto látky se řadí mezi přírodní antioxidanty (Nicklett *et al.*, 2013). Jedná se o sekundární metabolity rostlin a jsou rozděleny do čtyř základních skupin. První skupinu tvoří fenolové kyseliny, dále pak jsou to flavonoidy, stilbeny a lignany (Liu, 2004). Fenolové kyseliny se řadí mezi silné antioxidanty. Jsou schopné redukovat hydroperoxydy nenasycených mastných kyselin. Mohou být také nápomocné při léčení aterosklerózy (Liu, 2003). Tyto látky se nejčastěji vyskytují ve slupce a těsně pod ní. Slupka totiž obsahuje nejvíce barviv a dalších složek.

Právě obsažená barviva tvoří velmi rozmanitou škálu fenolových sloučenin. Ovoce i zelenina jich obsahují celou řadu a díky tomu jsou především v asijských zemích barevné druhy ovoce a zeleniny považovány za příznivější pro lidské zdraví (Lin *et al.*, 2007). Například zeleně zbarvená brokolice, růžičková kapusta a další obsahují glukosinoláty, které jsou spojovány se snižováním rizika vzniku rakoviny.

Z barviv jsou nejvíce zastoupeny antokyany (Lo Scalzo *et al.*, 2004). Tyto látky jsou také čím dál více důležité pro potravinářský průmysl jako alternativy k používaným umělým barvivům (Wallace, 2011). Vyšší obsah těchto látek byl například nalezen u třešně (Chaovanalikit a Wrolstad, 2004). Tyto látky jsou ale velice citlivé na změny teplot. Při prováděných pokusech se skladováním ovoce při teplotách $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ došlo ke ztrátám těchto látek o 75 % z celkového obsahu (Lo Scalzo *et al.*, 2004). Antokyany často v interakci s jinými látkami mohou mít pozitivní vliv na zdraví lidského organismu (Lila, 2004). Mohou se podílet na prevenci kardiovaskulárních onemocnění, dále snižovat poškození organismu v důsledku působení oxidačního stresu, nebo také zánětlivými reakcemi organismu. Antokyany obsažené v bobulovitém ovoci mohou zlepšovat například kognitivní funkce mozku, neuronů, zraku i chránit DNA (Zafra-Stone *et al.*, 2007). Také byly prováděny pokusy na rakovinou nemocných myších, kterým byla podávána strava obohacena o rajčata a červené ovoce. Výsledky testů prokázaly pomalé zlepšování jejich zdravotního stavu (Butelli *et al.*, 2008). Další studie zaměřená na přínos antokyanů se zabývala spoluúčinkem směsi antokyanů z bobulového ovoce. Konkrétně z divoké borůvky, brusinek, černého bezu, malin a jahod. V testu se hodnotily jejich antiaterosklerotické schopnosti a cytotoxické schopnosti proti patogenní bakterii *Helicobacter pylori*. Celkově lze toto testování zhodnotit jako prospěšné pro prevenci nebo léčbu zánětlivých onemocnění (Zafra-Stone *et al.*, 2007). Zvýšený příjem antokyanů by mohl mít za následek snižování rizika vzniku kardiovaskulárních chorob. Antokyany při svém působení nejčastěji spoleureagují s jinými fytochemikáliemi vykazujícími synergické biologické účinky (Wallace, 2011).

Za neméně důležité látky z řady barviv lze považovat karotenoidy. Z nich má největší zastoupení β -karoten, což je nejrozšířenějším provitaminem A, a lykopen. U β -karotenu byly zjištěny antioxidační účinky. Ty spočívají v jeho schopnosti inaktivovat excitované molekuly. Jako příklad lze uvést inaktivaci singletového kyslíku (Van Duyn *et al.*, 2000). Při epidemiologických studiích byl prokázán pozitivní přínos karotenů při prevenci proti kardiovaskulárním onemocněním. Na obsah karotenů má vliv také způsob přípravy zeleniny

nebo ovoce a jejich skladování. β -karoten je totiž velice citlivý na působení UV záření a na teplotu (Dutta, *et al.*, 2005).

Stejně jako β -karoten má i lykopen antioxidační účinky. U něj byly dokonce prokázány lepší schopnosti pohlcovat a inaktivovat excitované částice než u zmíněného β -karotenu (Rao *et al.*, 2007). Obsah lykopenu ve vybraných druzích ovoce a zeleniny je uveden v následující tabulce (Tab. 2).

Tab. 2: Obsah lykopenu (Rao *et al.* 2007)

Ovoce	Obsah lykopenu (ng/g)
Meruňka	< 0,1
Růžový grapefruit	33,6
Rajče	8,8-42,0
Meloun vodní	23,0-72,0
Papája	20,0-53,0

U lykopenu byl zjišťován možný podíl na snižování rizik vzniku chronických onemocnění, jako jsou například rakovina nebo kardiovaskulární choroby. Tyto možné účinky byly zkoumány především u rakoviny prsu a prostaty (Agarwal *et al.*, 2000). Tato tvrzení však byla vyvrácena americkou agenturou FDA (U. S. Food and Drug Administration). Ta nenašla žádná věrohodná spojení mezi příjmem této látky a snížením rizika vzniku rakoviny (Kavanaugh, *et al.*, 2007).

Dalšími flavonoidy, které můžeme nalézt v zelenině a ovoci je rutin, kvercetin či kaempferol. Jejich účinky na lidský organismus budou podrobněji popsány v následující kapitole. Rutin se nachází například v červené paprice, rajčatech, chřestu, v jablečné slupce atd. Rutin je přínosný především díky svým schopnostem pozitivně působit při nápravě křehkých kapilárních stěn a při zlepšování pružnosti cév (Van Duyn *et al.*, 2000). Kvercetin můžeme nalézt kapustě, jablkách, červeném víně, borůvkách, cibuli nebo brokolici. Kvercetin je označován jako jeden z nejsilnějších flavonoidů. Významně se podílí na léčbě zánětlivých onemocnění. Dále inhibuje tvorbu krevních sraženin a rozšiřuje působení vitamínu C v organismu. Jeho velkou výhodou je, že nedochází k degradaci působením vysokých teplot při tepelné úpravě ani při působení nízkých teplot při mražení (Wilms *et al.*, 2005).

Poslední jmenovaný flavonoid, kaempferol, je obsažen například ve slupkách a listech pepře, křenu, rajčat, ředkviček. Kaempferol stejně jako kvercetin napomáhá při léčbě zánětlivých onemocnění a zamezuje tvorbě krevních sraženin (Miean *et al.*, 2001).

2.3 Role vybraných látek v ovoci a zelenině v regulaci oxidačního stresu

Ovoce a zelenina tvoří složky potravy, které jsou bohatým zdrojem antioxidantních látek, například flavonoidů. Tyto látky jsou nejčastěji spojovány s kladnými účinky v prevenci proti ischemické chorobě srdeční a mozkovým příhodám a zánětlivým onemocněním (Holt *et al.*, 2009). Tato kapitola se bude věnovat především fenolovým sloučeninám obsaženým v ovoci a zelenině.

2.3.1 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu fenolových sloučenin. Jedná se o sekundární metabolity rostlin, které mají vliv na barvu a chuť rostlin. Jejich chemická struktura je tvořena dvěma benzenovými jádry spojenými heterocyklickým pyranem. Mezi hlavní skupiny flavonoidů, důležitých pro výživu, se řadí flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, proantokyanidiny, kyanidiny a isoflavonoidy (Cook *et al.*, 1996). Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě tzv. O-glykosidů. To znamená, že obsahují ve své struktuře necukernou část (aglykon) a část cukernou. Nejvíce se jich nachází v hroznovém víně a slupkách citrusových plodů. V čínské medicíně se nejvíce tyto látky přijímají v čajových směsích (Lu *et al.*, 2006). Mezi nejvýznamnější flavonoidy se řadí kvercetin, epigalokatechin galát, naringin, hesperidin a nobiletin (Lu *et al.*, 2006).

Podle epidemiologických studií zabývajících se spojitostí mezi příjmem flavonoidů a výskytem kardiovaskulárních chorob, existuje inverzní vztah. Tyto látky mají největší antioxidantní účinek v plazmě, ale mohou chránit buňky i jinými mechanismy (Ishige, *et al.*, 2001).

Mezi významné přírodní flavonoidy je možné zařadit již výše zmíněný rutin, kvercetin a kaempferol. Rutin se nachází například v červené paprice, rajčatech, chřestu, v jablečné slupce atd. Rutin je přínosný především díky svým schopnostem pozitivně působit při nápravě

křehkých kapilárních stěn a při zlepšování pružnosti cév (Van Duyn *et al.*, 2000). Kromě těchto uvedených přínosů může rutin také pozitivně ovlivňovat a zlepšovat paměť a prostorovou orientaci. Toto tvrzení bylo založeno na studii, která se zaměřila na prostorovou orientaci u krys. Těm byl dávkován toxický trimetyltin, který napadá paměťové buňky a zhoršuje tak orientaci. Výsledky testu, kdy takto postiženým krysám byl podáván rutin, ukázaly pozitivní dopad na postižené jedince. Rutin tedy může poskytnout ochranný účinek proti poškození prostorové paměti a orientaci (Koda, *et al.*, 2008). Antioxidační vlastnosti rutinu byly zkoumány například i ve studii zaměřené na revmatoidní artritidu (RA). Toto zánětlivé autoimunitní onemocnění se projevuje bolestmi kloubů a záněty v oblastech kloubů. Při testování účinků rutinu u pacientů s RA bylo zjištěno, že rutin dokáže inhibovat nadprodukcí volných kyslíkových radikálů vznikajících při tomto onemocnění a proto se může považovat za dobrý prostředek při léčbě (Ostrakhovitch *et al.*, 2001).

Dalším důležitým flavonoidem je kvercetin. Ten můžeme nalézt například v kapustě, jablkách, červeném víně, borůvkách, cibuli nebo brokolici (tab. 3).

Tab. 3: Obsah kvercetinu (Miean *et al.*, 2001)

Druh potraviny	Obsah kvercetinu [mg/l, kg]
cibule	300
Jablka	21-72
Kapusta	100
Červené víno	4-16
Černý a zelený čaj	10-25

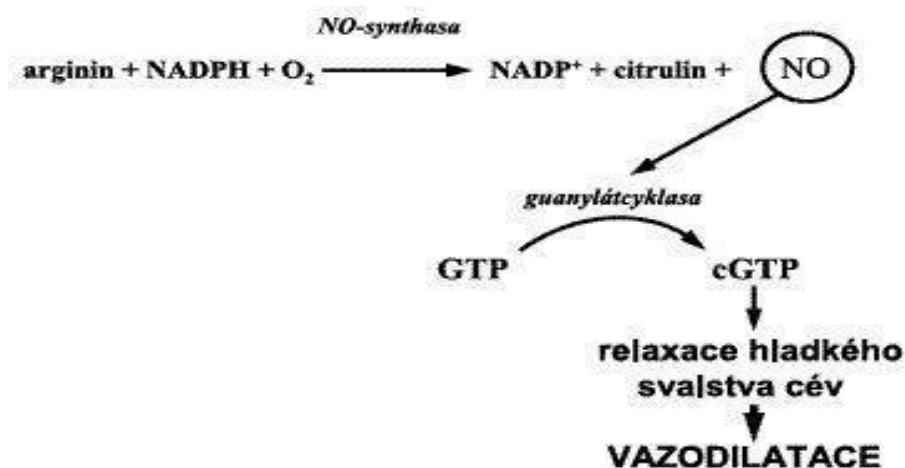
Kvercetin je označován jako jeden z nejsilnějších flavonoidů. Významně se podílí na léčbě zánětlivých onemocnění. Dále inhibuje tvorbu krevních sraženin a rozšiřuje působení vitamínu C v organismu. Epidemiologické studie zaměřené na zkoumání účinků kvercetinu společně s jinými fenolovými sloučeninami obsaženými v červeném víně, mohou snižovat rizika vzniku ischemické srdeční choroby. Experimentální výsledky prokazují, že kvercetin zvyšuje antioxidační kapacitu v plazmě, a tak vykazuje potencionální žaludeční a hepatoprotektivní účinky proti poškození buněk etanole (Yao *et al.*, 2007). Dalšími pozitivními účinky zjištěnými při experimentálních testech byly jeho ochranné účinky nervových buněk před oxidativním stresem. Může být tedy prospěšný i v boji

s Alzheimerovou chorobou. Studie, která se zabývala právě účinkem kvercetinu na nervové buňky, testovala tyto účinky na nervových buňkách. Buňky byly inkubovány společně ještě s vitamínem C proti peroxidovým radikálům po dobu dvou hodin. Výsledky testu prokázaly větší životaschopnost buněk a vyšší ochranný účinek u kvercetinu než u vitamínu C (Heo *et al.*, 2004). Další ochranné účinky kvercetinu byly zkoumány například při experimentech na myších, u kterých byl sledován výskyt poškození slinivky a vznik diabetu (Coskun *et al.*, 2005). Léčba pomocí podávání kvercetinu ukázala ochranný účinek při léčbě diabetu pravděpodobně díky snižování peroxidace lipidů, produkci NO a zvýšené antioxidační schopnosti enzymu (Coskun *et al.*, 2005). Velkým pozitivem kvercetinu je, že se neztrácí při tepelné úpravě ani při působení nízkých teplot při mražení (Wilms *et al.*, 2005).

Poslední jmenovaný flavonoid, kaempferol, je obsažen například ve slupkách a listech pepře, křenu, rajčat, ředkviček. Kaempferol stejně jako kvercetin napomáhá při léčbě zánětlivých onemocnění, zamezuje tvorbě krevních sraženin (Miean *et al.*, 2001). Také je prospěšný v boji proti rakovině. Prováděné studie prokázaly inverzní vztah mezi příjmem tohoto flavonoidu a rakovinou. Dále podporuje obranyschopnost organismu před volnými radikály, které podporují rozvoj rakoviny. Dokáže na jedné straně inhibovat rakovinotvorné buňky, ale také zachovává životaschopnost ostatních buněk (Chen *et al.*, 2013).

2.4 Význam NO v organismu a jeho role v zánětlivých a oxidačních procesech

Oxid dusnatý je velice reaktivní plyn, který se přirozeně tvoří v lidském těle. Řadí se mezi nejdůležitější signální molekuly v lidském organismu. Oxid dusnatý plní v lidském organismu spoustu fyziologických funkcí. Především působí na hladké svalstvo v těle člověka, a tím se podílí na rozšiřování cév, tzv. vazodilataci (Kielstein *et al.*, 2004).

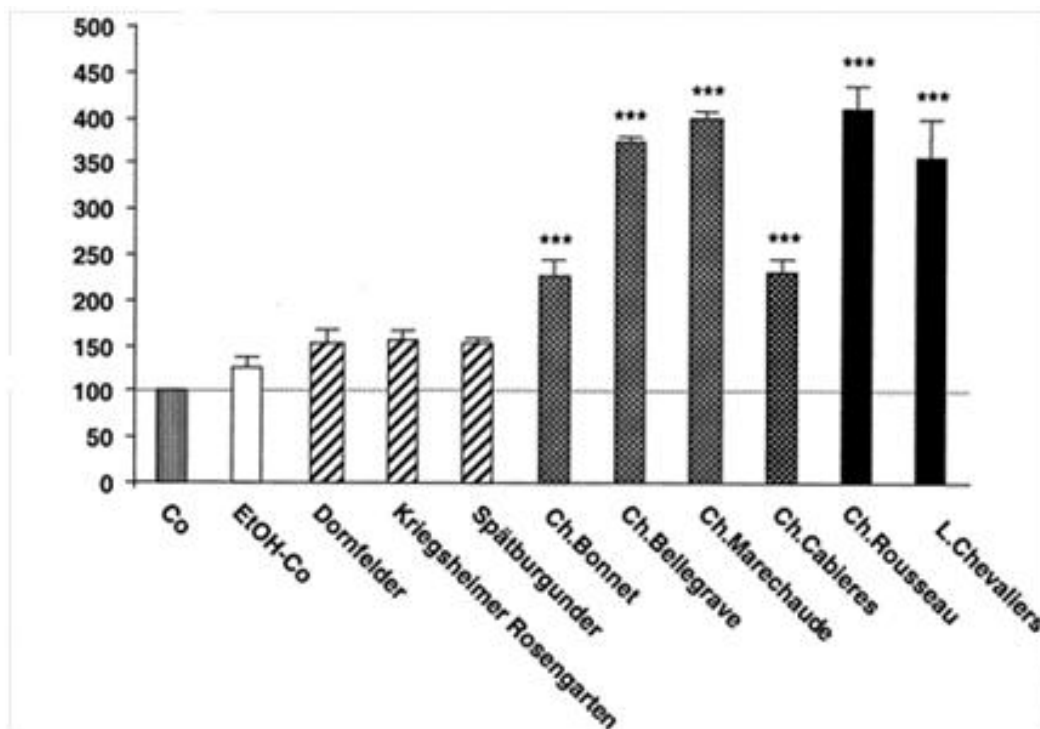


Obr. 2: Vznik vazodilatace (www.zdravi.e15.cz)

Dále se podílí na uvolnění hladké svaloviny střev, což umožňuje posun potravy ve střevech. Pomáhá vyživovat a obnovovat téměř všechny buňky v těle. Příznivě může působit při léčení různých poranění, v boji proti bolesti či zánětech (Moilanen *et al.*, 1997). Oxid dusnatý je také neméně důležitý pro nervovou soustavu. Zde hraje hlavní roli v udržení paměti a schopnosti učení se.

Primární cestou vzniká v těle NO přeměnou argininu na citrulin. Arginin, který je uvolňován v tenkém střevě z proteinů nebo jednoduchých peptidů, je posléze vstřebáván společně s dalšími aminokyselinami dále do krevního oběhu. Díky tomuto procesu se může dostat krví do každé buňky. Zde organismus část argininu využije na syntézu oxidu dusnatého a část na syntézu proteinů. Proces přeměny na oxid dusnatý probíhá prostřednictvím syntáz oxidu dusnatého, neboli NO syntáz (NOS) (Li *et al.*, 2005). Nezbytnými kofaktory této přeměny jsou kyslík a NADPH (Sharma, *et al.*, 2000). Ve spojení s možnými pozitivními účinky oxidu dusnatého na kardiovaskulární systém byly prováděny různé studie. Jako příklad lze uvést studii, která se zabývala přínosem konzumace červeného vína na expresi NOS. Pokus byl prováděn na endotelových buňkách, které byly inkubovány červeným vínem z Francie a Německa. Výsledky ukázaly zvýšenou expresi endoteliálního NOS (eNOS) u

inkubace francouzským vínem oproti tomu inkubace německým červeným vínem neprokázala žádnou nebo jen velmi slabou expresi (Obr. 2). To může vést ke zjištění, že přiměřená konzumace francouzských červených vín může vést k prevenci proti kardiovaskulárním chorobám (Wallerath *et al.*, 2003).



Obr. 3: Vliv červených vín na expresi eNOS [%] (Wallerath *et al.*, 2003)

S vínem a jeho účinnými látkami a expresí eNOS je spojena další studie. Ta se zabývala účinky resveratrolu na zvýšení aktivity eNOS. Výsledek prokázal schopnost resveratrolu zvyšovat obsah eNOS v dlouhodobém působení a také při krátké inkubaci, při působení do dvou minut, zvyšovat produkci bioaktivního NO (Wallerath *et al.*, 2002). Účinky resveratrolu byly také zkoušeny na buňkách myších makrofágů buněčné linie RAW 264.7, kdy byly buňky inkubovány za přídavku resveratrolu, kurkuminu, lipopolysacharidu a etanolu v různých koncentracích. Testování ukázalo vyšší inhibici a vznik NO ve vzorcích s příměsí etanolu v koncentracích 0,1 až 0,75 %. Etanol lépe působil na účinky resveratrolu a jeho přínos pro inhibici NO. Znamená to tedy, že vzájemná interakce etanolu a resveratrolu může vést k pozitivním účinkům na kardiovaskulární systém (Chan *et al.*, 2000).

Ke zlepšení exprese eNOS může dále přispívat i pravidelný pohyb. Dlouhodobý trénink a udržování kondice mohou vést ke zvýšení pružnosti cév a tím udržovat zdraví organismu. U osob, které mají problémy s kardiovaskulárním systémem, mohou ve větší míře vznikat volné kyslíkové radikály. Díky dodržování pravidelného pohybu dochází k lepší stimulaci a vzniku NO. Ten pak vychytává vniklé volné radikály a dochází tak v radikálové rovnováze (Green *et al.*, 2004). Jak již bylo zmíněno, oxid dusnatý se podílí na léčení zánětlivých procesů v těle. Charakteristickým znakem zánětu je zvýšení vaskulární permeability a migrace buněk. Tyto okolnosti jsou spojeny s komplexní interakcí zánětlivých mediátorů cévního endotelu (Cirino, *et al.*, 2003).

NO se může v boji proti zánětlivým onemocněním projevovat jako vlastní molekula nebo může vyvolat zvýšenou produkci leukocytů (Laroux *et al.*, 2001). NO nepůsobí v boji proti zánětlivým procesům přes receptory, ale jeho účinnost závisí na jeho koncentraci a chemické reaktivitě v blízkosti buněk. Cílové buňky jsou totiž naprogramovány tak, aby za daných podmínek začaly reagovat (Cirino, Fiorucci e Sessa, 2003).

V dnešní době se u většiny lidí vyskytuje nedostatek produkce přirozeného oxidu dusnatého, který je potřebný pro udržení zdraví. Díky nezdravému životnímu stylu a prostředí, ve kterém žijeme, je zapotřebí dosažení vyšší hladiny oxidu dusnatého v těle, tak aby v těle mohl fungovat jako signální molekula (Knott *et al.*, 2009).

2.4.1 NO jako marker buněčného stresu

Oxidační stres je stav, kdy dochází k nerovnováze mezi tvorbou reaktivního kyslíku, který vzniká jako vedlejší produkt při okysličování a látkové výměny, a schopností organismu rychle odbourávat a detoxikovat reaktivní meziprodukty (Mittler, 2002).

Oxidační stres zapříčiňuje vznik mnoha nemocem, jako je například ateroskleróza Parkinsonova nemoc, infarkt myokardu, Alzheimerova nemoc a další. Ovšem krátkodobý oxidační stres může být naopak prospěšný. Může hrát roli v prevenci proti stárnutí (Mittler, 2002). NO plní v organismu spoustu pozitivních funkcí, které již byly zmíněny v předchozích kapitolách. Může se ovšem působit také negativně. Při nadprodukcí NO, která vzniká nejčastěji při zánětlivých reakcích nebo v průběhu infekce, může docházet k poškozování buněk, septickému šoku a v některých případech až k smrti. Potencionální spojitost mezi nadprodukcí NO a vznikem septického šoku byla objevena přibližně již před deseti lety. Proto je prováděna řada studií, která jsou zaměřeny na terapeutické působení farmak proti nadprodukcí NO (Giusti-Paiva *et al.*, 2004).

2.5 Role vybraných látek v ovoci a zelenině v regulaci metabolismu NO

Produkce NO je závislá na dostupnosti jeho prekurzoru argininu a na působení různých enzymů NOS. Aktivita různých enzymů NOS může být také ovlivněna faktory, které mají vliv na koncentraci NOS bílkovin a kofaktorů (NADPH, Ca^{2+}). Dietní faktory, které ovlivňují redukcí NO, jsou popsány v tabulce uvedené níže (Tab. 4) (Luiking, *et al.*, 2010). Jak již bylo zmíněno, NO plní v těle mnoho pozitivních funkcí. V nadbytku může naopak vyvolávat negativní účinky na organismus. Tato kapitola je zaměřena na vybrané látky, které se vyskytují v ovoci nebo zelenině a mohli by se případně podílet na regulaci metabolismu a výskytu NO v těle.

Tab. 4: Dietní faktory regulující metabolismus NO (Luiking, *et al.*, 2010)

Dietní faktor	Regulace produkce NO	Vztah k nemoci
Bílkoviny a aminokyseliny		
Arginin	Nízký příjem bílkoviny vede ke snížení produkce NO. Snížení produkce NOS a kofaktorů	Kardiovaskulární abnormality, ohrožení imunitní funkce nedostatkem bílkovin
Citrulin	Stimuluje produkci NO pomocí <i>de novo</i> produkce argininu	Snižuje krevní tlak; pooperační rekonvalescence; důležitý při nedostatku argininu
Sacharidy		
Glukóza	Zdroj NADPH, hyperglykémie inhibuje produkci NO z NOS ve velkých cévách; stimuluje produkci NO v kapilárách	Hyperglykémie u diabetu; patogeneze sítnice; dysfunkce buněk při diabetu
Fruktóza	Inhibice NOS zprostředkovaná produkcí NO; inhibice endoteliálního NO	Narušuje cévní relaxaci; způsobuje hypertenzi; inzulinová rezistence
Vitaminy		
Vitamin C, A, E, kyselina listová, vitamin K a karotenoidů	Zvýšení produkce NO v endoteliálních buňkách; zvýšená produkce NO v nervových buňkách (Vit. A, E); Vit. C reguluje volné kyslíkové radikály	Vit. A, C, E, kyselina listová mají protiatterosklerotické účinky; Vit. C může zlepšovat mikrovaskulární funkce
Ostatní		
Glukosamin (metabolit z glukózy a glutaminu)	Zabraňuje produkci NO snížením dostupnosti NADPH	Může mít vliv na endoteliální rezistenci a kardiovaskulární obtíže u diabetiků a osob postižených obezitou; nápomocný při léčbě zánětlivých onemocnění (artritida)

2.5.1 Vitaminy

U vitaminů byl zkoumán účinek například u vitamínu C. U tohoto vitamínu se studie soustředily na jeho účinek v *in vivo* podmínkách na funkci NOS. Výsledkem studií bylo zjištění, že aplikace vitamínu C může ovlivňovat větší aktivitu endoteliální syntézy eNOS, ale už méně se podílí na zvýšení aktivity indukibilní syntézy iNOS (D'uscio *et al.*, 2003). Společně s vitamínem C, může zvyšovat aktivitu eNOS také kyselina listová. Pravděpodobně se tento proces může odehrávat díky zvyšování koncentrace BH₄, což je přirozeně se vyskytující kofaktor tří aminokyselin, který slouží také jako kofaktor při tvorbě syntáz NO (Forstermann *et al.*, 2006).

2.5.2 Rostlinné fenolové sloučeniny

Z fenolových sloučenin se na regulaci výskytu nebo tvorby NO mohou podílet například flavonoidy. Ty můžeme najít například v červených hroznech révy vinné. Díky jejich antioxidačním účinkům se mohou podílet na prevenci proti kardiovaskulárním onemocněním. Ty jsou často spojovány také s nízkým uvolňováním NO z červených destiček (Olas *et al.*, 2007).

Další látky z řady flavonoidů, které jsou spojovány s ovlivněním metabolismu NO, jsou považovány kaempferol a kvercetin. U těchto látek bylo zjištěno, že by mohli mít vliv na syntázu iNOS (Garcia-Mediavilla *et al.*, 2007). Účinky flavonoidů a dalších fenolových sloučenin na syntázu iNOS a rizika spojená s toxicitou NO byly zkoumány také u čajů. Látky obsažené v zeleném nebo černém čaji mohou mít pozitivní vliv na regulaci toxicity NO. Mají schopnost inhibovat v nadměrném množství volných radikálů NO vznikajících z iNOS. Také se podílí na redukci vzniku peroxynitritu (Paquay *et al.*, 2000). Schopnost redukce zmíněného peroxynitritu byla u čajů zjištěna srovnatelná jako u látek obsažených v červeném víně (Paquay *et al.*, 2000).

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Rostlinný materiál

Stanovení schopnosti inhibice produkce NO bylo provedeno na 9 vzorcích ovoce a 4 vzorcích zeleniny, ze kterých byly připraveny extrakty o koncentraci 1000 µg/ml. Z konzumních druhů ovoce bylo použito jablko, maliny, pomeranč, mandarinka, citrón, třešně, karambola, borůvky, angrešt. Ze zeleniny byla použita bílá ředkev, mrkev, paprika, brokolice.

3.1.2 Chemický, biologický a ostatní materiál

Při analýzách byla použita buněčná linie myších makrofágu RAW 264.7. Dále bylo použito médium RPMI1640, penicilin a streptomycin, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), glukosa, glutamin, lipopolysacharid (LPS), griess reagent, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) (Sigma-Aldrich, CZ). Pro tkáňové kultury byly použity plastové destičky o 24jamkách. Dále serologické pipety, kultivační láhve (Schoeller, CZ).

3.2 Metodika

3.2.1 Příprava extraktů

Zelenina a ovoce byla nejprve zbavena nepoživatelných částí, jako jsou kůry (u citrusů), jádřinec (jablko), semena (paprika), pecky (třešně). Poté byly vzorky odšťavněny na kuchyňském osdřavňovači Catler JE 8010. Získaná čerstvá šťáva byla přefiltrována pomocí vakuové filtrace. Tento proces probíhal vždy celkem 3x dle postupně narůstající hustoty pórů filtračního papíru, který byl použit červený, žlutý a modrý. Ze získaného filtrátu bylo odebráno po 10 ml a převedeno do 15 ml zkumavek typu Falcon. Zkumavky byly následně vloženy do vakuové rotační odparky ScanVac a odpařovány při 960 rpm. Část vzorku z odparky byla použita ke stanovení sušiny na IČ vahách při teplotě 105°C. Zbylé množství odpařeného vzorku bylo zředěno v dimetylsulfoxidu (DMSO) na standardní koncentraci o hodnotě 100 mg/ml pro následné testování. Průměrná hodnota sušiny u vzorků se pohybovala okolo hodnot 77,5 %. Finální výsledky byly ale vztaženy na hodnoty sušiny 100 %.

Koncentrace 1000 µg/ml byla zjištěna experimentálně. Při nižší koncentraci (500 µg/ml) nebylo u extraktů nebylo naměřeno průkazné působení na inhibici NO.

3.2.2 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie RAW264.7 byla pěstovány v RPMI1640 médiu s 10% FBS, 1% roztok penicilinu a streptomycinu, 1% neesenciálních aminokyselin, 2 mmol glutaminu, 2% glukózy. Buňky byly pěstovány v kultivačních láhvích (75 cm²) s 10 ml RPMI1640 media v inkubátoru s řízenou atmosférou obsahující 5 % CO₂ a teplotou 37 °C.

3.2.3 Test inhibice NO

Buňky, naředěné na koncentraci 1×10^5 , byly pipetovány do 96-jamkové destičky v množství 100 µl. Destička byla vložena do CO₂ inkubátoru na dobu 2 hodiny. Po dvou hodinách byly přidány testované vzorky společně s LPS, obsažené ve 100 µl media tak, aby byla dosažena požadovaná koncentrace extraktu (1000 µg/ml) a LPS (1 µg/ml) ve 200 µl. U kontrolních vzorků bylo přidáno pouze LPS. Destička byla vložena do CO₂ inkubátoru po dobu 24 hodin. Poté došlo k odebrání 50 µl supernatantu, který byl v nové 96-jamkové destičce smíchán s 50 µl Griessova činidla. Absorbance byla měřena při 540 nm. Jako standard byl využit dusitan sodný. Obsah NO byl vypočítán pomocí kalibrační křivky dusitanu sodného.

Byla prováděna tři nezávislá opakování u každého vzorku. Každé opakování bylo prováděno v dubletu.

3.2.4 Stanovení cytotoxicity (MTT test)

MTT test je typ kolorimetrického testu, který slouží pro posuzování životaschopnosti buněk. Princip testu je založena na redukci žlutého barviva MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na fialový nerozpustný formazan. Rychlost přeměny žlutého barviva na formazan odpovídá aktivitě dýchacího řetězce a tím je odrážena metabolická aktivita buněk.

Test toxicity probíhal po testu inhibice NO. Z 96-jamkové destičky bylo odstraněno medium a přidáno nové medium s MTT (1 µg/ml) a vloženo do CO₂ inkubátoru na dobu dvou hodin. Následně bylo MTT odstraněno a nahrazeno 100 µl DMSO. Absorbance byla měřena

při 555 nm a 720 nm, jako referenční hodnoty. Procento životaschopných buněk bylo vypočteno v porovnání s neošetřenou kontrolou.

3.2.5 Statistické vyhodnocení

Získané výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka, dále jsou zjištěné hodnoty testovány metodou ANOVA s následným Bonferroniho testem na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Statistické vyhodnocování bylo provedeno v Excelu a IBM SPSS.

4. Výsledky

4.1 Výsledky stanovení inhibice NO

Celkem bylo testováno 13 vzorků ovoce a zeleniny. Ovocných vzorků bylo 9, zeleninové 4. Tyto vzorky byly testovány na inhibiční potenciál oxidu dusnatého. Testování bylo prováděno na buněčné linii RAW264.7. Inhibiční potenciál NO byl měřen jako poměr aktivity NO-reduktázy u vzorků extraktů ošetřených LPS a neošetřených kontrolních vzorků. Inhibiční aktivita na různé úrovni byla prokázána u všech 13 testovaných vzorků. Z ovocných džusů byla nejvýznamnější inhibiční aktivita zjištěna u jablečného extraktu. Extrakt byl získán z odrůdy Golden delicious. Tento extrakt dokázal zvýšit inhibici NO o 36 %. Ze vzorků zeleninových extraktů byla nejvyšší schopnost inhibovat produkci NO (o 21 %) naměřena u extraktu z brokolice.

Naopak nejnižší hodnoty byly zjištěny u vzorků extraktu z angreštu, papriky a bílé ředkve. Pro měření byly používány extrakty o koncentraci 1000 µg/ml.

Výsledky byly statisticky hodnoceny pomocí studentova T-testu při použití statistické významnosti $p \leq 0,05$.

4.2 Výsledky cytotoxicity

Z ovocných a zeleninových extraktů byla naměřena toxicita u 3 ze 13 testovaných vzorků. Konkrétně se jednalo o vzorky extraktů z borůvek, malin a citrónu. U zeleninových extraktů nebyla toxicita zjištěna. Výsledky se měřily při absorbancích 555 a 720 nm. Konečné procento životaschopnosti buněk bylo vypočteno ve srovnání s kontrolními vzorky neošetřenými MTT.

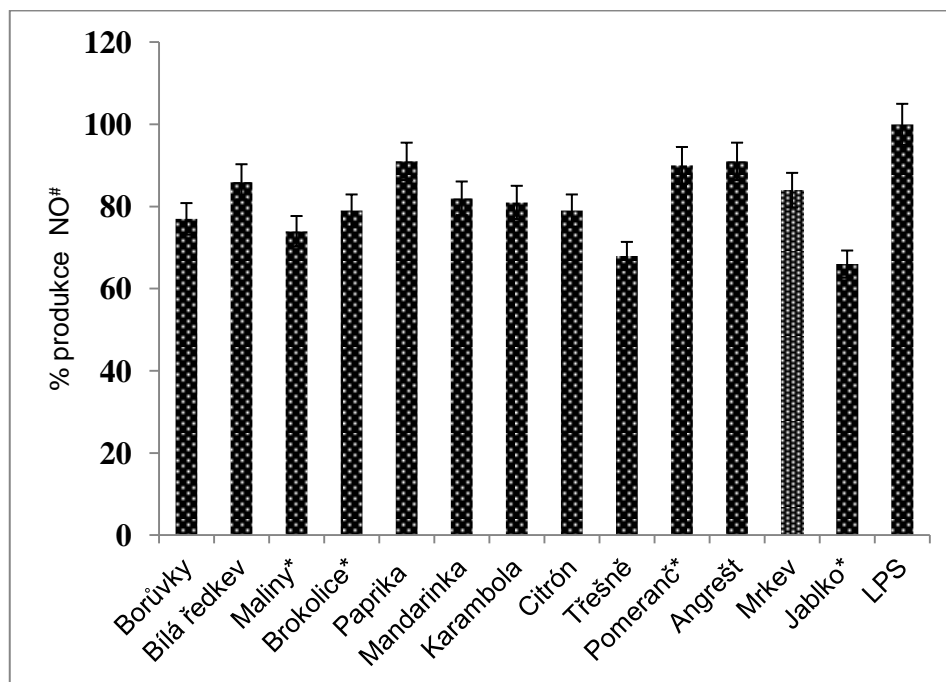
Tab. 5 In vitro oxidační aktivita ovocných a zeleninových extraktů

	Produkce NO [#]	MTT
	(%)	
Borůvky	77	T
Bílá ředkev	86	N
Maliny	74*	T
Brokolice	79*	N
Paprika	91	N
Mandarinka	82	N
Karambola	81	N
Citrón	79	T
Třešně	68	N
Pomeranč	90*	N
Angrešt	91	N
Mrkev	84	N
Jablko	64*	N
LPS	100	N

[#] 1000 µg/mL při statistické významnosti reaktivní procento buněk stimulovaných LPS;

* statistická významnost $p < 0.05$; N- netoxický, T- cytotoxický, koncentrace životaschopnosti buněk snížena na < 90 %

Graf 1: Grafické vyjádření inhibice NO [%]



* 1000 µg/mL při statistické významnosti reaktivní procento buněk stimulovaných LPS;

* statistická významnost $p < 0.05$

5. Diskuze

Chronická onemocnění, ke kterým můžeme řadit například kardiovaskulární choroby, hypertenzi, mozkovou mrtvici, nádorová onemocnění, aterosklerózu a další degenerativní onemocnění, představují v dnešní době pro populaci vážné riziko. Vznik těchto onemocnění bývá často dáván do souvislosti s výskytem škodlivých volných radikálů. Volné radikály jsou nebezpečné především z toho důvodu, že mohou způsobovat tzv. oxidační stres (Valko *et al.*, 2007). Nejčastěji se v těle vyskytují ROS a RNS. Tyto částice se mohou tvořit přirozeně, kdy vznikají během metabolických a fyziologických procesů v těle, kde nejčastějším místem ROS a RNS jsou buněčné mitochondrie, atd., ale mohou se do organismu dostat i z vnějšího prostředí, kde se nejčastěji vyskytují ve výfukových plynech, cigaretovém kouři a dalších látkách (Fang, *et al.*, 2002).

V současné době je snaha o nalezení přírodních látek obsažených v rostlinách, které mohou mít preventivní charakter před účinky ROS a RNS. A tím zabránit vzniku degenerativních chorob. Takové látky lze hromadně označit za antioxidanty schopné zhaset volné radikály (Knight, 2000). Mezi takové antioxidanty patří fytochemikálie a z nich jsou nejdůležitější rostlinné fenolové sloučeniny (jako jsou flavonoidy, flavony) (Balasundram, *et al.*, 2006). Dále kyselina askorbová (vit. C), β -karoten, tokoferoly a mnoho dalších (Fang, *et al.*, 2002). Hlavním zdrojem příjmu fytochemikálií je pro člověka potrava bohatá na ovoce a zeleninu. (La Vecchia, *et al.*, 2001).

Na vliv konzumace ovoce a zeleniny bylo vypracováno několik studií, spojujících pozitivní efekt ovoce a zeleniny na prevenci řady onemocnění spojených s vlivem volných radikálů (Moskovitz, *et al.*, 2002).

Antioxidanty můžeme nalézt v různých rostlinách, včetně již zmíněného ovoce a zeleniny. Právě na tyto druhy potravin se zaměřuje nejvíce studií, jelikož tvoří přirozenou součást lidské stravy a v lepších případech jsou konzumovány pravidelně.

Za nejvíce diskutovanou skupinu látek obsaženou v ovoci a zelenině lze považovat fenolové sloučeniny. Mezi tyto látky se řadí fenolové kyseliny a jejich deriváty, třísloviny, flavonoidy, isoflavonoidy, deriváty stilbenu a jiné (Dimitrios, 2006). Jedná se o látky, jejichž velmi dobré antioxidační schopnosti byly odhaleny teprve před několika desítkami let (Higdon *et al.*, 2003).

Antioxidační vlastnosti fenolových sloučenin by mohly vyplývat z jejich chemické struktury (Quideau *et al.*, 2011). Díky tomu, že v trávicím traktu podléhají mnoha změnám a

přeměňám své struktury, tak mohou vcelku zásadně změnit biologické vlastnosti. Ty mohou buď vést k navýšení antioxidační aktivity nebo k jejímu zeslabení nebo úplné ztrátě. Výsledný efekt fenolových sloučenin při testování v podmínkách *in vivo* je závislý nejen na účinku vzniklých metabolitů, ale i na jejich koncentraci (Tsao, 2010).

Ovšem nemůžeme opomenout ani již zmiňované volné radikály, které do této problematiky patří a jsou také spojené s oxidačním stresem.

Oxidační stres vzniká jako nerovnovážný stav mezi produkcí reaktivních kyslíkových a dusíkových metabolitů a antioxidační kapacitou organismu (Apel *et al.*, 2004). Tento děj je také jednou z příčin vzniku degenerativních onemocnění, jako ateroskleróza, Parkinsonova choroba, kardiovaskulární onemocnění (Jenner, 2003), ale v menší míře může být také prospěšný, například v boji proti předčasnému stárnutí (Finkel *et al.*, 2000).

Nejčastěji se vyskytujícími volnými radikály jsou ROS, a to konkrétně superoxidový radikál, hydroxylový radikál a peroxylový radikál (Raha *et al.*, 2001).

Dalšími hojně se vyskytujícími radikálovými sloučeninami jsou RNS, kam řadíme NO, peroxyinitrit a nitroxid (Apel *et al.*, 2004). Oxid dusnatý je však v přiměřeném množství pro organismus velice důležitou látkou. Podílí se například na fungování hladkého svalstva, kdy způsobuje tzv. vazodilataci. Díky tomuto účinku se mohou rozšiřovat cévy nebo uvolňovat trávicí soustava, což je proces, který je důležitý pro posun potravy dál do střev. Mimo tyto funkce dochází k tvorbě NO také v centrální nervové soustavě, kde by mohl plnit funkci pro utváření nebo zlepšování paměti a schopnosti učit se (Zhou *et al.*, 2009). NO také hraje významnou roli při boji se zánětlivými procesy v těle a oxidačním stresem (Mittler, 2002).

Na účinky NO na organismus bylo vypracováno mnoho studií zabývajících se jednotlivými jeho funkcemi a možnostmi jak tuto látku v těle stimulovat. Za zmínku stojí fakt, že rostlina Noni (*Morinda citrifolia*) obsahuje látky, například velké množství aminokyselin, esenciální mastné kyseliny, vlákninu, vitamin C, které stimulují organismus k větší produkci NO (Basu *et al.*, 2006). Účinné látky na stimulaci produkce NO byly také nalezeny v hojně míře v červeném víně. Jedná se především o fenolové sloučeniny v něm obsažené, jako je například resveratrol. U červeného vína byla zkoumána především schopnost vyprodukovaného NO chránit cévní stěny před aterosklerózou, díky zvýšené produkce endoteliální syntázy eNOS (Leikert *et al.*, 2002).

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv ovocných a zeleninových extraktů na schopnost inhibovat produkci NO tkáňovými buňkami. Testování bylo prováděno na myších makrofázích buněčné linie RAW 264.7. Obdobnou problematikou se zabývá i několik dříve zpracovaných studií. Například studie Choi *et al.*, (2007) testovala inhibiční aktivitu NO u 20 druhů citrusů v závislosti na obsahu flavonoidů v jejich slupkách, kde nejlepší výsledky prokázaly vzorky druhu *Citrus aurantium* L.. Dalším zajímavým výzkumem (Bor, *et al.*, 2006), který stojí za zmínku, bylo testování antioxidační aktivity a schopnosti inhibovat NO u různých druhů zeleniny. Testování bylo prováděno na buněčné linii RAW 264.7, kde bylo ještě zkoumáno poškození DNA. Výsledky této studie prokázaly silné oxidační účinky a schopnosti inhibovat NO především u indického lotosu, hub shiitake nebo lilku. V neposlední řadě je možno se zmínit o studii (Wang *et al.*, 2005), která zkoumala účinky na produkci NO odrůdy cibule *Welsh* také na myších makrofázích a výsledek? V současné době se pro stanovení produkce NO využívá mnoho metod, což může způsobovat komplikace s porovnáváním získaných výsledků. Důležité je také zohlednit způsob vyjádření výsledků, zda byly použity vzorky čisté hmoty, nebo bylo zohledněno množství sušiny a další (Stratil, *et al.*, 2007).

V této studii bylo použito celkem 13 druhů ovoce a zeleniny. Výběr vzorků byl zaměřen na běžně dostupné druhy ovoce a zeleniny konzumované v našich klimatických podmínkách.

Spolu s měřením inhibice NO probíhalo ve vzorcích také testování na životaschopnost buněk pomocí MTT testu. Tento test je založen na redukci žlutého barviva MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid) na fialový nerozpustný formazan. Rychlost tvorby formazanu odpovídá aktivitě dýchacího řetězce a tím je odražena metabolická aktivita buněk. Reakce probíhají na mitochondriální membráně živých buněk (Fotakis *et al.*, 2006). Redukce je závislá na NADPH-dependentních oxidoreduktázách (Pozzolini *et al.*, 2003). Snížená životaschopnost makrofágů byla naměřena pouze u vzorků extraktů z borůvek, malin a citrónu u ostatních zjištěna nebyla.

U všech 13 testovaných vzorků byla zjištěna schopnost inhibovat produkci NO. Nejvyšší schopnost inhibovat produkci NO byla prokázána u vzorku extraktu z jablek, a to o 36 %. Jablka patří mezi jeden z nejoblíbenějších a nejvíce konzumovaných druhů ovoce. Patří mezi velmi hodnotné zdroje zdraví prospěšných látek. Jedná se například o vitamin C, nejrozmanitější antioxidanty, vlákninu a další (Soler, *et al.*, 2009). Antioxidanty, společně s vlákninou mají schopnost chránit molekuly DNA v lidských buňkách, a tím přispívají v boji

například proti rakovině (Janne *et al.*, 2000). Většina těchto důležitých látek se ovšem nachází ve slupce a těsně pod ní, jedná se především o fenolové látky (Wolfe, *et al.*, 2003). Z vitamínů mají v jablkách největší zastoupení vitamín C a E. Tyto látky, jak naznačují mnohé studie, mohou mít pozitivní vliv na prevenci proti ateroskleróze. Vitamín C je také velice prospěšný v boji s volnými radikály. Ve spojení s NO mohou tyto vitamíny zvyšovat jeho produkci v endoteliálních a nervových buňkách a tím přispívat k prevenci například Parkinsonovi nebo Alzheimerovi choroby (Etminan, *et al.*, 2005). Park *et al.* (2000) také testovali produkci NO na myších makrofázích spojenou s flavonoidy obsaženými v jablkách se ziskem uspokojivých výsledků.

Dalším vzorkem extraktu ovoce, který prokázal schopnost inhibovat produkci NO, byl extrakt z třešně. Tento extrakt dokázal zvýšit inhibici NO o 32 %. Třešně patří mezi peckoviny jsou jedním z velmi oblíbených druhů ovoce, spojený s rudě červenou dužninou. Jsou to plody, jejichž dužnina obsahuje velké množství vody. Kromě vody obsahují také ovocné cukry, minerály a vitamíny. Tmavší odrůdy jsou bohatými zdroji například hořčíku, železa, jódu, fosforu a dalších minerálů (McCune *et al.*, 2011). Z vitamínů jsou zde zastoupeny především vitamín A (beta karoten), vitamín P, vitamín C, vitamín E (Ferretti *et al.*, 2010). Třešně působí velmi pozitivně na lidský organismus. Mohou například pomáhat čistit krev, játra nebo ledviny (Jacob *et al.*, 2003). Díky obsahu jódu mají také příznivý vliv na léčbu problému se štítnou žlázou (Ferretti *et al.*, 2010). Nejnovější studie Ghosh *et al.* (2007) naznačují, že by se třešně mohly, díky obsahu antokyanových barviv, podílet na léčbě cukrovky. Přítomné antokyany při laboratorním testování prokázaly schopnost podporovat produkci inzulínu a také snižovat obsah cukru v krvi (Sulaiman *et al.*, 2012). Byly u nich také zkoumány protizánětlivé účinky. Například Kelley *et al.* (2006) ve své práci sledoval účinek konzumace třešně na potlačování zánětlivých procesů v těle. Výsledky testování po 28 dnech ukázaly snížení koncentrace NO v krvi o přibližně 18 %. Tyto vlastnosti mohou být spojeny s obsahem fenolových sloučenin s antioxidačními účinky (Ferretti *et al.*, 2010).

Jedna z nejnižších naměřených hodnot ovocných extraktů v našem testu byla zjištěna u vzorku bílého angreštu (*Ribes grossularia*). Vzorek prokázal schopnost inhibice produkce NO o pouhých 9 %. U angreštu již byly zjištěny antioxidační i možné protizánětlivé účinky, jelikož obsahuje velké množství zdravých prospěšných látek (Poltanov *et al.*, 2009). Například obsah vitamínu C je srovnatelný s citrusovými plody, dále obsahuje cenné kyseliny (vinná, jablečná, citrónová) (Seeram, 2008). Bílé odrůdy však neobsahují velké množství fenolových sloučenin oproti červeným odrůdám, které obsahují antokyanová barviva (Pantelidis *et al.*,

2007). Tyto poznatky by teoreticky mohly být příčinou jeho nižší schopnosti inhibovat NO. Ovšem pro potvrzení tohoto tvrzení je potřeba dalších studií a testování.

Ze zástupců zeleninových extraktů prokázala nejlepší schopnost inhibice brokolice (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) z čeledi brukvovité (*Brassicaceae*), a to o 21 % ve srovnání s kontrolním vzorkem. K podobným výsledkům testování na inhibici NO došel ve své studii například (Kim *et al.*, 1998), kde byla u brokolice naměřena schopnost inhibice o přibližně 25 %. Brukvovitá zelenina obecně je bohatým zdrojem vitaminů, minerálů a glukosinolátů. Významným glukosinolátem obsaženým v brokolici je například glukorafanin (Shapiro *et al.*, 2001). Glukorafanin se díky působení enzymu myrosinasy mění na sulforafan. Tato forma se považuje za jednu z velmi významných látek s protirakovinnými účinky (Clarke, *et al.*, 2008). Mnohé studie naznačují, že brokolice může výrazně chránit lidský organismus před oxidačním stresem, volnými radikály a rakovinotvornými látkami (Murashima *et al.*, 2004). Podle Herr *et al.* (2010) mohou chemické látky obsažené v brokolici přispívat k nápravě poškozené DNA rakovinným bujením. Tuto problematiku zmiňuje také například (Finley, 2003) ve své studii zaměřené na druhy zeleniny, včetně brokolice, bohaté na selen a jejich možný účinek při léčbě nebo prevenci proti rakovině.

Naopak nepříliš dobrou schopnost inhibovat produkci NO v našem testování prokázala například bílá ředkev (*Raphanus sativus*). Kde u bílé ředkve bylo dosaženo schopnosti inhibice NO přibližně o 14 %. K podobným výsledkům (16 %) došel ve své studii například (Kim *et al.*, 1998) kdy testoval různé druhy zeleniny, včetně zmíněné ředkve, na inhibici NO na buněčné linii RAW 264.7. Tyto hodnoty můžeme například přičíst nízkému obsahu antokyanových barviv, jelikož ředkev roste pod zemí a konkrétně v bílé ředkvi tato barviva nenalezneme (Il Park *et al.*, 2011).

Snaha stanovovat inhibiční schopnost nejrůznějších druhů ovoce a zeleniny vychází především z dříve provedených studií, které udávají, že jsou tyto složky potravy velmi cenným zdrojem látek napomáhajícím v boji proti různým degenerativním onemocněním (Liu, 2003).

V současné době jsou na trhu dostupné nejrozmanitější druhy ovoce a zeleniny. Dokonce i světová zdravotnická organizace, v reakci na pozitivní přínosy konzumace těchto potravin, vydala doporučení na zvýšení denního příjmu ovoce a zeleniny na 400 g (WHO, 2003). V České republice byl například v roce 2011 zaznamenán pokles spotřeby ovoce o 7 %

na přibližně 84 kg na osobu. U zeleniny tento pokles činil 2 % na 80 kg na osobu (ČSÚ, 2011). V poslední době však spotřeba ovoce i zeleniny mírně narůstá.

Mezi nejoblíbenější a také nejvíce konzumované druhy ovoce v ČR patří bez pochyby jablka. Například v roce 2011 činila spotřeba jablek, přepočteno na osobu za rok, téměř 20 kg. Ze zeleniny v konzumaci vítězí rajčata (MZe, 2014). Extrakt z jablek prokázal v rámci našeho pokusu velmi dobrou schopnost inhibovat produkci NO a ze všech ovocných extraktů poskytl nejlepší výsledek. Ze zjištěných výsledků se lze domnívat, větší spotřeba jablek by mohla přispívat k větší prevenci před nejrůznějšími výše uvedenými onemocněními. Extrakt z rajčete nebyl předmětem této studie a nelze proto porovnat jejich schopnost inhibice NO s jinými studiemi, například se studií, kterou provedl (Rafi, Yadav e Reyes, 2007) se svým týmem a jejíž výsledky prokázaly možný pozitivní účinek lykopenu, obsaženého v rajčatech, v boji se zánětlivými onemocněními.

Existuje řada odborných studií a článků, které se týkají pozitivních účinků látek obsažených v ovoci a zelenině na lidský organismus, ovšem často chybí jednoznačné dostatečné důkazy, které by potvrdily tvrzení, že konkrétní zkoumaná látka je příčinou kladných výsledků studie či nikoliv. Vzhledem k tomu, že většina studií je prováděna v *in vitro* podmínkách, nelze s určitostí potvrdit, že zkoumané látky a jejich účinky budou shodné v podmínkách *in vivo*.

Ačkoliv předkládaná studie prokázala schopnost inhibovat produkci NO ovocnými i zeleninovými extrakty, je žádoucí tyto účinky prověřit i za podmínek *in vivo* tak, aby bylo snazší určit výživové doporučení a spolehlivěji určit hlavní látky, které působí pozitivní výsledky.

Na druhou stranu, i bez ověřování výsledků *in vivo* je zřejmé, že ovoce i zelenina jsou velmi bohatým, přírodním zdrojem nutričně cenných látek. Proto správná míra konzumace čerstvého ovoce a zeleniny nebo z nich připravených šťáv celkově přispívá k lepšímu zdravotnímu stavu.

6. Závěr

Cílem této práce bylo zhodnotit schopnost ovocných a zeleninových extraktů ovlivňovat produkci oxidu dusnatého buněčnou linií myších makrofágů RAW 264.7. Testy se probíhaly prováděny za použití 13 vzorků extraktů z různých druhů ovoce a zeleniny. Z ovocných extraktů prokázal nejvyšší schopnost inhibice produkce NO, o 36 % při koncentraci extraktu 1000 µg/ml, vzorek jablečného extraktu. Ze zeleninových extraktů poskytl nejlepší výsledek vzorek brokolicového extraktu se schopností inhibice 21 %. Naopak nejnižší schopnost inhibice produkce NO poskytly vzorky extraktů z angreštu a papriky.

Práce popisuje pozitivní zdravotní a nutriční přínos konzumace ovoce a zeleniny a látek v nich obsažených. Jedná se především o vitaminy, fenolové sloučeniny a další. Kromě zdravotních přínosů byl u těchto látek také uveden vliv na produkci oxidu dusnatého. U oxidu dusnatého byl vysvětlen jeho vliv na organismus jak v pozitivním, kdy se podílí na aktivaci hladkého svalstva a podpoře nervové soustavy, tak v negativním slova smyslu, kde v nadměrném množství může působit jako volný radikál a podílet se na vzniku například zánětlivých onemocnění.

7. Použitá literatura

- Agarwal, S., Rao, A. V. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*. 163(6). 739-744.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55. 373-399.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99(1). 191-203.
- Basu, S., Hazra, B. (2006). Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *in vitro* and *ex vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. *Phytotherapy Research*. 20(10). 896-900.
- Biesalski, H. K. (2007). Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 10(6). 724-728.
- Blanchette, L., Brug, J. (2005). Determinants of fruit and vegetable consumption among 6-12-year-old children and effective interventions to increase consumption. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 18(6). 431-443.
- Bor, J. Y., Chen, H. Y., Yen, G. C. (2006). Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(5). 1680-1686.
- Burdurlu, H. S., Koca, N., & Karadeniz, F. (2006). Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *Journal of Food Engineering*. 74(2). 211-216.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H. P., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E., Hall, R. D., Bovy, A. G., Luo, J., & Martin, C. (2008). Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*. 26(11). 1301-1308.
- Chan, M. M. Y., Mattiacci, J. A., Hwang, H. S., Shah, A., & Fong, D. (2000). Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochemical Pharmacology*. 60(10). 1539-1548.

- Chaovanalikit, A., Wrolstad, R. E. (2004). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Journal of Food Science*. 69(1). C67-C72.
- Chen, A. Y., Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*. 138(4).2099-2107.
- Choi, S. Y., Ko, H. C., Ko, S. Y., Hwang, J. H., Park, J. G., Kang, S. H., Han, S. H., Yun, S. H., & Kim, S. J. (2007). Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 30(4). 772-778.
- Cirino, G., Fiorucci, S., Sessa, W. C. (2003). Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(2), 91-95.
- Clarke, J. D., Dashwood, R. H., Ho, E. (2008). Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Letters*. 269(2). 291-304.
- Cook, N. C., Samman, S. (1996). Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 7(2). 66-76.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*.51(2). 117-123.
- Cruz, R. M. S., Vieira, M. C., Silva, C. L. M. (2008). Effect of heat and thermosonication treatments on watercress (*Nasturtium officinale*) vitamin C degradation kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 9(4).483-488.
- d'Uscio, L. V., Milstien, S., Richardson, D., Smith, L., Katusic, Z. S. (2003). Long-term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Circulation Research*. 92(1). 88-95.
- Davis, J. N., Hodges, V. A., Gillham, M. B. (2006). Normal-weight adults consume more fiber and fruit than their age- and height-matched overweight/obese counterparts. *Journal of the American Dietetic Association*. 106(6). 833-840.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*. 17(9). 505-512.

- Dutta, D., Chaudhuri, U. R., Chakraborty, R. (2005). Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Biotechnology*.4(13). 1510-1520.
- Estruch, R., Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D., Basora-Gallisa, J., Ruiz-Gutierrez, V., Covas, M. I., Fiol, M., Gomez-Gracia, E., Lopez-Sabater, M. C., Escoda, R., Pena, M. A., Diez-Espino, J., Lahoz, C., Lapetra, J., Saez, G., Ros, E., Investigators, P. S. (2009). Effects of dietary fibre intake on risk factors for cardiovascular disease in subjects at high risk. *Journal of Epidemiology and Community Health*. 63(7). 582-588.
- Etminan, M., Gill, S. S., Samii, A. (2005). Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Lancet Neurology*. 4(6). 362-365.
- Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. Y. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 18(10). 872-879.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A., Neri, D. (2010). Cherry Antioxidants: From Farm to Table. *Molecules*. 15(10). 6993-7005.
- Finkel, T., Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408(6809). 239-247.
- Finley, J. W. (2003). Reduction of Cancer Risk by Consumption of Selenium-Enriched Plants: Enrichment of Broccoli with Selenium Increases the Anticarcinogenic Properties of Broccoli. *Journal of Medicinal Food*. 6(1).19-26.
- Forstermann, U., Munzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease - From marvel to menace. *Circulation*.113(13). 1708-1714.
- Fotakis, G., . Timbrell, J. A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 160(2). 171-177.
- Galvez, J., Rodriguez-Cabezas, M. E., Zarzuelo, A. (2005). Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49(6). 601-608.
- Garcia-Diaz, D. F., Lopez-Legarrea, P., Quintero, P., Martinez, J. A. (2014). Vitamin C in the Treatment and/or Prevention of Obesity. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 60(6). 367-379.

- Garcia-Mediavilla, V., Crespo, I., Collado, P. S., Esteller, A., Sanchez-Campos, S., Tunon, M. J., Gonzalez-Gallego, J. (2007). The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*. 557(2-3). 221-229.
- Gardner, P. T., White, T. A. C., McPhail, D. B., Duthie, G. G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*. 68(4). 471-474.
- Ghosh, D., Konishi, T. (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 16(2). 200-208.
- Giusti-Paiva, A., Martinez, M. R., Felix, J. V. C., da Rocha, M. J. A., Carnio, E. C., Elias, L. L. K., Antunes-Rodrigues, J. (2004). Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. *Shock*. 21(3). 271-275.
- Green, D. J., Maiorana, A., O'Driscoll, G., Taylor, R. (2004). Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *Journal of Physiology-London*. 561(1). 1-25.
- Harding, A. H., Wareham, N. J., Bingham, S. A., Khaw, K., Luben, R., Welch, A., Forouhi, N. G. (2008). Plasma vitamin C level, fruit and vegetable consumption, and the risk of new-onset type 2 diabetes mellitus - The European Prospective Investigation of Cancer-Norfolk prospective study. *Archives of Internal Medicine*. 168(14). 1493-1499.
- Heo, H. J., Lee, C. Y. (2004). Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7514-7517.
- Herr, I., Buchler, M. W. (2010). Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 36(5). 377-383.
- Higdon, J. V., Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(1). 89-143.

- Holt, E. M., Steffen, L. M., Moran, A., Basu, S., Steinberger, J., Ross, J. A., Hong, C. P., Sinaiko, A. R. (2009). Fruit and Vegetable Consumption and Its Relation to Markers of Inflammation and Oxidative Stress in Adolescents. *Journal of the American Dietetic Association*. 109(3). 414-421.
- Il Park, N., Xu, H., Li, X., Jang, I. H., Park, S., Ahn, G. H., Lim, Y. P., Kim, S. J., Park, S. U. (2011). Anthocyanin Accumulation and Expression of Anthocyanin Biosynthetic Genes in Radish (*Raphanus sativus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(11). 6034-6039.
- Ishige, K., Schubert, D., . Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*.30(4). 433-446.
- Jacob, R. A., Spinozzi, G. M., Simon, V. A., Kelley, D. S., Prior, R. L., Hess-Pierce, B., . Kader, A. A. (2003). Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women. *Journal of Nutrition*. 133(6).1826-1829.
- Janne, P. A., Mayer, R. J. (2000). Primary care: Chemoprevention of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 342(26). 1960-1968.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*. 53. S26-S36.
- Kavanaugh, C. J., Trumbo, P. R., Ellwood, K. C. (2007). The US food and drug administration's evidence-based review for qualified health claims: Tomatoes, lycopene, and cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 99(14). 1074-1085.
- Kelley, D. S., Rasooly, R., Jacob, R. A., Kader, A. A., . Mackey, B. E. (2006). Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *Journal of Nutrition*. 136(4). 981-986.
- Kelm, M. (1999). Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 1411(2-3). 273-289.
- Kielstein, J. T., Impraim, B., Simmel, S., Bode-Boger, S. M., Tsikas, D., Frolich, J. C., Hoeper, M. M., Haller, H., . Fliser, D. (2004). Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation*. 109(2). 172-177.

- Kim, O. K., Murakami, A., Nakamura, Y., Ohigashi, H. (1998). Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. *Cancer Letters*. 125(1-2).199-207.
- Knapp, L. T., Kanterewicz, B. I., Hayes, E. L., Klann, E. (2001). Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and inhibition of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 286(4). 764-770.
- Knight, J. A. (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 30(2). 145-158.
- Knott, A. B., Bossy-Wetzell, E. (2009). Nitric Oxide in Health and Disease of the Nervous System. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11(3). 541-553.
- Koda, T., Kuroda, Y., Imai, H. (2008). Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. *Nutrition Research*. 28(9). 629-634.
- Kone, B. C. (1997). Nitric oxide in renal health and disease. *American Journal of Kidney Diseases*. 30(3). 311-333.
- La Vecchia, C., Altieri, A., Tavani, A. (2001). Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *European Journal of Nutrition*. 40(6). 261-267.
- Laroux, F. S., Pavlick, K. P., Hines, I. N., Kawachi, S., Harada, H., Bharwani, S., Hoffman, J. M., Grisham, M. B. (2001). Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiologica Scandinavica*. 173(1). 113-118.
- Leikert, J. F., Rathel, T. R., Wohlfart, P., Cheynier, V., Vollmar, A. M., Dirsch, V. M. (2002). Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*. 106(13). 1614-1617.
- Li, H. Y., Poulos, T. L. (2005). Structure-function studies on nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 99(1).293-305.
- Lila, M. A. (2004). Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*(5). 306-313.

- Lin, J. Y., Tang, C. Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*. 101(1). 140-147.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*. 78(3). 517S-520S.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition*. 134(12). 3479S-3485S.
- Lo Scalzo, R., Iannocari, T., Summa, C., Morelli, R., Rapisarda, P. (2004). Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. *Food Chemistry*. 85(1). 41-47.
- Lu, Y. H., Zhang, C. W., Bucheli, P., Wei, D. Z. (2006). Citrus flavonoids in fruit and traditional Chinese medicinal food ingredients in China. *Plant Foods for Human Nutrition*. 61(2). 57-65.
- Luiking, Y. C., Engelen, M., Deutz, N. E. P. (2010). Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 13(1). 97-104.
- Macdonald, H. M., New, S. A., Golden, M. H., Campbell, M. K., . Reid, D. M. (2004). Nutritional associations with bone loss during the menopausal transition: evidence of a beneficial effect of calcium, alcohol, and fruit and vegetable nutrients and of a detrimental effect of fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79(1). 155-165.
- Martinez-Frias, M. L. (2006). Folic acid: a public-health challenge. *Lancet*. 367(9528). 2057-2057.
- McCune, L. M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N. R., Thomson, C. A. (2011). Cherries and Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(1). 1-12.
- Michels, K. B., Giovannucci, E., Chan, A. T., Singhania, R., Fuchs, C. S., Willett, W. C. (2006). Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the nurses' health study. *Cancer Research*. 66(7). 3942-3953.

- Miean, K. H., Mohamed, S. (2001). Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.49(6). 3106-3112.
- Ministerstvo zemědělství. (2014). [online]. Dostupné z http://eagri.cz/public/web/file/357515/SVZ_Zelenina_2014.pdf.
- Ministerstvo zemědělství. (2014). [online]. Dostupné z http://eagri.cz/public/web/file/355340/SVZ_Ovoce_2014.pdf.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*.7(9). 405-410.
- Moilanen, E., Moilanen, T., Knowles, R., Charles, I., Kadoya, Y., AlSaffar, N., Revell, P. A., Moncada, S. (1997). Nitric oxide synthase is expressed in human macrophages during foreign body inflammation. *American Journal of Pathology*.150(3). 881-887.
- Moskovitz, J., Yim, M. B., & Chock, P. B. (2002). Free radicals and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.397(2). 354-359.
- Murashima, M., Watanabe, S., Zhuo, X. G., Uehara, M., Kurashige, A. (2004). Phase 1 study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *Biofactors*. 22(1-4). 271-275.
- Nawirska, A., Kwasniewska, M. (2005). Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry*. 91(2). 221-225.
- Nicklett, E. J., Kadell, A. R. (2013). Fruit and vegetable intake among older adults: A scoping review. *Maturitas*.75(4). 305-312.
- Olas, B., Wachowicz, B. (2007). Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions. *Platelets*. 18(8). 555-565.
- Ostrakhovitch, E. A., Afanas'ev, I. B. (2001). Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. *Biochemical Pharmacology*. 62(6). 743-746.
- Padayatty, S. J., Levine, M. (2008). Fruit and vegetables: think variety, go ahead, eat! *American Journal of Clinical Nutrition*. 87(1). 5-7.

- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. *Food Chemistry*. 102(3). 777-783.
- Paquay, J. B. G., Haenen, G., Stender, G., Wiseman, S. A., Tijburg, L. B. M., Bast, A. (2000). Protection against nitric oxide toxicity by tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(11). 5768-5772.
- Park, Y. C., Rimbach, G., Saliou, C., Valacchi, G., . Packer, L. (2000). Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-alpha secretion, and NF-kappa B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *Febs Letters*. 465(2-3). 93-97.
- Pearson, N., Biddle, S. J. H., . Gorely, T. (2009). Family correlates of fruit and vegetable consumption in children and adolescents: a systematic review. *Public Health Nutrition*. 12(2). 267-283.
- Perez-Jimenez, J., Fezeu, L., Touvier, M., Arnault, N., Manach, C., Hercberg, S., Galan, P., Scalbert, A. (2011). Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 93(6). 1220-1228.
- Pierce, J. P., Natarajan, L., Caan, B. J., Parker, B. A., Greenberg, E. R., Flatt, S. W., Rock, C. L., Kealey, S., Al-Delaimy, W. K., Bardwell, W. A., Carlson, R. W., Emond, J. A., Faerber, S., Gold, E. B., Hajek, R. A., Hollenbach, K., Jones, L. A., Karanja, N., Madlensky, L., Marshall, J., Newman, V. A., Ritenbaugh, C., Thomson, C. A., Wasserman, L., Stefanick, M. L. (2007). Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer - The Women's Healthy Eating and Living (WHEL) Randomized Trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 298(3). 289-298.
- Poltanov, E. A., Shikov, A. N., Dorman, H. J. D., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Tikhonov, V. P., Hiltunen, R. (2009). Chemical and Antioxidant Evaluation of Indian Gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn., syn. *Phyllanthus emblica* L.) Supplements. *Phytotherapy Research*. 23(9). 1309-1315.
- Pozzolini, M., Scarfi, S., Benatti, U., & Giovine, M. (2003). Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. *Analytical Biochemistry*. 313(2). 338-341.

- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysegu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie-International Edition*. 50(3). 586-621.
- Rafi, M. M., Yadav, P. N., Reyes, M. (2007). Lycopene inhibits LPS-induced proinflammatory mediator inducible nitric oxide synthase in mouse macrophage cells. *Journal of Food Science*. 72(1). S69-S74.
- Raha, S., Robinson, B. H. (2001). Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *American Journal of Medical Genetics*.106(1).62-70.
- Rao, A. V., Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*.55(3). 207-216.
- Seeram, N. P. (2008). Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(3). 627-629.
- Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K., Talalay, P. (2001). Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: Metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*.10(5). 501-508.
- Sharma, R., Coats, A. J. S., Anker, S. D. (2000). The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. *International Journal of Cardiology*. 72(2). 175-186.
- Soler, C., Soriano, J. M., Manes, J. (2009). Apple-Products Phytochemicals and Processing: A Review. *Natural Product Communications*.4(5). 659-670.
- Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J. N., Xu, Z. M., Finley, J. W. (2012). Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.60(27). 6658-6677.
- Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V. (2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta* 71(4). 1741-1751.
- Sulaiman, G. M., Al-Amiery, A. A. H., Mohammed, A. A., Al-Temimi, A. A. (2012). The Effect of Cherry Sticks Extract on the Levels of Glycoproteins in Alloxan-Induced Experimental Diabetic Mice. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 42(1). 34-41.

- Szabo, C., Ischiropoulos, H., . Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 6(8).662-680.
- Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L., Wolk, A. (2001). Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 93(7). 525-533.
- Terry, P., Terry, J. B., Wolk, A. (2001). Fruit and vegetable consumption in the prevention of cancer: an update. *Journal of Internal Medicine*. 250(4). 280-290.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2(12). 1231-1246.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., .Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(1). 44-84.
- Van Duyn, M. S., Pivonka, E. (2000). Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: Selected literature. *Journal of the American Dietetic Association*.100(12). 1511-1521.
- Vieira, M. C., Teixeira, A. A., Silva, C. L. M. (2000). Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in Cupuacu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. *Journal of Food Engineering*. 43(1). 1-7.
- Wallace, T. C. (2011). Anthocyanins in Cardiovascular Disease. *Advances in Nutrition*. 2(1). 1-7.
- Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K., Forstermann, U. (2002). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 106(13). 1652-1658.
- Wallerath, T., Poleo, D., Li, H. G., Forstermann, U. (2003). Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase - A mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *Journal of the American College of Cardiology*. 41(3). 471-478.

- Wang, B. S., Chen, J. H., Liang, Y. C., Duh, P. D. (2005). Effects of Welsh onion on oxidation of low-density lipoprotein and nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. *Food Chemistry*.91(1).147-1
- Wannamethee, S. G., Lowe, G. D. O., Rumley, A., Bruckdorfer, K. R., Whincup, P. H. (2006). Associations of vitamin C status, fruit and vegetable intakes, and markers of inflammation and hemostasis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 83(3).567-574.
- Wiesinger, H. (2001). Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology*.64(4). 365-391.
- Wilms, L. C., Hollman, P. C. H., Boots, A. W., . Kleinjans, J. C. S. (2005). Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 582(1-2), 155-162.
- Wolfe, K., Wu, X. Z., Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(3). 609-614.
- Woodside, J. V., Young, I. S., McKinley, M. C. (2013). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease. *Proceedings of the Nutrition Society*. 72(4). 399-406.
- Yao, P., Nussler, A., Liu, L., Hao, L., Song, F., Schirineier, A., Nussler, N. (2007). Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *Journal of Hepatology*.47(2). 253-261.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J. A., Bagchi, D. (2007). Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51(6). 675-683.
- Zheng, W., Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(11). 5165-5170.
- Zhou, L., Zhu, D. Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*. 20(4). 223-230.

8. Seznam zkratek

DMSO- dimetylsulfoxid

FBS – fetální bovinní sérum

FDA – Food Drug Administration

eNOS- endoteliální NO syntéza

LPS – lipopolysacharid

NO- oxid dusnatý

NOS – NO syntéza (Nitric oxide synthase)

RNS – reaktivní formy dusíku

ROS – reaktivní formy kyslíku

9. Seznam obrázků	
Obr.1 Syntéza kyseliny L-askorbové.....	12
Obr. 2 vznik vazodilatace	20
Obr. 3 Vliv červených vín na expresi eNOS [%]	21
10. Seznam tabulek a grafů	
Tab. 1 Nutriční složení s ohledem na vitaminy a minerály ovoce na 100g	9
Tab. 2 Ztráty vitamínu C během skladování	13
Tab. 2 Obsah lykopenu	16
Tab. 3 Obsah kvercetinu	18
Tab. 4 Dietní faktory regulující metabolismus NO	23
Tab. 5 <i>In vitro</i> oxidační aktivita ovocných a zeleninových extraktů.....	29
Graf 1: Grafické vyjádření inhibice NO	29