

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Sledování diverzity vinné révy na základě antioxidační a
protizánětlivé aktivity**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Darina Klučková

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

Školitel specialista: Ing. Přemysl Landa, Ph.D.

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Sledování vinné révy na základě antioxidační a protizánětlivé aktivity 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2013

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D., z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, za jeho cenné rady, ochotu a odborné vedení. Poděkování patří dále Ing. Přemyslu Landovi, Ph.D., který byl školitelem-specialistou mé experimentální práce a celému kolektivu Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky.

Tento výzkum byl financován z prostředků grantu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky LD11005.

Sledování diverzity vinné révy na základě antioxidační a protizánětlivé aktivity

Souhrn

Epidemiologické studie dokazují pozitivní efekt při střídání konzumaci červeného vína na kardiovaskulární a rakovinou tvorná onemocnění. S těmito účinky je spojováno především množství polyfenolických látek vyskytujících se v červeném víně. Šest gruzínských a pět českých červených vín bylo vyhodnoceno a porovnáno na základě jejich antioxidačních a protizánětlivých vlastností. Antioxidační aktivita byla stanovena *in vitro* metodou 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a oxygen radical absorabance capacity (ORAC) testem. Protizánětlivá aktivita byla stanovena *in vitro* inhibicí aktivity cyklooxygenázy-1 (COX-1) a cyklooxygenázy-2 (COX-2). U gruzínských červených vín byla zjištěna vyšší průměrná antioxidační aktivita v rámci DPPH metody ($15,28 \pm 2,71$ ET/l) i ORAC testování ($11,09 \pm 0,51$ ET/l) v porovnání s českými víny (DPPH = $8,28 \pm 1,68$ ET/l; ORAC = $10,19 \pm 0,51$ ET/l). Zároveň vykazovala vína pocházející z Gruzie v průměru i vyšší inhibiční aktivitu (COX-1 = $60,03 \pm 14,95$ %; COX-2 = $58,63 \pm 7,09$ %) u obou izoform cyklooxygenázy než české vzorky (COX-1 = $47,61 \pm 4,27$ %; COX-2 = $51,87 \pm 3,81$ %). Na základě těchto výsledků je možné předpokládat, že metoda zpracování a výroby gruzínských vín, které jsou podrobeny kachetinskému procesu, má významný vliv na antioxidační a protizánětlivou aktivitu.

Klíčová slova: červené víno, antioxidační aktivita, protizánětlivá aktivita, kachetinská technologie

Exploration of grapevine diversity based on antioxidative and anti-inflammatory activity

Summary

Epidemiological data indicate that moderate red wine consumption reduces the coronary heart diseases and cancer diseases incidence. Especially red wine phenolics have been linked to these effects. Eleven selected red wines produced in Georgia (six samples) and Czech Republic (five samples) were evaluated for their antioxidant and anti-inflammatory activities. *In vitro* antioxidant activity has been examined using 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *In vitro* anti-inflammatory activity has been determined by inhibition of cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). The average antioxidant activity of Georgian wines was significantly higher determined in DPPH ($15,28 \pm 2,71$ ET/l) as well as in ORAC ($11,09 \pm 0,51$ ET/l) assay compared to Czech wines ($8,28 \pm 1,68$ ET/l examined by DPPH and $10,19 \pm 0,51$ ET/l determined by ORAC). There was also a higher inhibition of both isoforms of cyclooxygenase (COX-1 = $60,03 \pm 14,95$ %; COX-2 = $58,63 \pm 7,09$ %) of the wines produced in Georgia than the czech ones (COX-1 = $47,61 \pm 4,27$ %; COX-2 = $51,78 \pm 3,81$). According to obtained data it is possible to conclude that grape processing and winemaking techniques of Georgian red wines made by Kakhetian technology influence antioxidative and anti-inflammatory activities.

Key words : red wines, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, Kakhetian technology

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíl práce	9
3	Historie vinné révy	11
3.1	Gruzínské červené víno.....	11
3.2	Klasifikace vinné révy.....	15
3.3	Chemické složení vinné révy	15
3.3.1	Cukry	16
3.3.2	Alkoholy	16
3.3.3	Kyseliny	17
3.3.4	Polyfenoly	18
3.3.5	Stilbenoidy	21
3.4	Antioxidační účinky červeného vína.....	24
3.5	Protizánětlivé účinky červeného vína	29
3.6	Protinádorové účinky červeného vína.....	30
3.7	Cyklooxygenáza.....	31
3.7.1	Funkce cyklooxygenázy	32
3.7.2	NSAIDs a alternativní inhibitory.....	33
4	Materiál a metody	36
4.1	Laboratorní materiál.....	36
4.2	Testovaný materiál	36
4.3	Příprava vzorků	36
4.4	Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH testu.....	36
4.5	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ORAC testu	40
4.6	Testování protizánětlivé aktivity pomocí COX-1 a COX-2	42
5	Výsledky	43
6	Diskuze.....	51

7 Závěr	55
8 Seznam grafů.....	57
9 Seznam tabulek	58
10 Seznam obrázků	59
11 Seznam zkratk	60
12 Seznam literatury	61

1 Úvod

Vinná réva je z farmakognostického hlediska významným zdrojem biologicky účinných látek. Mezi hlavní farmakologicky účinné látky zastoupené ve víně patří především sekundární metabolity rostlin, zejména flavonoidy a stilbenoidy, ale i celá řada dalších látek. Jedná se například o volné organické kyseliny (octová, vinná, jablečná, mléčná benzoová, salicylová, vanilová, gallová), kyseliny fenylypropanové (p-kumarová, ferulová, kávová), kyseliny vázané ve formě esterů, třísloviny (taniny), lignany, dusíkaté látky, enzymy, vitamíny nebo minerální látky (Mateus et al., 2001). Pokud je víno, zejména pak to červené, podáváno v efektivní dávce, která je určena na 200–400 ml/den u mužů a 100–300 ml/den pro ženy, a není tudíž překročena hormeze, neboli hranice příznivé aktivace nízké dávky látky, která je při vyšší koncentraci toxická, lze víno považovat za efektivní prostředek s nejrůznějšími léčebnými vlastnostmi (Manika and Dipak, 2010; Brown et al., 2010). To nakonec dokazuje i fakt, že víno buď samotné nebo jako extrakční činidlo pro různé byliny, ale i živočišné produkty, je stále využíváno hned v několika tradičních léčebných systémech, především na Asijském kontinentě. Dodnes se například v Číně na základě několika tisícileté tradiční medicíny louhují ve víně pravé tygří kosti, různé druhy hadů nebo kořeny ženšenu (Shi et al., 2010). Mimo bobulí vinné révy, hlavního zdroje výroby vína, byl zjištěn i vysoký podíl biologicky aktivních látek také v listech vinné révy, které se ostatně už od antických dob používaly nejenom k vnitřnímu, ale i vnějšímu užití například při výplachů očí. Zejména díky vysokému obsahu kvercetin-3-*O*-galaktosidu a kamferol-3-*O*-glukosidu se listy révy tudíž stávají alternativním doplňkem v rámci doporučené stravy při prevenci nejrůznějších onemocnění (Monagas et al., 2006). Vinné listy jsou ostatně odněpaměti oblíbenou surovinou především balkánské kuchyně (Şendođdu et al., 2006).

První vědecké výzkumy týkající se pozitivních účinků vína, zejména pak toho červeného byly publikovány v roce 1904. O 75 let později byly zveřejněny studie porovnávající země holdující červenému vínu s ostatními, které preferují konzumaci piva či jiných alkoholických nápojů, přičemž publikované výsledky již v této době přinesly důkazy snížené úmrtnosti na srdeční onemocnění u obyvatel zemí, které pravidelně pijí ve středních dávkách červené víno (Klatsky, 2007). Vliv vína na lidské zdraví však stále není v současné době zcela objasněn. Je to nápoj spojující v sobě tradici, noblesu a smyslový prožitek spolu s možným zdravotním přínosem a vědecké práce týkající se vína a jeho vlastností ve vztahu k lidskému zdraví stále stojí v popředí vědeckého i laického zájmu.

2 Cíl práce

Cílem této práce je porovnání antioxidačních a protizánětlivých vlastností vybraných tuzemských a gruzínských odrůd červeného vína. Antioxidační aktivita bude stanovena pomocí *in vitro* testů metodami ORAC (oxygen radical absorbance capacity) a DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Protizánětlivá aktivita bude stanovena metodou inhibice aktivity cyklooxygenázy-1 (COX-1) a cyklooxygenázy-2 (COX-2). Předpokládáme, že technologie, odrůda i odlišné prostředí může mít zásadní vliv na kvalitu produktu i jeho vlastnosti ve vztahu ke zdraví. Výsledek práce tak může vést ke konkrétním výživovým doporučením.

*I začal Noe obdělávat půdu a vysadil vinici.
Napil se pak vína, opil se a odkryl uprostřed svého stanu*

Bible (Genesis, kapitola 9: 20–21)



Obr. 1. Noe pijící víno ve své vinici
Převzato z: www.allposters.com

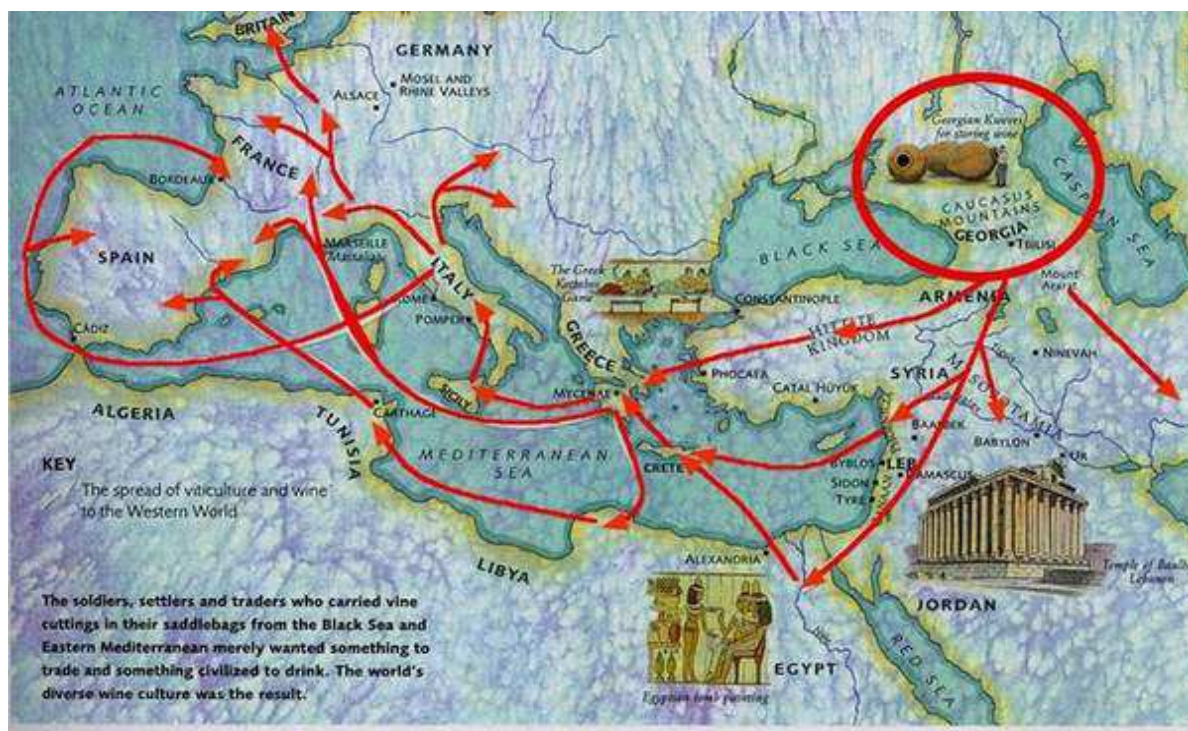
3 Historie vinné révy

Jeden z prvních historicky psaných záznamů týkající se pěstování a konzumace vína pochází z Bible, kdy Noe se svojí Archou přistál v podhůří Kavkazu na úpatí hory Ararat a vysadil vinici. Archeologické výzkumy však potvrdily pěstování vinné révy již v 6. století př. n. l. Z tohoto období pochází s největší pravděpodobností i hliněná amfora nalezená na rozmezí dnešního území jihovýchodního Turecka, Iránu a Arménie. (McGovern et al., 1996). Na základě chemické analýzy v ní byla objevena kyselina vinná. Tato kyselina by ale sama o sobě nemusela stoprocentně dokazovat přítomnost vína, a to z důvodu současného výskytu i v jiných druzích ovoce a zeleniny. Mimo kyselinu vinnou byly však v nádobě objeveny i stopy pryskyřice pocházející z pistaciovníku, která se ve starověku hojně využívala jako účinný konzervant. (Soleas et al., 1997). Současné studie zabývající se nálezy keramických láhví, zejména z oblasti Arménie, jsou však schopné pomocí nejnovějších metod založených především na kapalinové chromatografii dokázat navíc i přítomnost antokyanu malvidinu. Ten je zodpovědný za červené zbarvení granátových jablek a červené vinné révy, čímž se opět dokládá tvrzení o oblastech blízkého východu jakožto prvních civilizacích zabývajících se výrobou vína (Barnard et al. 2010). V Číně byly objeveny i jiné a zároveň starší fermentované alkoholické nápoje, ty ale pocházely z jiných zdrojů, než je vinná réva a to například z rýže nebo medu, používané zejména k léčebným účelům (Jackson, 2008). Víno je ostatně součástí nejrůznějších tradičních medicín po mnoho staletí (Basavaraju, 2009). Z území Kavkazu se díky starověkým civilizacím postupně přesouvalo pěstování vína přes Palestinu, Sýrii, Mezopotámii a Egypt i do dalších zemí světa (Obr. 2). Na území Evropy, a tudíž i Čech a Moravy se vinná réva dostala zásluhou římských legií ve 2. st. n. l. (This et al., 2006).

3.1 Gruzínské červené víno

Pro Gruzii, zemi o pěti milionech obyvatel, tvořící most mezi Evropou a Asií, je víno bráno v potaz více jako součást národního dědictví a kultury než jako alkoholický nápoj. Legenda praví, že svatá Nino, která přinesla na území dnešní Gruzie ve 4. st. našeho letopočtu křesťanství, nesla kříž vyrobený z vinné révy. Dodnes jsou v zemi tyto kříže často symbolicky zavěšeny na gruzínských křesťanských kostelech (Kurtiashvili and Rose 2006). Křesťanství ostatně sehrálo velmi důležitou roli při pěstování vína. Právě v kláštrech se během 12. st. zabývali výrobou a zpracováním vína velmi intenzivně, a to nejen k rituálním obřadům (Glonti, 2010).

Země je rozdělena do několika vinařských oblastí dle geografického umístění a klimatických podmínek (Obr. 3). Ve východní části se jedná o oblast Kakheti (60–70 % produkce veškerého vína) a Kartli, v západní části země jde o Imereti, Racha-Lechkhumi, třetí oblastí je subtropické pásmo v bezprostřední blízkosti Černého moře (Barisashvili et al., 2011).



Obr. 2. Mapa rozšíření vinné révy
Převzato z: www.domainegeorgia.com

O tom, že oblast jižního Kavkazu a tedy i Gruzie označují vědci a archeologové za kolébkou pěstování vinné révy svědčí i fakt, že slovo víno (wine, vin...), bylo s největší pravděpodobností odvozeno od gruzinského gvina (Barisashvili et al., 2011). Při vykopávkách v oblasti dnešní Gruzie archeologové objevili pecičky kulturní vinné révy pocházející ze 6. tisíciletí před naším letopočtem (This et al., 2006; Ekhvaia and Akhalkatsi, 2010). Klimatické podmínky této země přecházejí přes pásmo chladné, subtropické, chladné až po kontinentální. Ve východní části země se ve výšce 1200 m. n. m. vyskytují nejvýše položené vinice. Vinná réva je zde typická svou tmavě červenou barvou s výraznou chutí a vysokým podílem tříslovin. V západní části se zase víno vyznačuje spíše jemnější a vyváženější chutí se světlejší barvou. Nejnižší položené vinohrady se vyskytují podél pobřeží černého moře, v nadmořské výšce okolo 400 m. n. m., v oblasti se subtropickým podnebím a vysokou vzdušnou vlhkostí (Glonti, 2010).



Obr. 3. Gruzínské vinařské oblasti

Převzato z: www.georgianwinesociety.co.uk

Tradiční gruzínská výroba vína, která patří k národnímu bohatství a kultuře země, je zcela unikátní a světově ojedinělá. Základem jsou hliněné amfory (nazývané kvevri) se špičatým dnem o objemu od 200–8000 l zakopané až po hrdlo v zemi, ve kterých víno dozrává přinejmenším pět let. Při konečné fermentaci musí být použity všechny části vinné révy (slupka, dužina i semena) neboli rmut, který se získá rozemletím hroznů. Mimo dozrávání vína byly tyto keramické nádoby používány v minulosti také ke skladování obilí nebo másla. Tato tradiční výroba však v současné době není již tak rozšířená jako tomu bývalo v minulosti, a to hlavně z důvodů náročných požadavků na znalosti, zkušenosti a náklady. V dnešní době se v Gruzii soustředí pouze tři oblasti na tuto technologii výroby vína. Jde o Kakheti, Imereti a Guria. Na rozdíl od tradiční výroby vína, která vyžaduje přídavky chemických látek, proces zpracování vinné révy ve kvevri je založen na přirozených podmínkách a faktorech bez přídavku syntetických sloučenin. I při údržbě těchto nádob jsou používány šetrné přírodní látky. Vnitřní strana amfory je například nejdříve ošetřována vápennou vodou, posléze roztopeným voskem (v dřívějších dobách se používal například i kozí tuk), vnější strana je ovápněna vápnem. Hlavní výhodou tradiční výroby je přirozené udržování stejné teploty v amfoře v zimě i v létě a není tedy potřeba řízené kontroly. Zároveň

je teplota díky vápennému ošetření z vnější strany o trochu vyšší než při klasické výrobě, což má za důsledek delší dobu zrání a fermentace. Tyto procesy jsou ostatně jedny z nejdůležitějších v rámci tradiční výroby (Barisashvili et al., 2011). Místo, ve kterém se kvevri vyskytuje, se nazývá marani. Existují dva typy marani (Obr. 4), a to uzavřené marani (ve východní části) tvořené z kamenů nebo dřeva a otevřené marani (v západní části), které tvoří otevřené prostranství obklopené stromy se širokými listy, jenž slouží k vnější ochraně a k udržení požadovaných teplotních podmínek (Glonti, 2010).



a) Kvevri umístěné v otevřeném marani



b) Kvevri umístěné v uzavřeném marani hermeticky uzavřené kameninovým příklopem

Obr. 4. Kvevri

Převzato z: Barisashvili et al., (2011)

V rámci tradiční výroby vína ve kvevri můžeme dle technologického postupu zpracování vinné révy rozlišit hned několik metod. Při výrobě Kachetinského vína dochází ke kvašení moštu na rmutu, neboli jsou fermentovány naprosto všechny části bobulí. Tato vína jsou velice oblíbená i v jiných zemích. Vyznačují se vysokým extraktem, vysokou hladinou vitamínů, taninů, jsou silně aromatická a velmi harmonická (Oldřichová, 2003). Při výrobě Imeretianského vína se takto fermentuje pouze třetina z celkového množství slupek, dužiny i semen. Tato metoda se nazývá Tkbili, Kachetinský postup zase Chacha. Pokud dochází k fermentaci pouze vinné šťávy, jedná se o Evropský postup, který je v některých oblastech Gruzie také vyskytuje. Takto vzniklá vína však nejsou označována, byť vyrobena v Gruzii, za tradiční (Barisashvili et al., 2011). K typickým domácím odrudám patří Saperavi, které patří mezi nejvýznamnější červenou odrůdu v Gruzii (Vouillamoz et al., 2006), dále například Mudžuretuli, Alexandreuli, Odjaleshi, Rkatsiteli, Tsolikauri, Aladasturi nebo Mtsvane. Kromě tradičních gruzínských odrůd se v Gruzii pěstují i odrůdy rozšířené po celém světě, jako třeba Chardonnay, Cabernet Sauvignon nebo Pinot Noir. Celkově je v Gruzii

zastoupeno přes 500 odrůd vinné révy (více jak polovinu tvoří odrůdy červené),(Ekhvaia and Akhalkatsi, 2010).

3.2 Klasifikace vinné révy

Čeď révovitých (Vitaceae) zahrnuje okolo 14 rodů révy, dohromady přes 1000 druhů. Je tvořena především tropickými a subtropickými druhy, vyskytuje v Austrálii, na Novém Zélandu, jižní Americe i Africe, zároveň také v mírných pásmech (Soleas et al., 1997). Hospodářsky nejvýznamnější z čeledi Vitacea je rod *Vitis vinifera*, který se používá po celém světě právě k výrobě vína. Současně se jedná o jediný euroasijský původní genom vinné révy, který se pravděpodobně poprvé objevil před více jak 65 miliony let (Myles et al., 2011). *Vitis vinifera* se dělí na dva poddruhy, a to *V. vinifera sativa* (réva vinná pravá) a druhý poddruh představující divokou formu *V. vinifera silvestris* nazývanou réva lesní, která je rozšířená v okolí Středozevního moře, zasahující přes území Španělska, severní Afriky a východního Kavkazu. Oba poddruhy lze rozlišit především podle morfologických znaků (This et al., 2006).

3.3 Chemické složení vinné révy

Znalosti chemického složení vinné révy se významně zvýšily během posledních čtyřiceti let, a to zvláště díky rozvoji moderních chemických analýz, především plynové a kapalinové chromatografie, infračervené spektrometrie nebo nukleární magnetické rezonance. Ve vinné révě bylo rozpoznáno více jak 500 jednotlivých složek, přičemž 160 z nich jsou estery. Koncentrace hlavních komponentů se pohybuje v rozmezí 10^{-1} – 10^{-6} mg/l. Při chuťovém vnímání se jednotlivé složky nepodílejí významně na konečném vjemu, všechny dohromady však mohou tvořit velmi specifickou chuť (Soleas et al., 1997).

Majoritní složku a zároveň hlavní součást celkového obsahu vína tvoří voda (80 %), která se účastní zároveň mnoha důležitých chemických reakcí, počínaje růstem vinné révy, přes fermentační procesy až po dozrávání vína. Ve vodě nerozpustné nebo málo rozpustné složky nehrají ve vinné révě příliš důležitou roli. Obsah aromatických složek vyskytujících se ve víně se pohybuje okolo 0,8–1,2 g v jednom litru. Zejména se jedná o alkoholy vzniklé fermentací, které tvoří až 50 % z celkového množství těkavých látek, dále jde o těkavé kyseliny a estery karboxylových kyselin (Berthels et al., 2006).

Tab. 1. Procentuální zastoupení jednotlivých složek v červeném a bílém víně				
Složka	Stolní vína		Dezertní vína	
	bílé	červené	bílé	červené
voda	87	87	76	74
ethanol	10	10	14	14
těkavé složky	0,04	0,04	0,05	0,05
extrakt	2,6	2,7	10,1	12,2
cukr	0,05	0,05	8	10
pektiny	0,3	0,3	0,25	0,25
glycerol	1,1	1,1	0,9	0,9
kyseliny	0,7	0,6	0,5	0,05
popel	0,2	0,2	0,2	0,2
fenoly	0,01	0,2	0,01	0,1
aminokyseliny	0,25	0,25	0,2	0,2
tuk a terpeny	0,01	0,02	0,01	0,02
vitaminy	0,01	0,01	0,01	0,01
celkem	100	100	100	100

Tab. 1. Procentuální zastoupení jednotlivých složek v červeném a bílém víně

Převzato z: Soleas et. al., (1997)

3.3.1 Cukry

Mezi hlavní cukry vinné révy patří fruktóza a glukóza, které se vyskytují přibližně stejném poměru (Berthels et al., 2006). U zralejší vinné révy se však zvyšuje obsah fruktózy stejně jako ve zbytkovém cukru fermentovaného vína, a to z toho důvodu, že pivní kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) fermentují glukózu v procesu kvašení rychleji než fruktózu (Berthels et al., 2008). Přítomnost fruktózy ve zbytkovém cukru, která je přibližně dvakrát sladší než glukóza se tedy náležitě projeví ve finální cukernatosti vína (Lee, 1987). Kultivary, které nepocházejí z rodu *Vitis vinifera* mohou obsahovat i určité procento sacharózy, která se ale během fermentace ve finální fázi rozkládá opět na fruktózu a glukózu. Průměrná hodnota celkového cukru ve vinné révě se pohybuje mezi 22–24 % v závislosti na druhu odrůdy, stupni zralosti a zdraví bobulí (Soleas et al., 1997). Bylo také zjištěno, že vysoký obsah cukru může zvyšovat těkavost aromatických složek. Podle obsahu zbytkového cukru se vína dělí na vína suchá, polosuchá, polosladká a sladká (Barata et al., 2008).

3.3.2 Alkoholy

Nejdůležitějším alkoholem vyskytujícím se ve víně je ethanol. Při dodržení standardních podmínek během alkoholového kvašení kolísá jeho obsah okolo 14–15 %,

obecně je ale jeho koncentrace ve vínech mírně nižší a to v rozmezí 10–13 %. Příklad cukru během fermentačního procesu se projeví zvýšeným obsahem alkoholu a to nad 15 %, což se vyskytuje například u likérových (portských vín), (Jackson, 2008). Mezi hlavní faktory, které rozhodují o koncentraci alkoholu, patří především obsah cukru, teplota a druh kvasinek. Ethanol je klíčovou složkou stability a zrání vína. Spolu s dalšími druhy alkoholu pomalu reaguje s organickými kyselinami za vzniku esterů, které stabilitu právě udržují. Zároveň inhibuje růst mikroorganismů a v kombinaci s kyselým prostředím vína umožňuje jeho stálost po mnoho let. Při výrobě červeného vína je důležitým rozpouštědlem při extrakci pigmentů a tříslovin. Zároveň pravděpodobně redukuje společně s oxidem uhličitým výparu těkavých látek, které vznikají při fermentaci (Williams and Rosser, 1981). Enzymatickým rozkladem pektinů vzniká ve víně i určité množství methanolu (0,1–0,2 g/l). Methanol z funkčního hlediska ovšem nezastává ve víně důležitou roli. Ze 160 esterů, které byly ve víně identifikovány (Soleas et al., 1997), vzniká pouze pár z nich za působení methanolu. Ze všech alkoholických nápojů, které prošly procesem fermentace, je obsah methanolu ve víně úplně nejnižší a to z důvodu nízkého množství pektinů v ovoci. Je tedy takřka vyloučeno, aby v této minimální koncentraci zoxidoval methanol v lidském těle na toxický formaldehyd a kyselinu mravenčí a došlo tak k narušení centrální nervové soustavy (Gnekow and Ough, 1976). Mezi další alkoholy, které se vyskytují ve víně, patří například 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol a 3-methyl-1-butanol. Tyto vyšší alkoholy vznikají převážně jako meziprodukty kvasného procesu v závislosti na teplotě, přítomnosti kyslíku a druhu kvasinek (Jackson, 2008). Dalším alkoholem je lehce nasládlý glycerol, který je považován za důležitou výrazovou složku. Dodává vínu hladkou a plnou chuť (Hatzakis and Archavlis, 2007).

3.3.3 Kyseliny

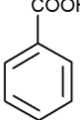
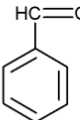
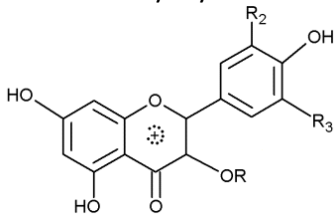
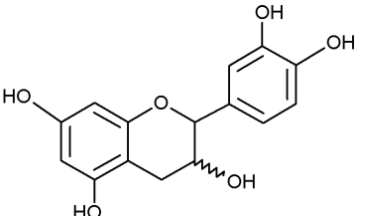
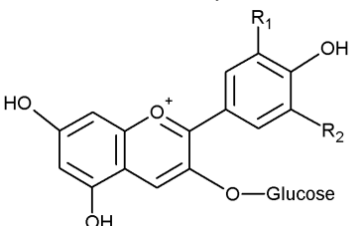
Kyseliny vyskytující se ve víně se obecně rozdělují do dvou skupin, a to na kyseliny těkavé a kyseliny stálé. Těkavé kyseliny mohou být v případě potřeby snadno odstraněny destilací. Kyselina octová patří mezi nejběžněji rozšířené těkavé kyseliny, její množství se pohybuje od 0,2 do 0,6 g/l. Ostatní karboxylové kyseliny jako vinná, citronová, máselná a jablečná významně kvantitativně určují pH vína, zejména jde o poměr mezi kyselinou vinnou a jablečnou (Soleas et al., 1997). U bílých vín se pH pohybuje mezi 3,1–3,4. V rozmezí 3,3–3,6 kolísá pH u vín červených. Mírně nižší kyselost u červených vín je pravděpodobně způsobena větším množstvím polyfenolů (Jackson, 2008).

3.3.4 Polyfenoly

Mezi významnou složku vína patří polyfenoly, které tvoří velmi důležitou skupinu sekundárních metabolitů rostlin. Obzvláště jde-li o červené víno, je fenolům přikládána velmi důležitá funkce, a to ne pouze z hlediska pozitivních účinků na lidské zdraví, ale také z pohledu výrazové hodnoty, chutě, barvy i celkové kvality vína. Průměrně se v červeném víně vyskytuje od 1000–4000 mg fenolů v jednom litru (Tsang et al., 2005). V bílém víně se polyfenoly vyskytují v podstatně nižším množství (Formica and Regelson, 1995). S největší pravděpodobností pocházejí hned z několika různých zdrojů, a to přímo z ovoce, zejména ze slupky a semen vinné révy, dále pak jako produkty kvasného procesu nebo při extrakci v dřevěných sudech (Sanz et al., 2012). Z chemického hlediska jde sloučeniny, které obsahují jednu nebo více hydroxylových funkčních skupin (-OH) navázaných přímo na benzenový kruh (aromatické jádro). (Rahman et al., 2006). Jejich struktura je velice různorodá, pohybuje se od jednoduchých sloučenin až po vysoce polymerní struktury taninů. V červeném víně se vyskytují dvě důležité skupiny polyfenolických látek a to flavonoidy a neflavonoidy. (Tab. 2). V současné době bylo identifikováno více než 8000 flavonoidů (Ghosh and Konishi, 2007). Jedná se o ve vodě dobře rozpustné rostlinné pigmenty, které jsou charakterizovány jako molekuly obsahující dvě benzenová jádra spojená pyranem. Od 40. let 19. století, kdy byly flavonoidy poprvé izolovány a popsány, jsou spojovány s nerůznějšími pozitivními účinky na lidský organismus, zejména pro své antioxidační a protizánětlivé schopnosti. V rostlině zároveň slouží jako ochrana před napadením různými plísněmi a bakteriemi (Formica and Regelson, 1995). V posledních dvaceti letech se však čím dál častěji začínají objevovat studie a názory, které hovoří zároveň i o negativním působení některých flavonoidů, zejména pak kvercetinu a rutinu, u kterých byla zjištěna určitá mutagenní karcinogenní aktivita zvláště při nadměrném příjmu těchto látek. Obecně by však v rámci vyvážené stravy neměla být tato hranice často překračována, pokud jedinec neužívá zároveň i zvláštní výživové doplňky, obsahující tyto složky. Při dodržení běžného příjmu flavonoidů a dlouhodobého nepřekračování doporučené denní dávky, která činí 1 g na osobu, však stále převládají jejich pozitivní účinky (Delaney et al., 2002; Sugimura et al., 1996; Skibola and Smith, 2000). Mezi nejběžněji se vyskytující flavonoidy v červeném víně patří flavonoly, flavanoly a anthokyany (Cook and Samman, 1996). Flavonoidy se vyskytují buď volně anebo nejčastěji vázané na cukry, tvořící glykosidy. V červeném víně tvoří dokonce více jak 85 % (více jak 1 g/l) celkového množství veškerých polyfenolů, u bílého jde maximálně o 20 % z celkového množství (Soleas et al., 1997). Mezi významné flavonoly vín se řadí kvercetin.

Mimo vinnou révu je obsažen ještě v mnoha dalších zdrojích, například v jablkách, špenátu, brokolici, černém a zeleném čaji nebo fazolích (Shaik et al., 2006). Naprosto nejvyšší množství tohoto flavonolu bylo zjištěno v cibuli (284–486 mg/kg), v červeném víně jde o množství okolo 8 mg v 1 litru. Jeho širokospektrální biologická aktivita je do určité míry velmi podobná aktivitě resveratrolu. Mimo antioxidační, protizánětlivé a preventivní účinky v oblasti výskytu rakoviny (Baghel et al., 2012) vykazuje navíc kvercetin například schopnost posilovat přirozenou obranyschopnost a imunitu organismu, rozpouštět krevní sraženiny nebo účinně bojovat proti nejrůznějším virům, zejména herpes viru (Formica and Regelson, 1995). Nejvyšší účinnosti kvercetinu je dosaženo právě tehdy, je-li přítomen společně se stilbenoidem resveratrolem, tak jak je tomu u červeného vína (Sun et al., 2010). Pro chuťové vlastnosti a strukturu vína mají význam flavan-3-oly a jejich polymery označované jako taniny (třísloviny). Pro pěstitele vinné révy mezi nejdůležitější flavan-3-oly patří pro pěstitele vinné révy katechin a epikatechin a to z důvodu jejich výrazových chuťových vlastností. Hořké tóny bývají spojovány s flavan-3-oly pocházejících ze semen, tříslovité tony zase z flavan-3-olů pocházejících se slupek bobulí (Pavloušek, 2011). Základ barviv u modrých odrůd vinné révy tvoří ve vodě rozpustné barevné pigmenty nazývané anthokyaninidy. Ve vinné révě bývají však nestabilní a vyskytují se tudíž jako anthokyaniny vázané na glukózu. Nejvýznamnějším zástupcem z této skupiny je malvidin-3-glukosid. Jedná se o hlavní anthokyanové barvivo vinné révy (Ghosh and Konishi, 2007).

Ostatní neflavonoidní sloučeniny patří chemicky jednodušší sloučeniny. U vín, která nezrají v dubových sudech, se nejčastěji jedná o různé deriváty kyseliny skořicové a benzoové, často navázané na alkoholy, cukry a další kyseliny, jako například kyselina kumarová, kávová a ferulová. Primárně se vyskytují ve vakuolách buněk vinné révy, které jsou snadno extrahovány při lisování (Singleton et al. 1984). Vína zrající v dubových sudech mají obecně vyšší podíl fenolických kyselin, zejména se to týká derivátů kyseliny benzoové, především kyseliny ellagové, která vzniká rozkladem taninů ve víně. Kyselina kaftarová je nejběžněji se vyskytující se fenolická kyselina ve víně a slouží především jako substrát pro oxidaci. V bílých vínech mohou způsobovat zároveň žluto-zlaté zbarvení (Soleas et al., 1997).

Tab. 2. Základní rozdělení fenolických sloučenin ve víně a jejich hlavní zástupci		
	Skupina	Zástupci
Neflavonoidní fenolické látky	Hydroxybenzoové kyseliny  Kyselina benzoová	Kyselina gallová, benzeová, protokatechová, vanilová
	Hydroxyskořicové kyseliny  kyselina skořicová	Kyselina kumarová, kávová, ferulová, sinapová, kaftarová
	Stilbeny	<i>Cis a Trans</i> resveratrol, piceid, piceatannol, astringin
Flavonoidní fenolické látky	Antokyany 	Malvidin-3-glukosid, Cyanidin-3-glukosid, estery s kys. Octovou, kumarovou, kávovou
	Flavan-3-oly 	Katechin, epikatechin, gallokatechin, epigallokatechin
	Flavonoly 	Kvercetin, myricetin, kaempferol, rutin

Tab. 2. Základní rozdělení jednotlivých sloučenin a jejich hlavní zástupci

Převzato z: Pavloušek P., (2012)

Množství a složení polyfenolů vyskytujících se ve víně nesouvisí pouze na druhu odrůdy vinné révy, klimatických podmínkách, způsobu zpracování a dalších ovlivňujících faktorech, ale také na celkové délce zrajícího procesu a typech sudů používaných k tomuto

účelu. V závislosti na délce zrání zde existuje totiž jistá stoupající tendence akumulace polyfenolických látek, a tím i ve většině případů také vyšší antioxidační potenciál (Del Álamo et al., 2008). Schwarz et al. (2012) například zkoumali antioxidační aktivitu 26 vzorků červených vín, z nichž nejstarší pocházelo z roku 1935. Metodou TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) byla právě u nejstaršího vína zjištěna nejvyšší antioxidační aktivita, kdy hodnota ekvivalentu troloxu (ET) v jednom litru vína dosahovala 5,6 mM. U nejmladšího vzorku byla naměřena hodnota 0,19 mM ET/l.

Tab. 3. Průměrné zastoupení nejvýznamnějších polyfenolů v červeném a bílém víně		
Průměrné množství (mg/l)		
Druh polyfenolu	červené víno	bílé víno
Katechin	191,3	34,9
Epikatechin	82	21
Rutin	9,1	0
Myricetin	8,5	0
Kvercetin	7,7	0
Resveratrol	1,9	0,19

Tab. 3 Průměrné zastoupení nejvýznamnějších polyfenolů v červeném a bílém víně
Převzato a upraveno z: Soleas et al., (1997), Ratola et al., (2004)

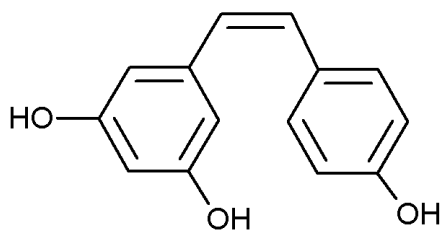
3.3.5 Stilbenoidy

Nejvýznamnější a zároveň nejprozkoumanější složkou červeného vína, které se připisuje většina pozitivních účinků lidský organismus při pravidelné konzumaci je resveratrol (Fontecave et al., 1998). Resveratrol patří mezi stilbenoidy a spolu s ostatními flavonoidy jde zřejmě o hlavní faktory, tzv. Francouzského paradoxu. První zmínka o tomto fenoménu pochází z roku 1918 od irského lékaře Samuela Blacka (Klatsky, 2007). Tímto paradoxem je označována skutečnost, že obyvatelé jižní Francie, známí pravidelnou konzumací jídel s vysokým podílem nasycených tuků a střídanou konzumací červených vín, mají velice nízkou úmrtnost na následky kardiovaskulárních onemocnění, a to zřejmě díky přísunu rostlinných polyfenolů (Rahman et al., 2006; Markus and Morris, 2008). Stilbenoidy, flavonoidy a optimální množství alkoholu totiž účinně inhibuje oxygenázové enzymy, čímž snižují oxidaci LDL (low density lipoproteins) lipidů s nízkou hustotou a brání tak agregaci krevních destiček, trombóze, ukládání cholesterolu, a tím nadměrnému zvyšování krevního tlaku (Mar et al., 2013). Resveratrol se vyskytuje ve dvou izomerech (Obr. 5),

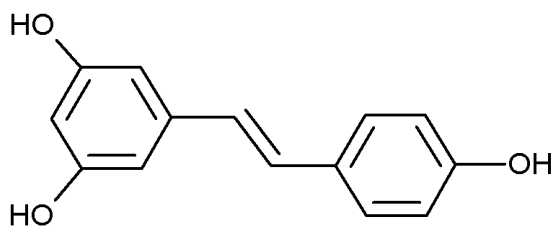
přičemž z *trans* formy přechází do *cis* izomeru působením UV záření. S výjimkou několika studií, například práce Lucena et al., (2010), jsou pozitivní účinky přiznávány jeho *trans*-izomeru (Alcaron and Villegas). Resveratrol se vyskytuje přinejmenším v 72 druzích rostlinných druhů, mnoho z nich je součástí zdravého stravování (Jang et al., 1997). Mimo slupek bobulí vinné révy (50–100 mg/g), (Marques et al., 2009), je obsažen také v borůvkách, brusinkách, kakau, eukalyptu, kapustě, brokolici, zelí, cibuli, červené řepě, ořechách a mnoha dalších potravinách (Fahey and Kensler 2007). Hlavní funkcí resveratrolu v rostlině je zřejmě její ochrana proti napadení plísněmi, zejména se jedná o plíseň šedou (*Botrytis cinerea*), je tedy klasifikován jako fytoalexin a jeho obsah vzrůstá stresem révy vinné nejen po infekci plísní, ale také stresem vyvolaným například nedostatkem vody nebo UV zářením (Manika and Dipak, 2010). Ve víně se vyskytuje ve dvou formách, a to buď volně nebo navázaný na cukr 3-O-β-D-glukosid-resveratrol (Jackson et al. 1991). Obecně je obsah resveratrolu vyšší právě v červeném víně, a to z důvodu jeho ukládání ve slupkách hroznů, které jsou na rozdíl od výroby vína bílého podrobeny procesu macerace, při kterém jsou cenné látky obsažené ve slupkách včetně resveratrolu uvolňovány (Lamuela-Raventos and Boronat, 1998; Creasy and Creasy, 1998). Koncentrace resveratrolu v červeném víně se pohybuje okolo 1,5–3 mg/l v závislosti na podmínkách pěstování a zpracování vína. (Alcaron and Villegas, 2005). Podle některých studií lze však soudit, že bílé víno může vykazovat podobně pozitivní účinky v prevenci srdečních onemocnění stejně jako víno červené, podmínkou je ale dostatečně vysoký obsah tyrosolu a hydroxytyrosolu, účinných antioxidantů (Dudley et al., 2008; Xanthopoulou et al., 2008; Fuhrman et al., 2005). Obecně však červené víno vykazuje širší spektrum farmakologického účinku na lidský organismus, a to především z důvodu většího množství přítomných polyfenolů, a tím i zvýšené antioxidační aktivity (Nakamura et al., 2009). Na druhou stranu ale nemusí extrakty červeného vína, bohaté na polyfenolické látky, ještě vždy předurčovat stejně vysokou antioxidační aktivitu (Xanthopoulou et al., 2008; Ferguson, 2001). Stejně tak je nutno brát v potaz, že nespočet klinických studií, založených především na testovaných zvířatech, nemusí ještě vždy korespondovat stejnou biologickou aktivitou polyfenolů u lidí, a to zejména z důvodu odlišného způsobu vstřebávání těchto látek a celkového metabolismu. Tato informace by měla být brána na vědomí při výběru nejrůznějších přírodních doplňků, které se v současné době v hojné míře vyskytují na našem trhu (Nunez-Selles, 2005). Zcela objasněna není například procentuální dostupnost resveratrolu v testech *in vivo*, stejně jako transport a distribuce pro lidský organismus. Metabolismus polyfenolů je vystaven nejrůznějším vlivům trávicí soustavy, další změny nastávají na úrovni enterocytů, tudíž mohou být biologické účinky v cílových tkáních

a orgánech způsobeny naprosto odlišnými látkami než těmi, které byly původně přijaty v potravě (Slanina a Táborská 2004). Významnější než koncentrace polyfenolů bývá často jejich chemická struktura, která také určuje absorpci (D'Archivio et al., 2007). Obecně bylo například zjištěno, že anthokyanidiny pocházející z vinné révy výrazně reagují v přítomnosti mléčných proteinů, a tím dochází k vyššímu stupni polymerace za vzniku stabilních komplexů v zažívacím traktu (Xia et al., 2010). Po podání čistého resveratrolu člověku v dávce srovnatelné s 2–3 skleničkami červeného vína (0,03 mg/kg) je resveratrol detekován v tělních tekutinách do 24 hodin, což dokazuje rychlou absorpci tohoto stilbenoidu v zažívacím traktu. Při podání vyššího množství (1 mg/kg) byla však v plazmě a moči detekována pouze čtvrtina tohoto množství za stejné časové období. Vysoké podávané množství fenolických látek může tedy způsobovat kompenzační snížení jejich absorpce. (Meng et al., 2004) V plazmě je resveratrol pravděpodobně navázán na lipoproteiny, čímž zvýší stabilitu a sníží svoji rozpustnost (Belguendouz et al., 1997). Jako potenciální přenašeč resveratrolu z krevního řečiště do finálních buněčných membrán se jeví jeden z nejdůležitějších proteinů krevní plazmy albumin. Po gastrickém podání resveratrolu potkanům ho bylo možné detekovat nejenom v játrech a ledvinách, ale zároveň i v plicích, srdci nebo mozku. U lidského organismu je však o přechodu polyfenolů z plazmy do finálních tkání a orgánů dostupných zatím stále jen málo informací (Jannin et al., 2004).

Vysoká biologická účinnost resveratrolu je spojena především s jeho velmi dobrou antioxidační a protizánětlivou aktivitou (Nakamura et al., 2009). Obecně nalézají antioxidanty své uplatnění nejen při prevenci kardiovaskulárních onemocnění, např. aterosklerózy, ale také při prevenci neurodegenerativních chorob jako například Parkinsonovy nebo Alzheimerovy nemoci, dále pak cukrovky 2. typu nebo rakoviny (Marques et al., 2009). Mezi spouštěcí mechanismus vzniku těchto onemocnění patří především oxidační stres (Lee and Kim, 2011). Jedná se o nerovnováhu mezi volnými radikály, vznikající jako vedlejší produkty látkové výměny a schopnosti organismu odbourávat tyto reaktivní produkty pomocí antioxidantů (Xanthopoulou et al., 2008; Nakamura et al., 2009). Současně byla u resveratrolu zjištěna zajímavá vlastnost, a to zvyšování exprese genu SIRT 1, který chrání buňky před poškozením DNA, a tím prodlužuje jejich životnost a zpomaluje stárnutí buněk (Sun et al., 2010; Manika and Dipak, 2010). Doporučení stravy bohaté na polyfenoly jako prevenci nejruznějších onemocnění má zároveň i ekonomicko-úsporný charakter z hlediska nižších nákladů při výzkumu přírodních složek, než při objevování nových syntetických léků používaných pro léčbu závažných nemocí jako rakoviny.



a) *trans*-resveratrol



b) *cis*-resveratrol

Obr. 5. Izomery resveratrolu

3.4 Antioxidační účinky červeného vína

Kyslík a dusík patří mezi základní prvky nepostradatelné pro život na zemi. Za určitých okolností mohou však nepříznivě ovlivňovat lidský organismus a to zejména při tvorbě jejich reaktivních radikálů, respektive reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) a reaktivních forem dusíku (RNS – reactive nitrogen species), (Kumarasamy et al., 2007). Jedná se o vysoce reaktivní částice, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů v molekulovém orbitalu. ROS vznikají v lidském těle hned několika cestami a zastávají mnoho významných funkcí jako je například přenos energie, obranné imunitní antibakteriální a antivirové reakce nebo detoxikační proces při odstraňování cizorodých látek na cytochromu P450 (Cederbaum 2001). Volné radikály mohou vznikat také působením ultrafialového nebo ionizujícího záření, zároveň mohou pocházet ze znečištěného vnějšího prostředí nebo cigaretového kouře (Kumarasamy et al., 2007). Mezi reaktivní formy kyslíku patří například O_2^- superoxidový radikál, hydroxyperoxylový radikál HO_2^- , hydroxylový radikál OH^- a jiné (Tab. 4). Dále zde existuje skupina látek neradikálové povahy, které jsou oxidačními činidly nebo jsou převeditelné např. teplem nebo světlem do radikálové podoby, respektive jejich působením může ke vzniku radikálů dojít. Do této skupiny patří například peroxid vodíku H_2O_2 , kyselina chlorná $HClO$ nebo ozon O_3 (Volf and Andrs, 2008). Volné radikály nepůsobí svým negativním působením pouze v rámci vnitřního prostředí lidského těla, negativní účinky se projevují také na kůži, pleti i vlasech předčasným stárnutím a ztrátou vlhkosti. V tomto případě se jedná především o radikály pocházející ze znečištěného ovzduší a zakouřeného prostředí (Züllli, 2001). Přes mnoho významných pochodů, které ROS nebo RNS v lidském organismu zastávají, vedou reakce těchto reaktivních forem s makromolekulami lipidů nebo proteinů často k poškození buněčných struktur nebo celých tkání a následně k propuknutí nejrůznějších onemocnění (Xanthopolou et al., 2010) jako

například cukrovky (Ansley et al., 2013), rakoviny (Messina, 1991) ledvinových onemocnění (Rodrigo and Rivera, 2010) nejruznějších kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění (Shukla et al., 2011)

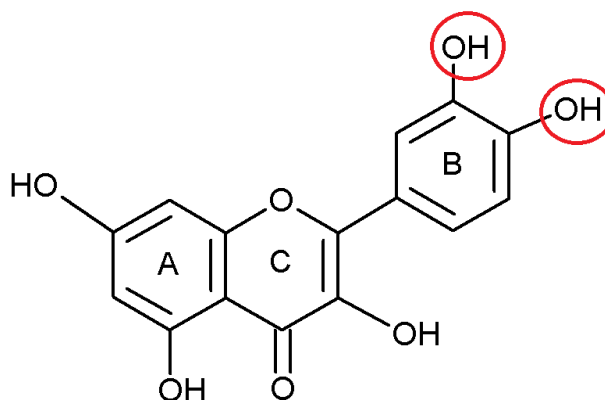
Tab. 4. Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku			
Reaktivní formy kyslíku (ROS)			
Volné radikály		Látky neradikálové povahy	
Superoxidový radikál	O_2^-	Peroxid vodíku	H_2O_2
Hydroperoxylový radikál	HO_2^-	Kyselina	HClO
Hydroxylový radikál	OH^-	Ozón	O_3
Peroxylový radikál	ROO^-	Singletový kyslík	1O_2
Alkoxylový radikál	RO^-		
Reaktivní formy dusíku (RNS)			
Volné radikály		Látky neradikálové povahy	
Oxid dusnatý	NO^-	Kyselina dusitá	HNO_2
Oxid dusičitý	NO_2^-	Oxid dusitý	N_2O_3
		Peroxynitrit	$ONOO^-$
		Kyselina peroxodusitá	$ONOOH$
		Alkylperoxynitrit	$ROONO^-$
		Nitroniový kationt	NO_2^+
		Chlorid nitrilu	NO_2Cl

Tab. 4. Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku

Převzato z: Štípek, (2000)

Většina těchto negativních pochodů vzniká na základě tzv. oxidačního stresu. Tento termín definuje nerovnováhu, která vznikla mezi nahromaděnými volnými radikály nebo jejich produkty a antioxidanty, které nestačí neutralizovat tyto reaktivní formy, jejichž působení vede k buněčnému stárnutí, poškození buněk a následně k případné buněčné smrti. (Yoshikawa and Naito 2002 Sohal and Allen, 1990). Jako antioxidanty jsou označovány látky, které zabraňují oxidaci substrátu, tj. ochuzení o elektrony tím, že mu předávají vlastní elektrony, a to ve většině případů za vzniku stabilních produktů. Antioxidant, který však chrání jeden systém, nemusí být antioxidantem v jiném systému. V určitých případech mohou dokonce i rostlinné flavonoidy urychlit oxidační poškození některých molekul a nabývat tak charakteru pro-oxidantů. Závisí to zejména na podmínkách prostředí (Volf a Andrs, 2008). Po požití zeleného čaje, který je označován jako jeden z nejvýznamnějších zdrojů

antioxidantů, bylo například zjištěno, že se v ústech zároveň tvoří také určité množství H_2O_2 . Často nabývají polyfenoly vlastností pro-oxidantů v přítomnosti kovových iontů. Mírný oxidativní stres způsobený pro-oxidanty může mít ale na druhou stranu pozitivní přínos, kdy se může obrannou reakcí na stres zvyšovat množství antioxidantů vedoucí k celkové ochraně vnitřního prostředí (Haliwell, 2008). Některé studie však dokazují zároveň i negativní působení některých rostlinných antioxidantů. Bylo zjištěno, že flavonoid kamferol, který je strukturálně blízký kvercetinu může za přítomnosti Fe^{3+} a Cu^{2+} snadno poškozovat DNA a napomáhat škodlivé oxidaci lipidů (Sahu and Gray, 1994). Velmi podobně je tomu tak i v případě myricetinu (Sahu and Gray, 1993). Negativní, přesněji genotoxický efekt, byl dokázán ale především u syntetických antioxidantů, které jsou uměle vyráběny a záměrně přidávány do potravin jako nejrůznější konzervanty (především k zamezení žluknutí tuků) a jako barviva (Kahl and Kappus, 1993). Dle vládních a hygienických nařízení se výzkumy však v poslední době zabývají hledáním alternativních konzervačních látek, které by mohly nahradit stávající syntetické konzervanty, nicméně je to ve většině případů stále pouze předmětem testování (Ghasemzadeh et al., 2010). Antioxidační aktivita látky je každopádně úzce spjatá s počtem a polohou hydroxylových skupin. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u flavonoidů, které obsahují hydroxylovou skupinu v 3' a 4' poloze na B kruhu (Cao et al., 1997; Farkas et al., 2004), (Obr. 6).



Obr. 6. Významné OH skupiny u kvercetinu z hlediska antioxidační aktivity

V lidském těle bojuje proti oxidačnímu poškození přirozený imunitní systém, který je tvořen antioxidačními enzymy jako například superoxidodismutázou, glutathionperoxidázou, katalázou (Kumarasamy et al., 2007) nebo antioxidanty přítomnými v lidských tkáních jako

kyselina askorbová (vitamin C) nebo vitamin E (Chow 1991). Bylo však zjištěno, že antioxidační potenciál flavonoidních molekul je vyšší než potenciál vitaminu E a C (Spanos and Wrolstad, 1990). Eberhard et al., (2000) pomocí metody TOSC (total oxyradical scavenging capacity) na druhou stranu zase zjistili, že pouze 0,4 % vitaminu C, přítomném v jablkách se podílí na antioxidační aktivitě, což ostatně dokazují i další studie (Proteggente et al., 2002; Kardeniz et al., 2005), které přicházejí s poznatkem, že celková antioxidační a protizánětlivá aktivita rostlinných polyfenolů nemusí nutně korespondovat s množstvím přítomného antioxidantu nebo určitou skupinou flavonoidů, ale je výsledkem působení hned několika složek rostlinných sekundárních metabolitů (Sun et al., 2010). Obecně se však v *in vitro* testech spíše potvrzuje korelace přímé úměry polyfenolů a antioxidační aktivity (Cai et al., 2004; Nakamura et al., 2009). Právě z tohoto důvodu je červené víno se svým vysokým obsahem polyfenolických látek výborným zdrojem nejen protizánětlivých látek ale i antioxidantů (Nikfardjam, 2006). Nejvyšší antioxidační aktivitu červené vinné révy vykazují semena, následuje slupka, přičemž nejnižší potenciál má dužina bobulí (Bonilla et al., 2003). Při testování antioxidační aktivity pro tři různé koncentrace džusů vyrobených z červené vinné révy vykazoval 25% a 50% podíl extraktu hroznového vína v tomto nápoji vyšší antioxidační aktivitu oproti 10% koncentraci, ale mezi vyššími dvěma nebyl téměř žádný rozdíl (Xia et al., 2010) Je tedy možné, že antioxidační kapacita polyfenolů může mít přece jen jistý limit a při překročení této hranice již aktivita nestoupá úměrně s koncentrací (Dani et al., 2009).

Hlavním důvodem poškození lidských buněčných struktur a membrán je zvýšené množství oxidačních produktů lipidů, zejména lipoproteinu s nízkou hustotou (LDL) a bílkovin (Volf and Andrs, 2008). Polynenasycené mastné kyseliny, jejichž dvojná vazba jsou náchylné právě k oxidaci, jsou následkem řetězové reakce prostřednictvím volných radikálů oxidačně poškozovány. Lipoperoxidační produkty se následně mohou začít akumulovat v cévní stěně a způsobit aterosklerózu, neboli kornatění tepen anebo mohou začít indukovat sekreci prozánětlivých cytokinů (Haberland et al., 1996; Berliner and Heinecke 1996). Bylo zjištěno, že již po dvou týdnech pravidelného užívání červeného vína (400 ml denně) byla znatelně zvýšena odolnost LDL vůči oxidaci a tím tedy také inhibována lipoperoxidáza a zároveň došlo k nárůstu celkové koncentrace polyfenolických sloučenin v lidské plazmě. U bílého vína konzumovaného ve stejné míře žádná podobná účinnost zaznamenaná nebyla, a to pravděpodobně z důvodu nízkého výskytu polyfenolů (Tsang et al., 2005). Koncentrace cholesterolu patřícího mezi lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL – high

density lipoproteins), který není označován svou přítomností v lidském těle za škodlivý, byla ovšem zvýšena u obou typů, u červeného vína znatelněji. Tyto hodnoty nemusí nicméně souviset s množstvím polyfenolů, ale spíše přítomností alkoholu samotného (Gaziano et al., 1993). V červené vinné révě patří resveratrol mezi polyfenoly, které se na inhibici LDL oxidace podílí velkou měrou (Chen et al., 2007; Meyer et al., 2008) Ve studii Frankel et al., (1998), ve které testovali *in vitro* několik vzorků komerčně vyráběných džusů z červené vinné révy, byla zjištěna vyšší inhibiční aktivita proti LDL oxidaci také u katechinu a rutinu, přičemž celkově vykazovaly 10 μ M koncentrace vzorků džusů v tomto testu srovnatelnou inhibiční aktivitu (až 75 %) se vzorky červeného vína (až 90 %) o stejné koncentraci. U nealkoholického nápoje vyrobeného z révy bílé, byly rozdíly v porovnání se vzorky bílých vín podstatně rozdílnější. Vliv oxidačního stresu se ve velké míře projevuje svým negativním působením nejen při vzniku diabetes, ale i v jedné z posledních fází tohoto onemocnění, a to u diabetické neuropatie (DN – diabetic neuropathy), poškození funkce a struktury periferních nervů. Po kardiovaskulárních problémech je to druhá nejčastější vážná komplikace u pacientů postižených cukrovkou (Brownlee, 2001). Při testech u laboratorních králíků resveratrol prokazatelně inhiboval cytokin IL-1 β a redukoval defosforylaci adenosin monofosfátem aktivovanou proteinkinázu (AMPK – adenosine monophosphate-activated protein kinase), který se uplatňuje při metabolismu buněčné energie, a tím docházelo i k redukcí deficitu inzulinu. Oba tyto faktory hrají důležitou roli jak během celkového průběhu hyperglykemie, tak zároveň i v rané fázi DN a jsou velmi citlivé na působení oxidačního stresu (Chang et al., 2001). Vysoká antioxidační aktivita byla zaznamenána také u kvercetinu. Kvercetin svými antioxidačními schopnosti navíc inhibuje xantinoxidázu, a tím zlepšuje průběh v řadě onemocnění, zejména tedy hyperurikemie (Chang et al., 1993). Pozitivní výsledky vykazuje kvercetin také při inhibici oxidačního stresu u kuřáků (Yoon et al., 2013), který se velkou měrou podílí na vzniku nejrůznějších plicních onemocnění, včetně rakoviny, která souvisí s poškozením alveolárních epitelových buněk (Aoshiba and Nagai, 2003). Každým vdechnutím cigaretového kouře člověk přijímá mezi 10¹⁴⁻¹⁶ volných radikálů (Hecht, 2007), zároveň se v plicích zvyšuje i množství zánětlivých prostaglandinů PGE₂ (Marnet, 2009). Nicméně Welton et al., (1988) přišli s tvrzením, že tento flavonol projevuje své pozitivní účinky pravděpodobně o trochu více v rámci inhibice cyklooxygenázy svými protizánětlivými vlastnostmi než při inhibici oxidačního stresu. Je třeba však podotknout, že výsledky mnohých studií se často velmi významně liší především v závislosti na druhu metody, která byla během testování použita. Existuje hned několik metod na zjištění antioxidační aktivity, ale žádná z nich nebyla doposud vyloženě definována jako univerzální a tudíž se doporučuje

při každém experimentu použít ke kritickému porovnání výsledků minimálně dvě metody. (Schlesier et al., 2002; Prior et al., 2005).

3.5 Protizánětlivé účinky červeného vína

Protizánětlivé účinky červeného vína, které jsou úzce spojeny s antioxidační aktivitou, tvoří výslednici působení všech komponentů vyskytujících se v tomto nápoji, zejména polyfenolů. Nejvyšší protizánětlivé vlastnosti vykazují fenolické složky, které se vyskytují v semenech vinné révy (Chacona et al., 2009).

Zánět je nejstarší obranný mechanismus, jedná se vlastně o odpověď organismu na poškození jeho buněk nebo tkání. Toto poškození mohou vyvolat mechanické, chemické, fyzikální i bakteriální faktory. Odpověď organismu na poškození v závislosti na jeho rozsahu a délce trvání může být lokální nebo celková. Lokální zánět se projevuje zčervenáním, bolestí, otokem a zvýšenou místní teplotou, u celkového zánětu doprovázejícího vysoké horečky může dojít až ke zhroucení funkcí organismu a způsobení smrti. (Ferenčík et al., 2005). Z hlediska hlavního rozdělení v rámci zánětlivých procesů lze rozlišit zánět akutní a chronický. U akutního zánětu, který trvá obvykle od několika minut do 2 týdnů, nebývá zpravidla poškozená tkáň. Pokud se ale nepodaří infekci odstranit, nastupuje chronický zánět, který má poškozující charakter, a je specifický zvýšeným množstvím lymfocytů a makrofágů (Rodríguez et al., 2003). Zánětlivé reakce se účastní nejrůznější buňky jako neutrofilů, makrofágy, T-lymfocyty, trombocyty nebo signální molekuly (cytokiny). Mezi další důležité látky patří zánětové mediátory, které regulují průběh zánětu, a to ať už z hlediska inhibičního, tak podporujícího. Patří zde například faktor nádorové nekrózy (TNF), interleukiny (IL-x) nebo makrofágový zánětový protein (MIP-1), (Nathan, 2002). Polymorfonukleární leukocyty (PMNs), v podstatě neutrofilů se účastní první fáze zánětu a pomocí cytokinů mobilizují složky imunitního systému (Simon et al., 2002). Několik studií dokazuje inhibiční efekt resveratrolu prakticky v celé první fázi, a to od počáteční aktivace PMNs až k následné reakci zánětových mediátorů (Pervaiz and Goetze, 2012; Cavallaro, 2003). TNF hraje zásadní roli při styku s cytokiny, a to z hlediska přilnavosti neutrofilů v cévním endotheliu, kterou aktivuje mezibuněčná adhezivní molekula (ICAM). Výzkumy ukazují, že resveratrol inhibuje ICAM, a tím i přilnavost neutrofilů k endotheliu a brání tak rozvoji zánětu (Cronstein and Weissmann, 1993). Resveratrol také prokázal účinný inhibiční efekt na redukci reaktivních kyslíkových metabolitů zahrnujících superoxid O_2^- , peroxid vodíku H_2O_2 nebo například kyselinu chlornou (HOCl), které jsou pomocí zánětových mediátorů uvolňovány

leukocyty (Rotondo et al., 1998). Při zánětu se v lidském organismu zvýší také množství oxidu dusnatého (NO), který má mikrobicidní vlastnosti a vzniká inducibilní syntázou oxidu dusnatého (iNOS – inducible nitric oxide synthase). *In vitro* studie dokázaly inhibiční vlastnosti resveratrolu na produkci NO, a tím i utlumení zánětů (Leiro et al., 2002). Podobné inhibiční účinky na iNOS vykazuje také kvercetin, který ostatně působí na velmi podobných principech jako resveratrol. Nejlepších výsledků vykazuje kvercetin na iNOS v kombinaci s resveratrole a rutinem, což opět může svědčit o zvýšené protizánětlivé aktivitě při synergickém působení více komponentů ve srovnání s jednou látkou. Stejně tak kvercetin inhibuje COX-2, TNF a blokuje oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou, které indikují sekreci prozánětlivých cytokinů (Mazière et al., 2001). Z hlediska protizánětlivého efektu je významný v červeném víně i rutin (glykosid kvercetinu), který se osvědčil jak v akutní, tak chronické fázi zánětu u testovaných laboratorních myší (Rao et al., 2007).

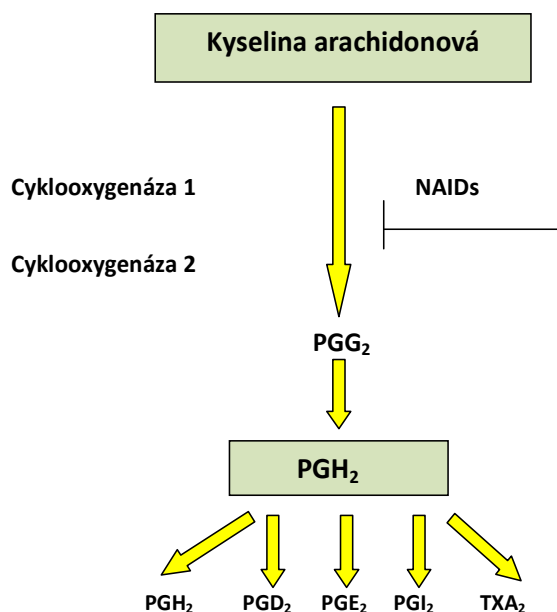
3.6 Protinádorové účinky červeného vína

Na vzniku rakovinotvorných onemocnění se mimo dalších nejrozličnějších faktorů pravděpodobně podílí obě formy cyklooxygenázy, přičemž u COX-2 jde o významnější vliv (Marnett, 2009) Jedním z mnoha vysvětlení by mohla být spojitost mezi vážnými a chronickými záněty vedoucími k vyšší pravděpodobnosti rozvoje rakovinotvorného onemocnění. (Lu et al., 2006). Komponentů vyskytujících se v červeném víně, u kterých byla zaznamenána protinádorová aktivita je hned několik. Mezi nejvýznamnější patří myricetin (He et al., 2008), kvercetin a resveratrol (Soleas et al., 2002). Přestože množství myricetinu a kvercetinu v červeném víně několikrát převyšuje množství resveratrolu (viz. Tab. 2), protinádorovou aktivitu resveratrolu zvyšují pravděpodobně také přítomné epikatechiny a katechiny, které společně vykazují synergický efekt (Szewczuk and Penning, 2004). Protinádorová aktivita resveratrolu (označena v tomto případě za inhibiční potenciál na COX-1), ($ED_{50} = 15 \mu\text{M}$) byla stanovena například ve studii Gierse et al. (1995) jako nižší než u indomethacinu ($ED_{50} = 2,3 \mu\text{M}$), vykazovala ale na druhou stranu zároveň lepší inhibiční účinky na COX-1 než třeba aspirin ($ED_{50} = 880 \mu\text{M}$). Po 18 týdenních pokusech na potkanech s indukovaným nádorem kůže byla inhibice růstu nádorů léčena referenčním chemoterapeutikem (dimethylbenz-(a)anthracenem – DMBA a tetradecanoylphorbol-13-acetátem – TPA) necelých 40 %. Při podávání 25 μmol resveratrolu společně s těmito chemoterapeutiky dosahovala oproti tomu inhibice až 88 %. Resveratrol by mohl být tedy potenciálním alternativním doplňkem při léčbě nádorů (Jang et al., 1997). Z několika desítek oficiálních klinických testů dostupných na webových stránkách Clinicaltrials.gov bylo

však ohledně protinádorové aktivity resveratrolu prozatím dokončeno jen několik studií. V rámci testování kvercetinů z hlediska jeho protinádorového potenciálu bylo doposud dokončeno a publikováno více experimentů. Paradoxně byl kvercetin po dlouhou dobu zařazován mezi jeden z potenciálních mutagenních flavonoidů (Lamson and Brignall 2000). U kvercetinů byla prokázána například inhibice genu p53, který je považován za jeden z nejběžněji se vyskytujících mutagenních genů v širokém spektru rakovinotvorných onemocnění, na téměř minimální hodnoty u pacientů trpících rakovinou prsů (Avila et al., 1996). Zároveň byla zaznamenána během jedné hodiny u 9 z 11 pacientů výrazná inhibiční aktivita proteinu tyrozin kinázové aktivity, který hraje významnou roli v buněčném cyklu a vývoji mnoha druhů rakoviny. Tato aktivita přetrvávala až 16 hodin (Ferry et al., 1996). U léku doxorubicinu, který je široce používán při léčbě nejrozličnějších nádorů zase zvyšoval kvercetin léčebný efekt a tlumil negativní vedlejší účinky (Staedler et al., 2011).

3.7 Cyklooxygenáza

Před dvaceti třemi lety byl poprvé identifikován enzym cyklooxygenáza (COX), který katalyzuje reakci přeměny kyseliny arachidonové (AA) na prostaglandiny (PGs), (Simmons et al., 2004).

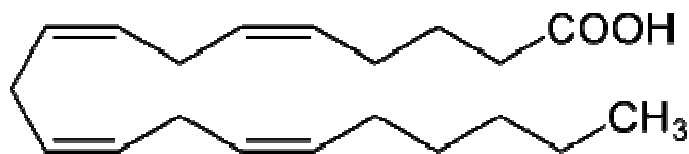


Obr. 7. Schéma přeměny kyseliny arachidonové
Převzato a upraveno z: Dubois et al., (1998)

Prostaglandiny (PGs) jsou látky podobné hormonům, které byly poprvé objeveny ve 30. letech 20. st. v předstojné žláze, odtud byl ostatně odvozen i jejich název. Původně

bylo myšleno, že se podílí na pohybu spermií. Až v 60. letech se zjistilo, že tyto látky vznikají přeměnou nenasycené mastné kyseliny arachidonové (Clária, 2003). V dnešní době jsou prostaglandiny definovány jako dvacetihlíkaté sloučeniny, obsahující jeden pětiuhlíkatý kruh, děleny do deseti skupin, které jsou označovány písmeny A až J. PGs netvoří specializované buňky, nejsou transportovány pomocí krve, ale účinkují místně. Mají velké množství účinků, které se různí podle typu orgánu, v němž se tvoří a druhu PGs. Ovlivňují prokrvení, podílejí se na tvorbě mnoha důležitých látek včetně hormonů, účastní se srážení krve i imunitních a zánětlivých procesů, zvyšují stahy děložní svaloviny atd. Používají se i léčebně např. při některých cévních poruchách nebo v porodnictví (Wallace, 2008; Hao and Breyer, 2008).

Kyselina arachidonová je 20uhlíkatá vícenenasycená mastná kyselina, která se do těla dostává buď s potravou, především z masa a ryb nebo je syntetizována z kyseliny linolové, která je přítomna v mnoha rostlinných olejích, například slunečnici. Za normálních podmínek je většina AA vázána ve fosfolipidové membráně a koncentrace volné AA je nízká. Koncentraci volné AA v buňkách však lze dočasně zvýšit vyšším příjmem kyseliny linolové v potravě nebo hydrolýzou fosfolipidové membrány fosfolipázou (Hughes et al., 2005). Přímý zvýšený příjem masa a tučných ryb a jiných živočišných zdrojů může tedy způsobit nadbytek této kyseliny v lidském organismu. Při nadbytku arachidonové kyseliny, která stimuluje produkci zánětlivých prostaglandinů v rámci cyklooxygenázy, může být pro lidský organismus tedy složitější zmírnit zánětlivý proces. Příjem tuků v lidské stravě je nezbytný pro stavbu buněčných membrán, které jsou tvořeny lipidy a fosfolipidy, nadbytečný příjem ale může vést k větší náchylnosti buněčných membrán k oxidativnímu stresu. Je tedy třeba vhodně nakombinovat stravu rostlinných a živočišných tuků, a to především v období zánětlivých onemocnění (Adams, 2010).

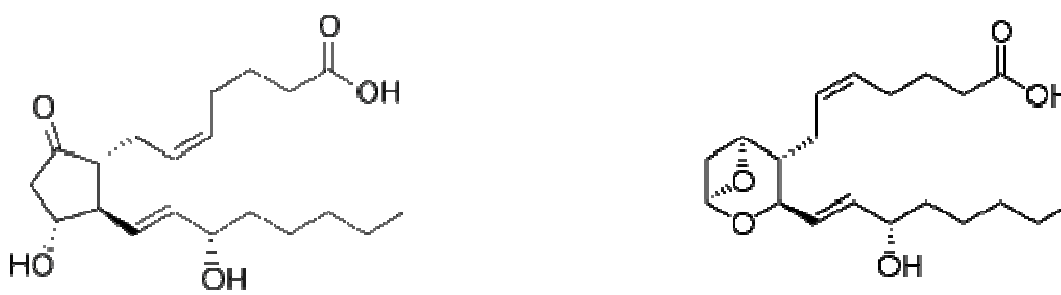


Obr. 8. Strukturální vzorec kyseliny arachidonové

3.7.1 Funkce cyklooxygenázy

Cyklooxygenáza se vyskytuje ve dvou izoformách, a to v COX-1, která se nazývá konstitutivní, protože se stabilně vyskytuje v organismu a COX-2, která je označována

za formu inducibilní, kdy její koncentrace stoupá při zánětlivých onemocněních (Clária, 2003). Obě formy enzymů se nepříliš strukturálně odlišují a jsou odvozeny od velmi vzdálených genů, které vznikly o mnoho desítek let dříve než savci. V lidském těle jsou lokalizovány na vnitřní straně endoplazmatického retikula a na jaderné membráně, přesněji na chromozomu 9 (COX-1) a chromozomu 1 (COX-2), (Funk et al., 1991). V první fázi COX se přeměňuje AA na hydroperoxyendoperoxid G_2 (PGG_2), následná peroxidázová aktivita přeměňuje PGG_2 na hydroxylperoxid PGH_2 . PGH_2 je výchozí složkou pro syntézu dalších prostanoidů v závislosti na místě vzniku (Simmons et al., 2004), jako například PGE_2 , který je odpovědný za hlavní bolestivé projevy během zánětu včetně vysoké horečky (Dubois et al., 1998), ale i tromboxanů TXA_2 , které stimulují agregaci krevních destiček, a tudíž napomáhají k zástavě krvácení (Petronni et al., 1995).



a) Prostaglandin E₂-PGE₂

b) Tromboxan A₂-TXA₂

Obr. 9. Strukturální vzorec prostaglandinu a tromboxanu

COX-1 jakožto konstitutivní forma je hlavním zdrojem prostanoidů, které se v určitém množství vyskytují nestále téměř ve všech tkáních lidského těla, jako například ve sliznici trávicího traktu nebo v ledvinách, kde se podílejí na udržení hemodynamické regulace. COX-2 je zvyšována nejrůznějšími zánětlivými stimuly, zároveň se jedná o hlavní zdroj prostanoidů při vážných onemocněních, například rakoviny (Ricciotti and FitzGerald, 2011). Jedním z dalších rozdílů mezi COX-1 a COX-2 je schopnost COX-2 přijímat také endogenní kyselinu arachidonovou jako alterantivní substrát, COX-1 požaduje pouze exogenní formu AA. (Clária, 2003). Odlišně se obě formy enzymů chovají také při sestřihu mediátorové RNA (Dubois et al., 1998).

3.7.2 NSAIDs a alternativní inhibitory

Skupina léků, které inhibují aktivitu COX se nazývají nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAIDs). V současné době jsou tyto léky asi nepoužívanějšími prostředky pro léčbu

nejrůznějších onemocnění po celém světě. Nejběžnějšími zástupci klasických neselektivních NSAIDs je například aspirin, ibuprofen nebo indomethacin. Do NSAIDs je dále zahrnuta druhá skupina, a to selektivních inhibitorů COX-2, mezi kterou patří například celecoxib nebo valdecoxib. Tato skupina je schopna ve vyšší míře inhibovat COX-2 bez toho, aniž by nějak významně ovlivňovala COX-1 (Siebert et al., 1994). Všechny NSAIDs mají protizánětlivé, analgetické a antipyretické účinky (Pavloušek, 2011). Jen ve spojených státech se ročně za tyto léky utratí 5–10 miliard dolarů. Přes obrovský rozmach těchto léčiv za poslední století nebyl jejich mechanismus účinku detailně objasněn až do roku 1971, kdy byla poprvé publikována studie, která objasnila schopnosti NSAIDs inhibovat COX, a tím také snižovat produkci prostaglandinů v místě zánětu (Dubois et al., 1998). Na základě poznatků o důležitosti přítomnosti nejrůznějších prostaglandinů v lidském těle bylo jen otázkou času, kdy budou podrobně rozebrány nežádoucí účinky NSAIDs. Již v poměrně krátké době se po užití NSAIDs mohou objevit žaludeční nebo ledvinové potíže, a to až u 25 % uživatelů, přičemž u 5 % to může vést k závažnému onemocnění (Reed et al., 1996). Nežádoucí zažívací potíže jsou pravděpodobně spojeny s inhibicí COX-1, která redukuje výskyt prostaglandinů, které chrání žaludeční sliznici (Lanas, 2001). Z tohoto důvodu se výzkumy posledního desetiletí snažily nalézt léky, které by se zaměřili pouze na inhibici COX-2 (Siebert et al., 1994). Na druhou stranu existuje velká řada studií, která dokazuje inhibující tendenci NSAIDs, zejména aspirinu jakožto selektivního inhibitoru COX-1, při pravidelném užívání nejen na snížení rizika srdečních onemocnění (až o 25 %), (Witt, 1999; Altman et al., 2004), ale také na výskyt různých druhů nádorů (Rothman et al., 2012; Rosenberg et al., 1991; Greenberg et al., 1993). Mnoho výzkumů se také proto začalo zabývat alternativními inhibitory cyklooxygenázy, především z rostlinných druhů, které by mohly podobným způsobem jako NSAIDs působit protizánětlivě a navíc zároveň redukovat růst nádorových buněk bez vedlejších nežádoucích účinků (Jang et al., 1997). Z hlediska převážně protizánětlivého účinku vykazovaly vysokou aktivitu léčivé rostliny pocházející zejména z Asijského kontinentu, například zimolez japonský (*Lonicera japonica*), (Xu et al., 2007), přestup obecný (*Smilax glabrae*), (Klučková, 2010) nebo kořen balonovníku (*Jiengeng*), (Reininger and Bauer, 2006). Ze snadno dostupných alternativních zdrojů je to například zázvor nebo kurkuma. Tyto léčivé byliny opírající se o základy indické medicíny Ayurvedy, dokáží inhibovat až ze 75 % nepříjemné symptomy doprovázející zejména artritidu (Srivastava et al., 1992; Arora, 1971). U žlutého barviva a zároveň hlavní biologicky aktivní složky kurkuminu pocházejícího z kurkumy byl zaznamenán také protinádorový potenciál,

a to v případech hned několika druhů rakoviny jako například leukémie (Su et al., 2008) nebo rakoviny prostaty (Killian et al., 2012). Podstatou jeho účinku je pravděpodobně inhibice aktivity I-kB kinázy, která přispívá v rozvoji rakovinotvorných onemocnění (Anad, 2008). Jednou z hlavních nevýhod této drogy je však malá vstřebatelnost díky nízké rozpustnosti v tělních tekutinách. Z tohoto důvodu se také výzkumy zaměřují na hledání synergické složky, která by zvýšila při současném podávání kurkuminu jeho dostupnost v cílových tkáních (Anad et al., 2007).

Červeného víno, zejména díky vysokému obsahu polyfenolů, které jsou schopny inhibovat obě izoformy COX, vykazuje mimo antioxidantní, protizánětlivých a protinádorových vlastností zároveň i pozitivní výsledky v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, a to především díky resveratrolu, který pravděpodobně podobným způsobem jako aspirin výrazněji inhibuje COX-1 (Szewczuk et al., 2004a; Perrone et al., 2010). Tímto poznatkem by tedy resveratrol mohl být označen za jednu z hlavních složek, na které je založena podstata Francouzského paradoxu (Szewczuk and Penning, 2004).

4 Materiál a metody

4.1 Laboratorní materiál

Mikrotitrační destičky NUNC, 96 jamek pro měření DPPH, černé fluorescenční mikrotitrační destičky NUNC, 96 jamek pro měření ORAC, mikrotitrační destičky z ELISA Kitu pro měření COX od Cayman chemie, Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl, K_2HPO_4 – hydrogenufosforečnan draselný, KH_2PO_4 – dihydrogenufosforečnan draselný a AAPH – 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)dihydrochlorid, Hematin porcine, L-epinefrin, Na_2EDTA – ethylendiamintetraacetát, Indomethacin, DMSO – dimethylsulfooxid, $C_{20}H_{32}O_2$ – arachidonová kyselina, CH_2O_2 – kyselina mravenčí od Sigma-Aldrich, DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl, Methanol od Penta, Fluorescein od Fluka, rekombinantní lidská COX-2 od Cayman chemie

4.2 Testovaný materiál

Celkem bylo testováno 11 vzorků červeného vína. U pěti z nich se jednalo o tuzemské odrůdy, dalších šest pocházelo z Gruzie (Tab. 5).






4.3 Příprava vzorků

Všechny vzorky byly uchovávány v laboratorních zkumavkách. Po celou dobu testování byly skladovány při teplotě $-80^{\circ}C$ v mrazicím boxu Sanyo Electric Biomedical Co. LTD.







4.4 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH testu

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antioxidační aktivity čistých látek i různých směsných vzorků (Paulová et al., 2004). Principem je reakce testované látky se stabilním radikálem DPPH, jehož nepárový elektron způsobuje fialové zbarvení měřitelné při absorpenci 520 nm. Působením antioxidačních látek se intenzita zbarvení snižuje za vzniku DPPH-H (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazin), (Obr. 10) a měří se pokles absorpance v závislosti na čase.

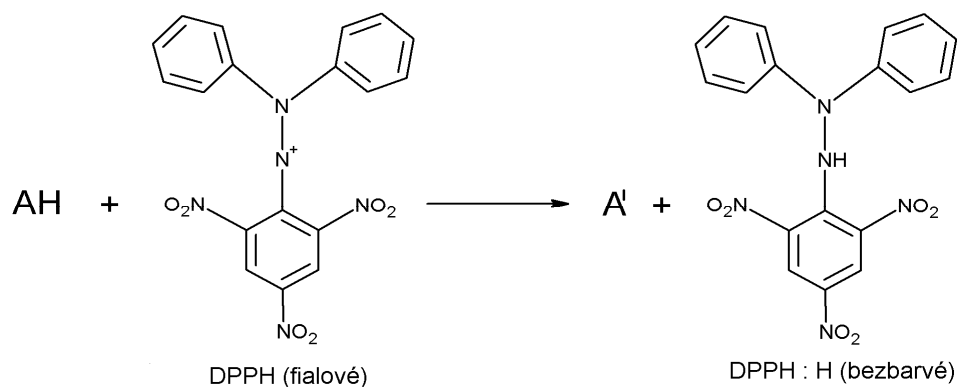
Tab. 5. Přehled testovaných vín a jejich stručný popis

č. vzorku	Název vína	Výrobce	Odrůda	Ročník	Země – Oblast – Podoblast	Obsah cukru	Alkohol (%)	
1	Víno Mikulov	Víno Mikulov. s. r. o	Cabernet Sauvignon	Neudáno	ČR – Morava – Mikulov	suché	12,5%	
2	Cabernet Moravia	Vinsekt Michlovský a. s.	Cabernet Moravia	2007	ČR – Morava – Slovácká podoblast	jakostní odrůdové – suché	12%	
3	Rulandské modré	Vinium a. s.	Rulandské modré	2008	ČR - Morava – Velké Pavlovice	jakostní odrůdové – suché	13%	
4	Cabernet Moravia	Templářské sklepy Slovakia s. r. o.	Zweigeltrebe a Cabernet Franc.	2008	ČR – Morava – Velké Pavlovice	jakostní odrůdové – suché	11,5%	
5	Cabernet Sauvignon	Templářské sklepy Slovakia s. r. o.	Cabernet Sauvignon	2008	ČR – Morava – Velké Pavlovice	jakostní odrůdové – suché	12%	

Tab. 5. Přehled testovaných vín a jejich stručný popis

Tab. 5. Přehled testovaných vín a jejich stručný popis – pokračování								
č. vzorku	Název vína	Výrobce	Odrůda	Ročník	Země – Oblast – Podoblast	Obsah cukru	Alkohol (%)	
6	Saperavi	Teliani Valley	Saperavi	2007	Gruzie – Kakheti	suché červené – nefiltrované	13%	
7	Akhasheni	Teliani Valley	Saperavi	2004	Gruzie – Kakheti	polosladké	11,5%	
8	Teliani	Teliani Valley	Saperavi	2005	Gruzie – Kakheti	suché	13%	
9	Napareuli	Teliani Valley	Saperavi	2005	Gruzie – Kakheti	suché	13,5%	
10	Mukuzani	Old Kolkheti	Saperavi	2006	Gruzie – Kakheti	suché	13%	
11	Saperavi organic	Nikolaishvili's	Saperavi	2003	Gruzie – Kakheti	suché	13%	

Tab. 5. Přehled testovaných vín a jejich stručný popis – pokračování



Obr. 10. Schéma přeměny DPPH na DPPH:H

Postup

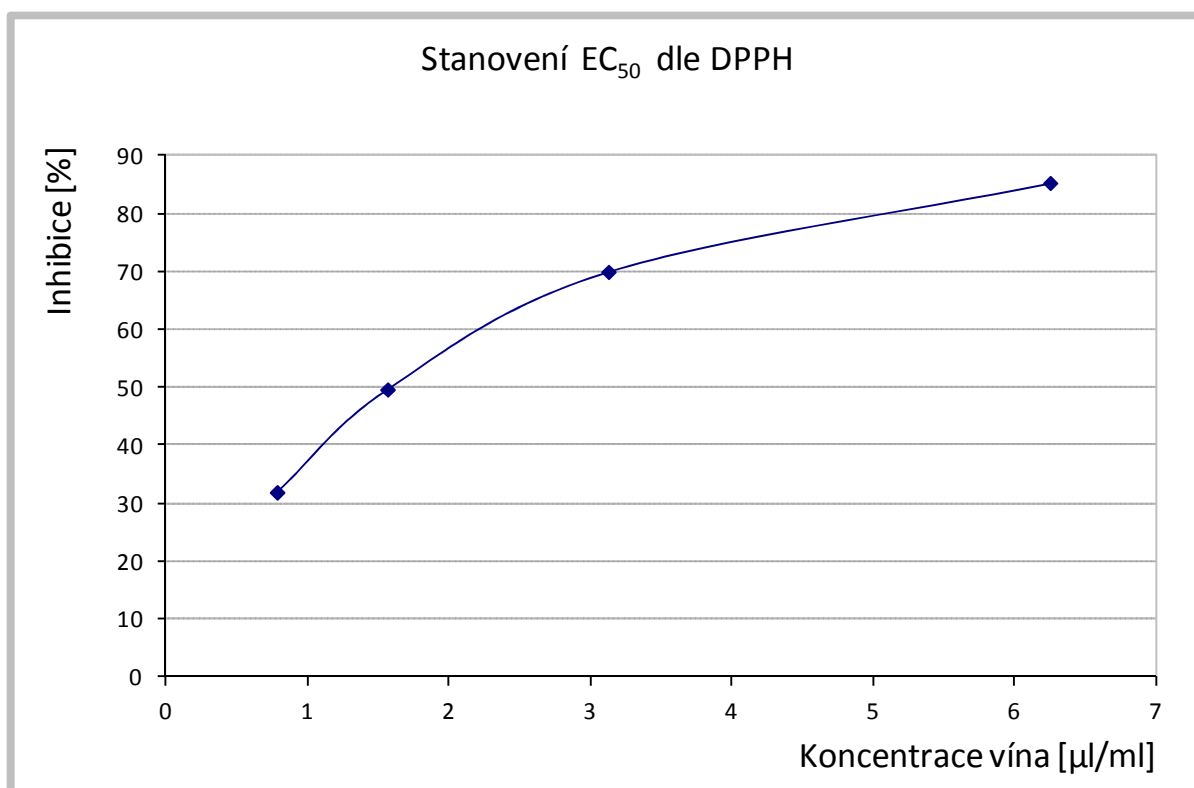
Byl připraven zásobní roztok troloxu o koncentraci 640 $\mu\text{g/ml}$ tak, že bylo rozpuštěno 6400 μg /troloxu v 1 ml methanolu. Z tohoto zásobního roztoku bylo odebráno 100 μl a doplněno 900 μl metanolu. Rozpuštěním 4 mg DPPH v 10 ml methanolu byl připraven 1 M roztok DPPH. Vzorky vín byly naředěny v metanolu na koncentraci 100 $\mu\text{l/ml}$.

Do všech jamek mikrotitrační destičky vyjma první řady bylo napipetováno po 100 μl methanolu. Do první volné řady bylo napipetováno 200 μl vzorku. Poté bylo z první řady odebráno 100 $\mu\text{l/ml}$, přeneseno do další jamky s čistým methanolem a promícháno. Tento postup pokračoval do sedmé jamky, ze které bylo po promíchání následně 100 μl odebráno, aby bylo zachováno stejné množství ve všech jamkách. Poslední osmá řada byla ponechána jako kontrola. Poté bylo přidáno do všech jamek 75 μl methanolu a nakonec 25 μl DPPH. Po dobu 30 minut byla mikrotitrační destička se všemi vzorky inkubována ve tmě a následně změřena absorbance vzorků v přístroji Reader Tecan Infinite M200 při vlnové délce 520 nm. Všechny vzorky byly měřeny ve třech nezávislých testech a dvou technických opakováních. Hodnoty absorbance byly přepočítány na procenta eliminace radikálu v každé jamce podle vzorce:

$$\text{Eliminace radikálu [\%]} = \frac{\text{absorbance (blanku)} - \text{absorbance (vzorku)}}{\text{absorbance (blanku)} \times 100}$$

Vypočtené hodnoty byly použity pro sestavení inhibičních křivek a z těch byly následně pomocí regresní analýzy zjištěny hodnoty EC_{50} , čili koncentrace vzorků, při kterých je

redukován z 50 % radikál DPPH. Tyto hodnoty byly poté přepočítány na ekvivalentní množství troloxu (mM troloxu/l vína).



Graf 1. Příklad stanovení EC₅₀ dle DPPH testu pro vzorek vína Saperavi

4.5 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ORAC testu

Princip

Tato metoda měří oxidační degradaci fluorescenční látky (fluorecein) po přidání generátorů volných radikálů. Vzniklé peroxylové radikály oxidují fluorescenční sondu, což následně způsobí ztrátu její fluorescence. Antioxidanty chrání molekulu před oxidačním poškozením. Hodnotí se rychlost úbytku fluorescenčního signálu po přidání testovaného vzorku.

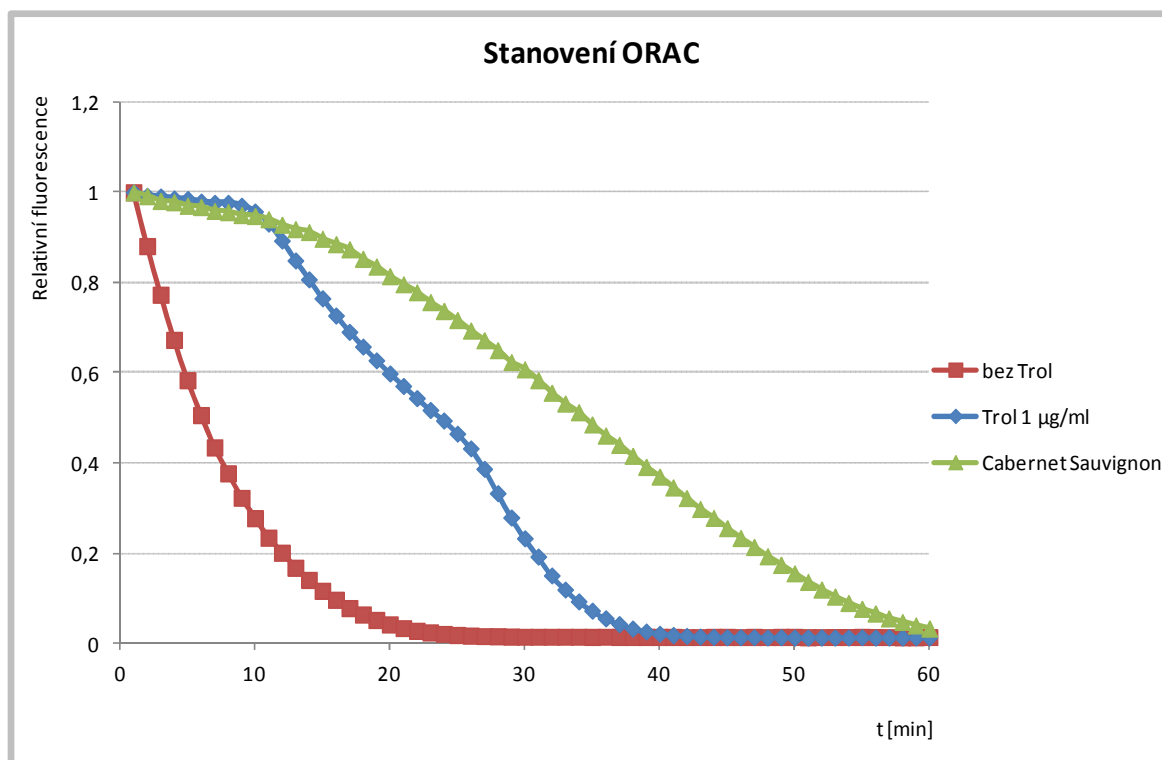
Postup

Ze zásobních roztoků K₂HPO₄ (0,1 M) a KH₂PO₄ (0,1 M) byl připraven fosfátový pufr o koncentraci 75 nM a pH 7. Pufr byl udržován v lednici při teplotě 4 °C. Rozpuštěním 0,414 g v 10 ml pufru bylo připraveno AAPH o koncentraci 153 mM a po celou dobu

experimentu bylo uchovááno na ledu. Dále bylo naváženo 0,0018 g fluoresceinu a naředěno v 10 ml pufru na výchozí koncentraci 480 μM . Tento zásobní roztok byl následně naředěn 10 000 krát na konečnou koncentraci 48 nM. Jako referenční standard byl použit trolox o koncentraci 1, $\mu\text{g/ml}$. Všechny vzorky vína byly naředěny 400 krát a po přidání do reakce byla finální koncentrace 1:1600 (625 $\mu\text{l/ml}$).

Po obvodu mikrotitrační destičky bylo napipetováno 300 μl H_2O z důvodu lepší tepelné stability. Do jamek mikrotitračních destiček bylo zpočátku napipetováno 25 μl vzorku. Poté bylo přidáno 150 μl fluoresceinu. Vzorek s fluoresceinem se nechal inkubovat po dobu 10 minut při teplotě 37 $^\circ\text{C}$. Po uplynutí inkubační doby bylo přidáno do vzorků 25 μl AAPH. Součástí každé destičky byla také pozitivní kontrola, ve které nebyl přítomen radikál (pouze fluorescein) a negativní kontrola, ve které nebyl přítomen antioxidant. Měření probíhalo v přístroji Reader Tecan Infinite M200 po dobu 1 hod při 37 $^\circ\text{C}$, přičemž čtení všech vzorků bylo zaznamenáváno každou minutu. Všechny vzorky byly měřeny ve čtyřech nezávislých testech a dvou technických opakováních.

Účinnost vzorků byla vypočtena z normalizovaných ploch a přepočtena na ekvivalenty troloxu.



Graf 2. Stanovení ORAC testu pro vzorek vína Cabernet Sauvignon

4.6 Testování protizánětlivé aktivity pomocí COX-1 a COX-2

Princip

Enzymy COX-1 a COX-2 jsou za přítomnosti substrátu kyseliny arachidonové a kofaktorů hematinu a epinefrinu schopné produkovat prostaglandiny. Hlavním produktem reakce je PGE₂, který je v *in vivo* podmínkách zodpovědný za většinu negativních projevů a příznaků zánětlivého onemocnění (Reininger and Bauer, 2006). Při reakci, ve které není přítomen žádný inhibitor (blanky) dochází k maximální možné produkci PGE₂, zatímco pokud je v reakci přítomna látka nebo více látek schopných blokovat funkci enzymu, je produkce PGE₂ snížena.

Kvantifikace vyprodukovaného PGE₂ byla poté stanovena komerčním Elisa kitem. Princip metody je založen na kompetici PGE₂ vyprodukovaného při reakci a PGE₂ s navázaným alkalickým enzymem fosfatázou (pNpp), který je součástí kitu. Obě formy PGE₂ se vážou na protilátku navázanou na dně mikrotitrační destičky ELISA kitu. Po určitém čase se jamky destičky vypláchnou a zůstane tedy pouze navázané PGE₂. V případě převládnutí volného PGE₂ (aktivita COX nebyla inhibována) se přidaný pNpp substrát nezbarví. V případě převládnutí fosfatázou značeného PGE₂ (došlo k inhibici COX ve vzorku) dochází ke zbarvení. Podle schopnosti protizánětlivé aktivity testovaných vzorků byla hodnocena absorbance zbarvení substrátu pNpp. Absorbance tedy odpovídá množství vyprodukovaného PGE₂ ve vzorcích.

Postup

Rozpuštěním 1,211 g Tris v 90 ml deionizované vody a následnou úpravou pH na 8. 1 N HCl byla připravena smícháním 36 % HCl s 91,22 ml deionizované vody. Pomocí 1 N HCl byl připraven pufr o 100 mM koncentraci. Rozpuštěním 0,0016 g hematinu ve 1000 µl DMSO v mikrozkuhavce byl připraven zásobní roztok tohoto kofaktoru o koncentraci 2,5 mM. Poté byl pomocí Tris pufru 50 krát naředěn. Zásobní roztok kofaktoru L-epinefrinu o koncentraci 100 mM byl připraven rozpuštěním 0,02 g L-epinefrinu ve 1000 µl H₂O. Pro snadnější rozpustnost bylo navíc přidáno cca 60 µl 1 N HCl. Koncentrace 10 mM Na₂EDTA (pouze pro COX-2) byla připravena rozpuštěním 0,0037 g Na₂EDTA v 1000 µl H₂O a následně 100 krát zředěna pomocí Tris pufru. Pro konečné namíchání kofaktorů bylo použito 670 µl (a 720 µl v případě COX-1) Tris pufru, ke kterému byl přidáno 180 µl zásobního roztoku L-epinefrinu, dále 100 µl hematinu a nakonec 50 µl (jen pro COX-2)

naředěné Na_2EDTA . Připravené kofaktory byly po celou dobu udržovány na ledě. Arachidonová kyselina byla připravena v koncentraci $10\ \mu\text{M}$. Kyselina mravenčí (10 %) byla připravena smícháním $103\ \mu\text{l}$ 97 % formiátu s $897\ \mu\text{l}$ H_2O . COX-1 byla použita v koncentraci 1 U, COX-2 v koncentraci 0,5 U. Všechna vína byla naředěna 400 krát.

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno $180\ \mu\text{l}$ kofaktorů. Poté bylo přidáno $5\ \mu\text{l}$ COX a $10\ \mu\text{l}$ testovaného vzorku nebo H_2O v případě blanku. Následně byla reakční směs promíchána a pět minut inkubována při pokojové teplotě. Reakce byla započata přidáním $5\ \mu\text{l}$ kyseliny arachidonové, vzápětí byla reakční směs znovu promíchána a inkubována po dobu 20 minut při teplotě $37\ ^\circ\text{C}$. Po uplynutí inkubační doby byla reakce zastavena přidáním $10\ \mu\text{l}$ 10 % kyseliny mravenčí. Následně byly vzorky naředěny v poměru 1:15 v pufru, který je součástí PGE_2 ELISA kitu. Poté byly v ELISA destičce inkubovány společně se značeným PGE_2 s navázaným enzymem fosfatázou. Během inkubace docházelo ke kompetitivnímu vázání PGE_2 vzniklého v reakci se značeným PGE_2 na protilátku navázanou v mikrodestičce. Po 2 h inkubaci byla destička promyta puftrem a následně 45 min inkubována s pNpp (p-nitrofenyl fosfát) substrátem. Během inkubace došlo k zabarvení substrátu v závislosti na množství značeného PGE_2 . Absorbance zabarvení byla měřena pomocí přístroje Reader Tecan Infinite M200 při vlnové délce 405 nm. Měření proběhlo ve čtyřech nezávislých testech po dvou technických opakováních. Výsledky byly vyjádřeny jako procentuální inhibice PGE_2 oproti blanku podle vzorce:

$$\text{Inhibice [\%]} = 100 - \frac{\text{koncentrace } \text{PGE}_2 \text{ (vzorku)} \times 100}{\text{koncentrace } \text{PGE}_2 \text{ (blanku)}}$$

5 Výsledky

Celkově bylo testováno jedenáct vzorků vybraných odrůd červeného vína. Pro stanovení antioxidační aktivity byly použity dvě metody. Jednalo se o DPPH a ORAC metodu. Protizánětlivá aktivita byla stanovena inhibicí COX-1 a COX-2. V rámci DPPH a ORAC testování byly veškeré výsledky vyjádřeny jako průměrný výsledek ekvivalentu troloxu (ET) v jednotkách mM/l s příslušnou směrodatnou odchylkou (SD). (Tab 6). Trolox byl použit jako standard pro kalibraci u všech druhů metod. U protizánětlivé aktivity COX-1 a COX-2 byly výsledky vyjádřeny jako průměrná inhibice jednotlivých vzorků v procentech. (Tab. 6). Z regresní rovnice a determinačního koeficientu (R^2) byl stanoven koeficient

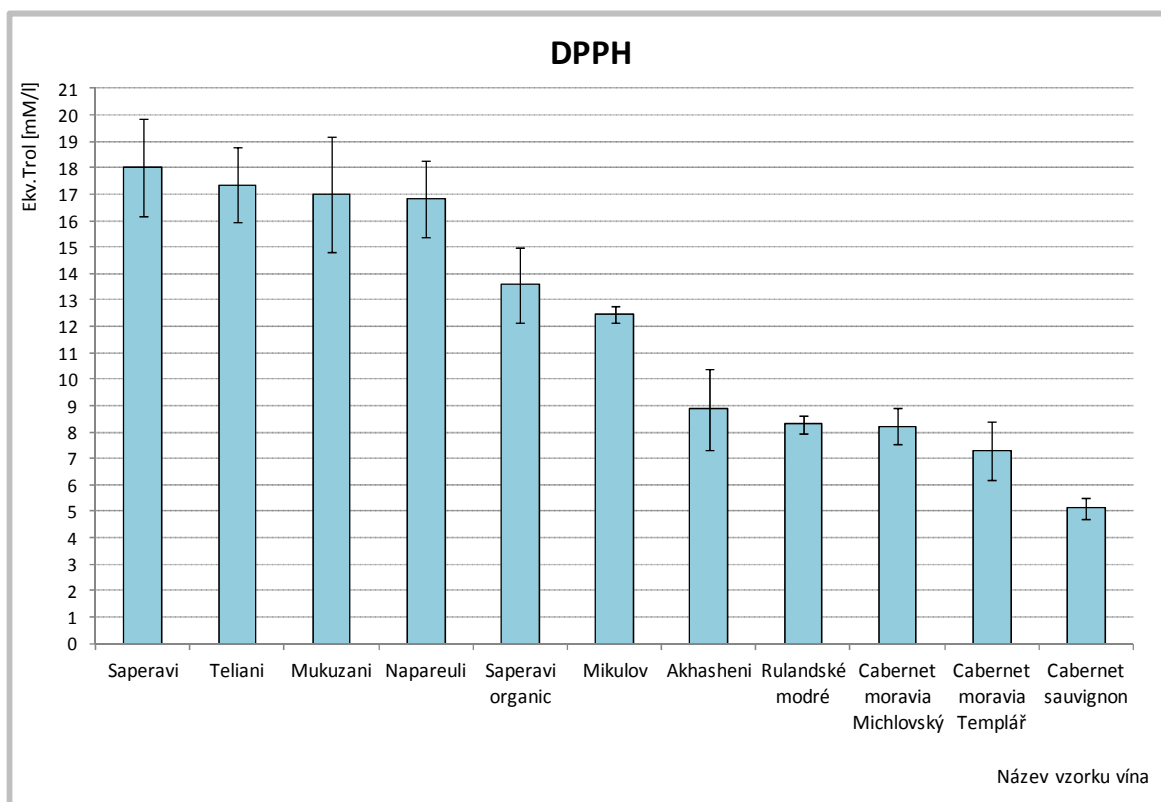
korelace (R), který vypovídá o míře podobnosti výsledků při srovnávání v rámci vybraných metod měření. Současně byly porovnány pomocí statistického nepárového t-testu střední hodnoty gruzínských a českých červených vín a vyhodnoceny statistické rozdíly. Nejvyšší antioxidační aktivitu při DPPH testování vykazovalo gruzínské víno Saperavi ($18,04 \pm 1,84$ mM ET/l), následoval vzorek Teliani s hodnotou $17,37 \pm 1,42$ mM ET/l, třetí nevyšší antioxidační potenciál byl zjištěn u Mukuzani ($17,01 \pm 2,19$ mM ET/l). Naopak nejnižší antioxidační aktivita byla zjištěna u českého vína Cabernetu Sauvignon pocházejícího z Templářských sklepů Čejkovice ($5,11 \pm 0,39$ mM ET/l). V rámci hodnocení pomocí ORAC dosáhlo nejvyšší aktivity víno Saperavi organic ($11,82 \pm 1,02$ mM ET/l), které bylo vypěstováno z bio vinné révy a ošetřováno ekologickými postupy, respektující ochranu životního prostředí. Těsně za ním následovalo klasické Saperavi ($11,47 \pm 1$ mM ET/l), pocházející ze stejné oblasti, ale odlišného pěstitele (při výrobě nebyla použita bio vinná réva). Stejně jako u DPPH testu byla třetí nejvyšší antioxidační aktivita zjištěna u vzorku z vína Mukuzani ($11,44 \pm 1,05$ mM ET/l). Nejslabší potenciál byl naměřen u českého Cabernetu Moravia od Templářských sklepů. ($9,42 \pm 0,54$ mM ET/l). Obecně vykazovala při DPPH měření v průměrném srovnávání Gruzínská vína ($15,28 \pm 2,71$ mM ET/l) vyšší antioxidační aktivitu než vína pocházející z České republiky ($8,28 \pm 1,68$ mM ET/l), (Graf 6). V rámci metody ORAC byly rozdíly při porovnávání gruzínských ($11,09 \pm 0,51$ mM ET/l) a českých vzorků téměř minimální ($10,19 \pm 0,51$ mM ET/l), (Graf 7). $10,19 \pm 0,51$ mM ET/l. Korelační koeficient (R) porovnávající závislost mezi oběma metodami hodnotící antioxidační aktivitu byl vyhodnocen na hodnotu 0,69 (Graf 10). Lze tudíž hovořit o zvýšené shodě, a tím i pravděpodobnosti správnosti výsledků, zejména u odrůd Saperavi a Mukuzani, u kterých byla zjištěna mezi jednotlivými testy téměř stejná pořadí při srovnávání s ostatními vzorky. Při stanovení inhibiční aktivity u COX-1 vykazovalo nejvýznamnější inhibiční potenciál víno Saperavi ($77,44 \pm 5,84$ %). Následoval další gruzínský vzorek Akhasheni ($76,66 \pm 14,57$ %). Jako třetí víno s nejvyšší inhibiční aktivitou bylo vyhodnoceno Saperavi organic s hodnotou $70,83 \pm 4,79$ %. Z českých zástupců byl nejvyšší inhibiční potenciál na COX-1 zjištěn u Cabernetu Moravia z vinařství Vinselekt Michlovský a. s. ($65,37 \pm 11,16$ %). Nejnižší aktivita byla zaznamenána u gruzínského vína Mukuzani ($33,14 \pm 6,9$ %). Při porovnání inhibiční aktivity na COX-1 (Graf 8) vykazovala Gruzínská vína v průměru vyšší inhibici ($60,03 \pm 14,95$ %) než vína pocházející z ČR ($47,61 \pm 4,26$ %). V rámci vyhodnocení inhibiční aktivity na COX-2 byl nevyšší protizánětlivý potenciál stanoven u českého Rulandského modrého ($72,38 \pm 2,15$ %). Druhou nejvýznamnější inhibiční aktivitu vykazoval vzorek Saperavi organic ($71,15 \pm 13,69$ %). U Akhasheni byla zjištěna třetí nejsilnější

protizánětlivá aktivita ($65,71 \pm 7,76$ %). Nejméně významný inhibiční potenciál na COX-2 byl naměřen u Cabernetu Moravia od Templářských sklepů ($32,48 \pm 6,6$ %). Celkově byla zjištěna (Graf 9) vyšší protizánětlivá aktivita u Gruzínských vzorků ($58,62 \pm 7,09$) v porovnání s průměrnými výsledky českých vín ($47,61 \pm 11,06$ %). Při porovnání antioxidační (DPPH) a protizánětlivé aktivity na COX-2 (Graf 11) byla zaznamenána minimální podobnost ($R= 0,1$).

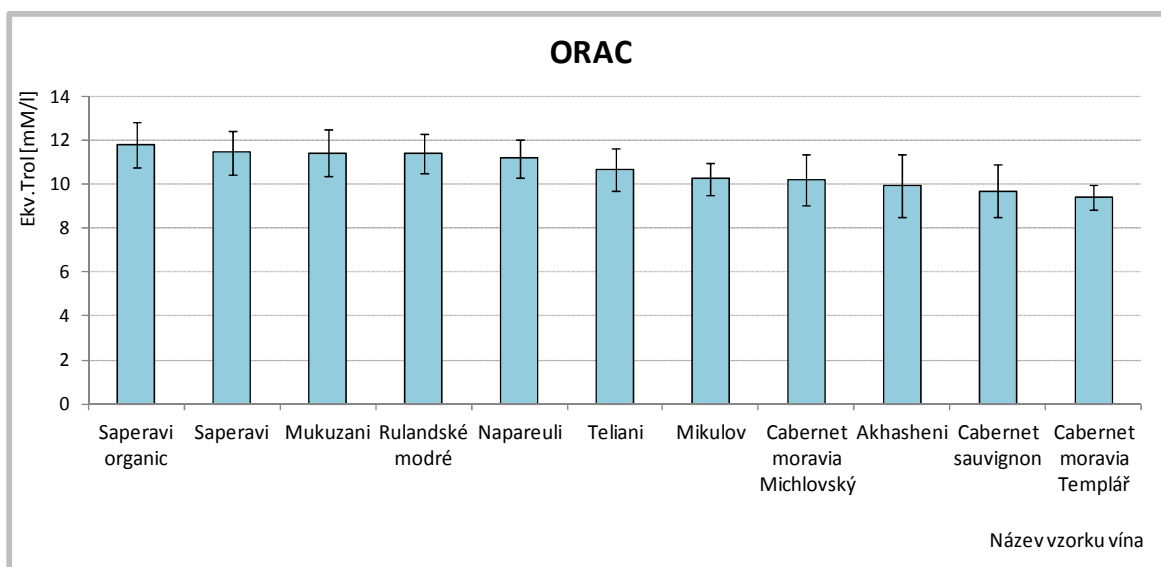
Tab. 6. Přehled naměřených hodnot dle testování DPPH, ORAC, COX-1 a COX-2

Název vína	Antioxidační aktivita						Protizánětlivá aktivita (při koncentraci vín 2,5 ml/l)					
	Metoda DPPH			Metoda ORAC			COX-1			COX-2		
	Průměr Ekv. Troloxu	±	SD	Průměr Ekv. Troloxu	±	SD	Průměrná Inhibice (%)	±	SD	Průměrná Inhibice (%)	±	SD
Mikulov	12,46	±	0,33	10,26	±	0,74	41,84	±	2,11	50,22	±	12,40
Cabernet Moravia Michlovský	8,22	±	0,68	10,19	±	1,18	65,37	±	11,16	59,02	±	4,00
Rulandské modré	8,29	±	0,35	11,41	±	0,91	63,98	±	12,82	72,38	±	2,15
Cabernet Moravia Templář	7,30	±	1,11	9,42	±	0,54	33,36	±	4,63	32,48	±	6,60
Cabernet Sauvignon	5,11	±	0,39	9,69	±	1,19	33,51	±	2,54	45,24	±	12,00
Saperavi	18,04	±	1,84	11,47	±	1,00	77,44	±	5,84	60,30	±	11,44
Akhasheni	8,86	±	1,53	9,96	±	1,44	76,66	±	14,57	65,71	±	7,76
Teliani	17,37	±	1,42	10,68	±	0,96	50,03	±	11,11	58,22	±	7,05
Napareuli	16,82	±	1,46	11,18	±	0,87	52,08	±	20,73	58,45	±	1,68
Mukuzani	17,01	±	2,19	11,44	±	1,05	33,14	±	6,90	37,92	±	0,29
Saperavi organic	13,57	±	1,40	11,82	±	1,02	70,83	±	4,79	71,15	±	13,69

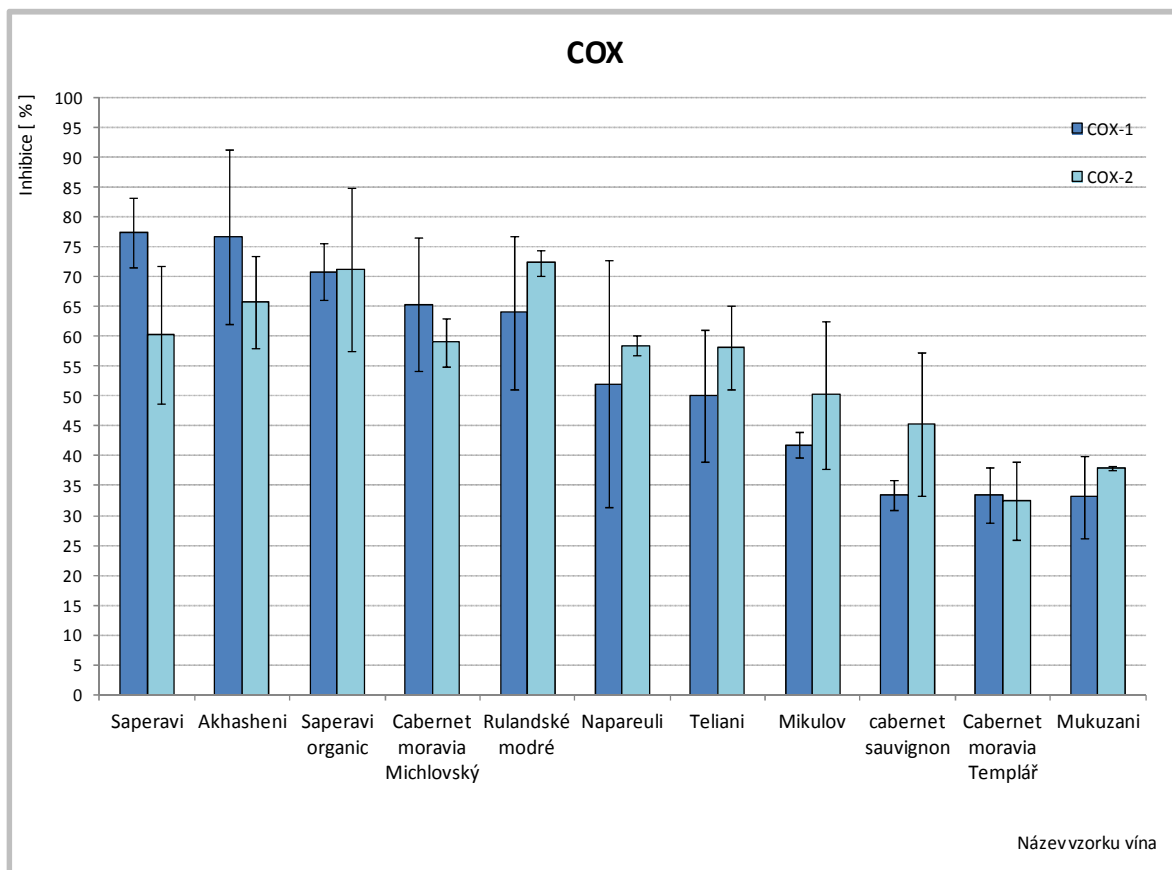
Tab. 6. Přehled naměřených hodnot dle testování DPPH, ORAC, COX-1, COX-2



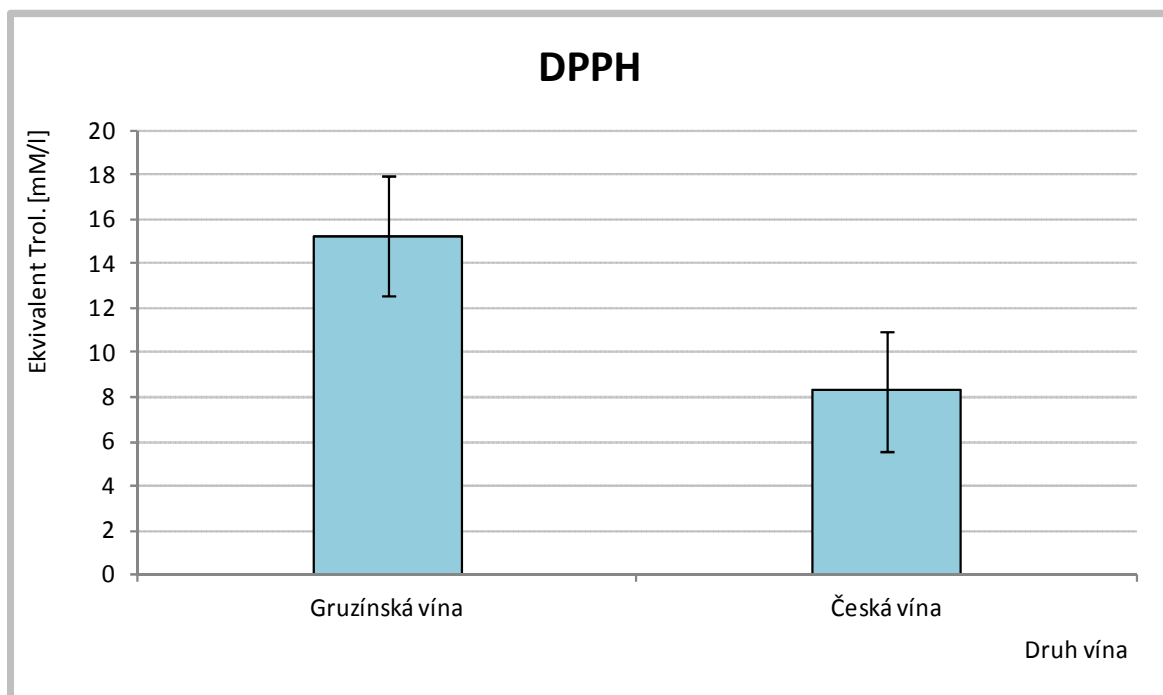
Graf 3. Přehled výsledků měření dle DPPH testu seřazených sestupně od nejvyšší antioxidační aktivity



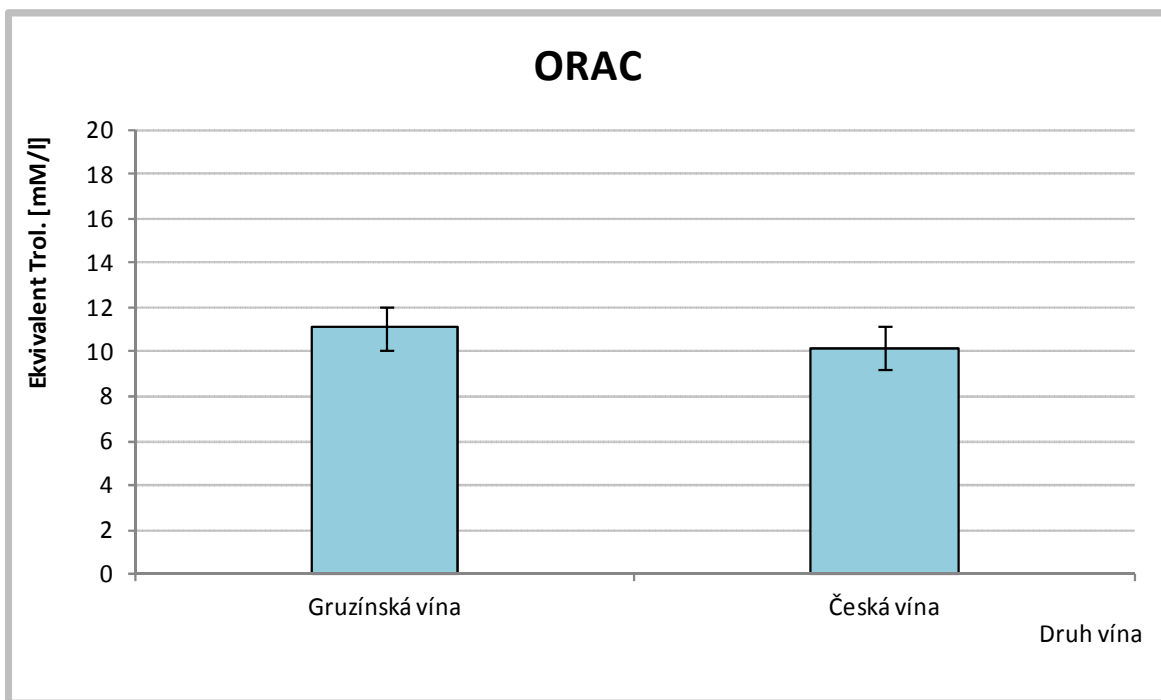
Graf 4. Přehled výsledků měření dle ORAC testu seřazených sestupně od nejvyšší antioxidační aktivity



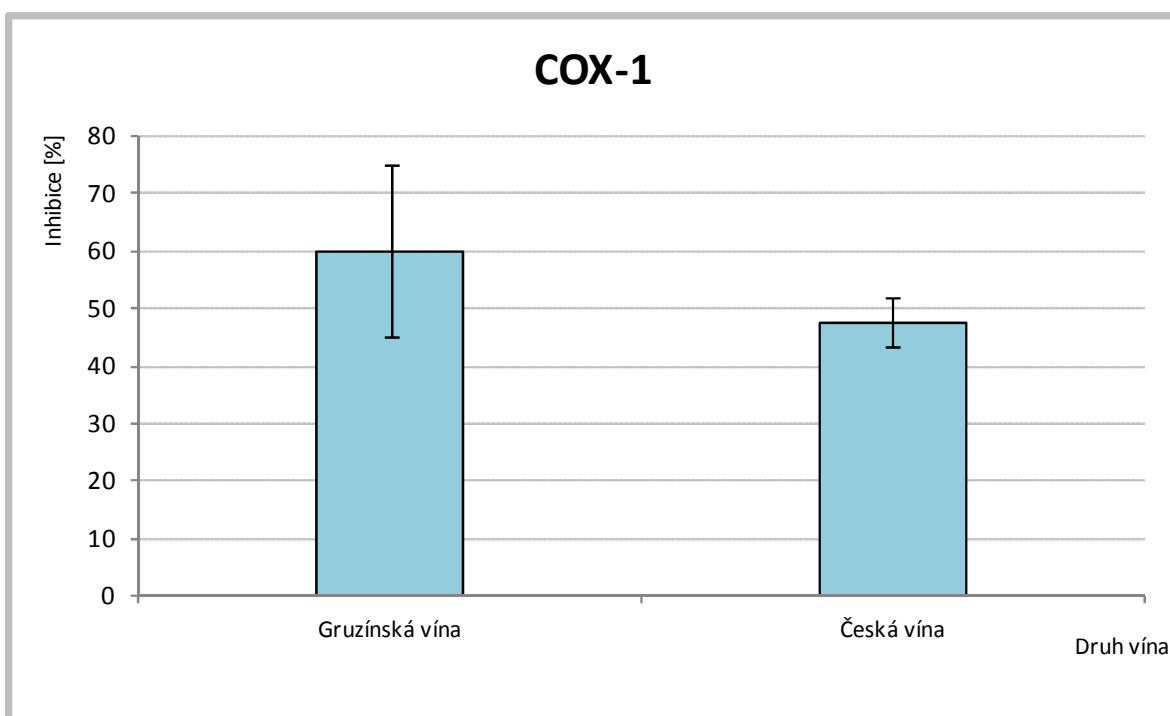
Graf 5. Přehled výsledků měření inhibiční aktivity na COX-1 a COX-2



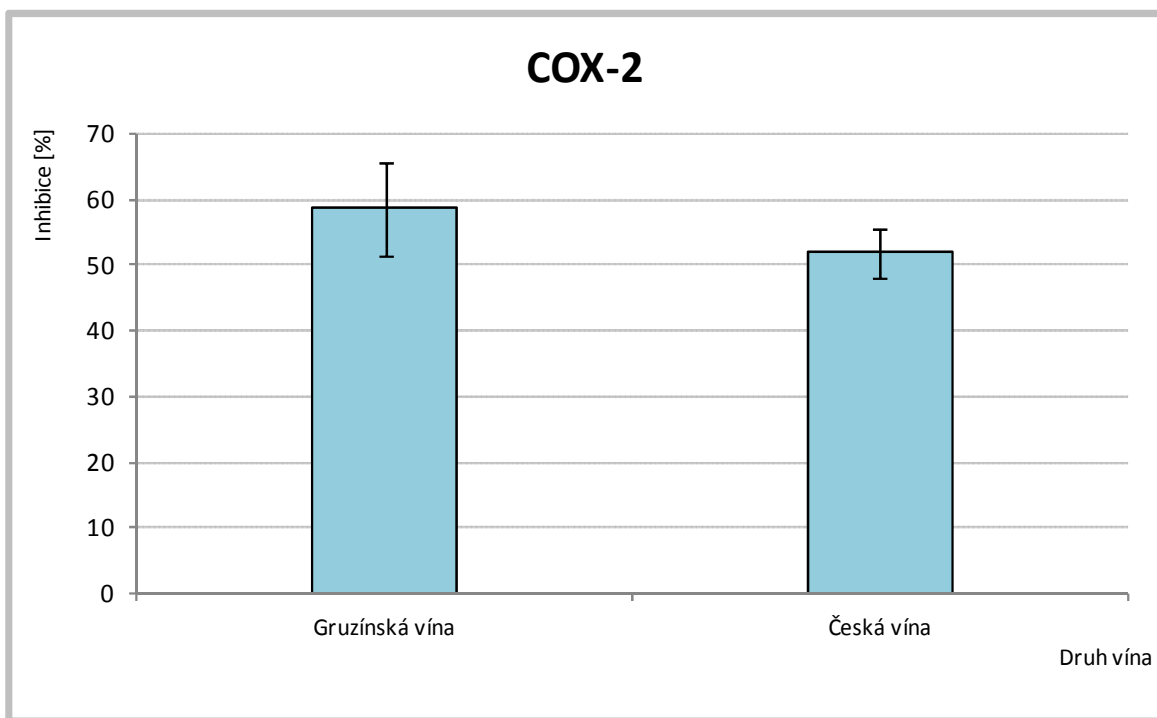
Graf 6. Srovnání antioxidační aktivity gruzínských a českých vín dle DPPH



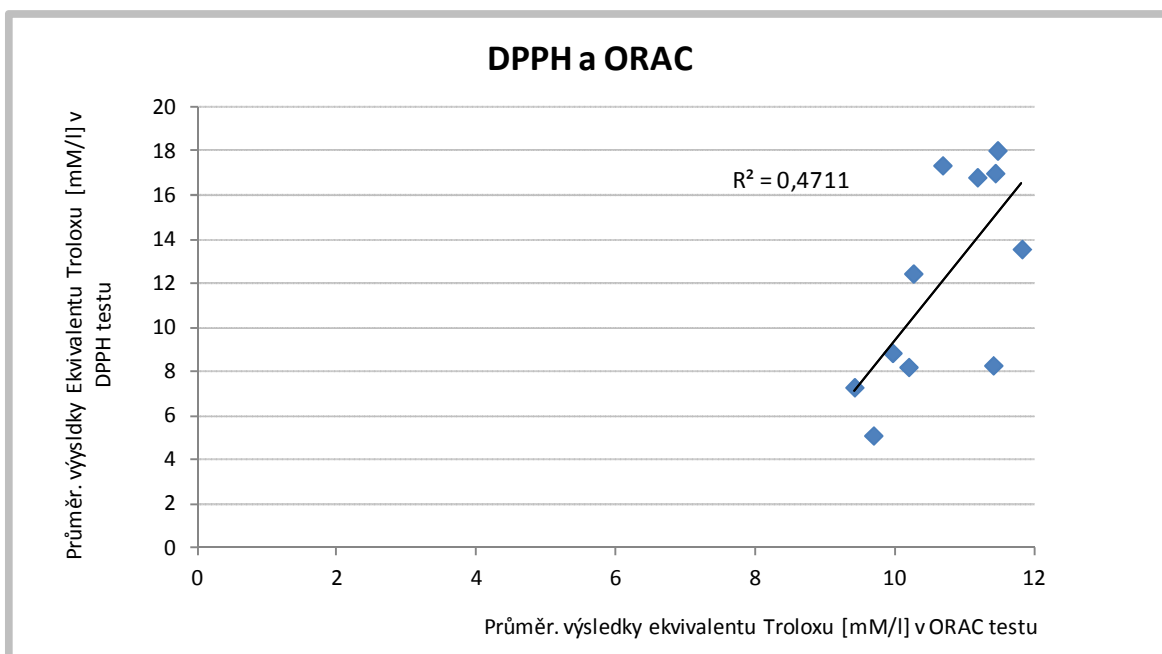
Graf 7. Srovnání antioxidační aktivity gruzínských a českých vín dle ORAC



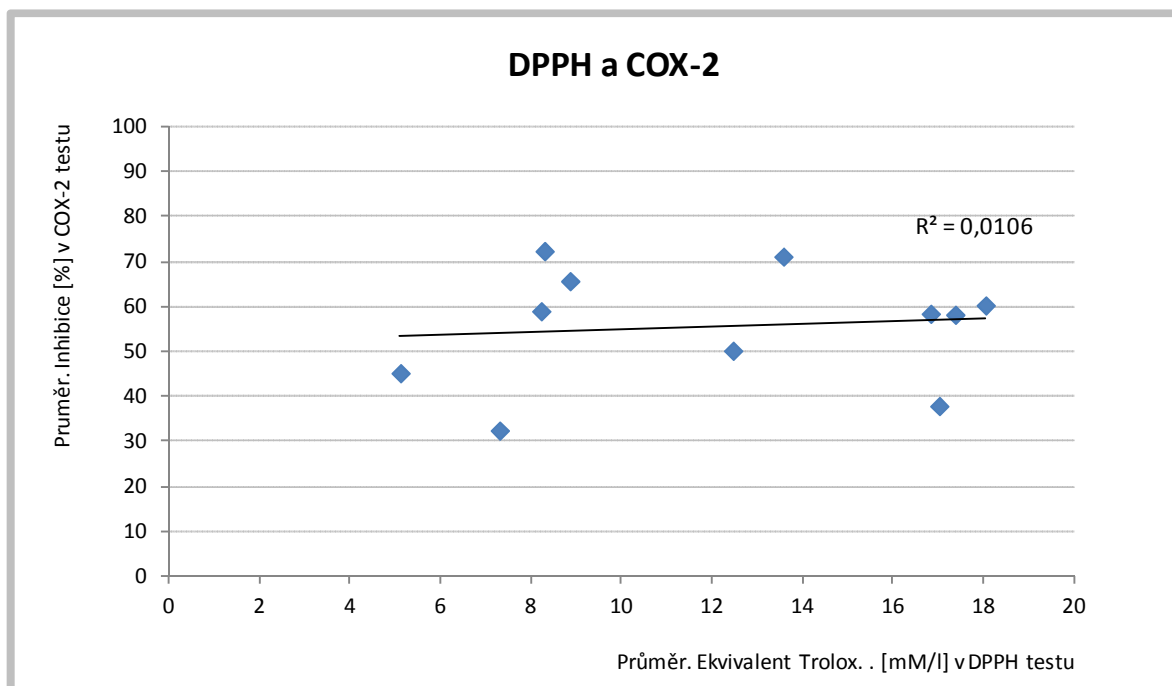
Graf 8. Srovnání inhibiční aktivity gruzínských vín a českých vín na COX-1.



Graf 9. Srovnání inhibiční aktivity gruzínských vín a českých vín na COX-2.



Graf 10. Stanovení koeficientu determinace pro metody DPPH a ORAC



Graf 11. Stanovení koeficientu determinace pro metody DPPH a COX-2

6 Diskuze

Výzkumy a studie zabývající se nejrůznějšími antioxidanty a jejich antioxidační aktivitou se staly v posledním desetiletí předmětem zájmu vědecké i laické společnosti. Výsledky se však velmi často různí, především v závislosti na druhu metody. Z důvodu přítomnosti širokého spektra nejrůznějších antioxidantů v rostlinných produktech je také obtížné komplexně zjistit možné synergické vztahy a efekty mezi jednotlivými antioxidanty nebo flavonoidními látkami. Společné působení je přitom často významný faktor, kdy účinnost slabého antioxidantu lze zvýšit pouhou přítomností jiné látky (Badarinath et al., 2010).

Antioxidační aktivita všech vzorků vína byla stanovena dvěma různými metodami, přičemž ORAC metoda nevykazovala významné rozdíly ve srovnání s DPPH testováním, o čemž ostatně svědčí i vysoký korelační koeficient. Každá z metod má své výhody a svá omezení. DPPH metoda, která hodnotí eliminaci syntetických radikálů (DPPH), (Paulová et al., 2003), patří mezi základní a je označována za jednodušší. Hlavní výhodou mimo rychlost provedení a ekonomickou nenáročnost je fakt, že nedochází k ovlivňování určitých vedlejších reakcí, které mohou za specifických podmínek vznikat. Jde především o možné interakce s chelací kovů (Ferreira et al., 2007). Nevýhodou může být zase skutečnost, že

některé antioxidanty mohou reagovat na radikál DPPH velmi pomalu a v některých případech dokonce vůbec, oproti rychlé reakci na radikály peroxylové povahy. Některé látky, například karotenoidy jsou metodou DPPH zase obtížně analyzovány, a to z důvodu nižšího absorpčního maxima, než při kterém je tento test standardně prováděn (Marcone, 2012). Metoda ORAC, která je založena na mechanismu přenosu vodíkového atom (HAT – hydrogen atom transfer) Antioxidanty, které jsou schopné uvolnit atomy vodíku peroxylovým radikálům, tak inhibují degradaci molekuly. Tento test je v literatuře označován za citlivější a relevantnější (Huang et al., 2005), a to také díky bližší simulaci při srovnání s *in vivo* testy (Prior et al., 2005). Rozsah ORAC metody zasahuje přes vědecké a potravinářské testování až po klinické využití (Marcone, 2012).

V rámci našeho testování antioxidační aktivity vybraných odrůd červeného vína vykazovala DPPH metoda v průměru statisticky velmi významné rozdíly mezi českými a gruzínskými vzorky ($p < 0,01$). Všech šest gruzínských zástupců se v celkovém hodnocení z 11 vzorků umístilo v prvních sedmi pozicích (Graf 3). Při testování pomocí kyslíkových radikálů (ORAC) nevykazovaly průměrné hodnoty ekvivalentu troloxu gruzínských vín statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$) a v individuálním hodnocení byly mimo první tři nejsilnější gruzínské zástupce výsledky často srovnatelné s českými vzorky (Graf 4). Gruzínské víno Saperavi (klasické i z bio hroznů) bylo vyhodnoceno oběma metodami jako vzorek s nejsilnější antioxidační aktivitou. Druhým neaktivnějším zástupcem, který byl stanoven DPPH metodou i ORAC testem, bylo víno Mukuzani. Mukuzani ovšem taktéž pochází z odrůdy Saperavi, stejně jako všechny vzorky testovaných gruzínských vín. Tato odrůda je obecně označována za jednu z nejvýznamnějších a nejkvalitnějších odrůd červeného vína pocházejícího z Gruzie (Vouillamoz et al., 2006). Přestože v době testování nebylo analyzováno současně i množství polyfenolů a identifikováno přesné složení jednotlivých vzorků, které by mohlo být nápomocné při hledání závěrů a souvislostí, o aktivitě významných gruzínských odrůd lze čerpat z vědecké literatury. O tom, že gruzínská vína díky tradiční Kachetinské výrobě obsahují vyšší množství polyfenolů a stilbenů a zároveň vykazují i silnější antioxidační aktivitu, bylo již publikováno několik studií. (Glonti, 2010, Shalashvili et al., 2011). Fermentace slupky, dužiny i semen vinné révy, která tvoří základ Kachetinské technologie dokázaly například zvýšit i přítomnost polyfenolů v bílém českém víně Malervina, pocházejícího ze Slovácké podoblasti od pěstitele Michlovského a.s. V bílém víně se přitom průměrně pohybuje obsah polyfenolů okolo 225 mg/l. (Mozetič et al., 2006). Ve srovnání s klasickou technologií zpracování naprosto stejné hybridní odrůdy šlo o zvýšení

obsahu polyfenolů 100 mg v jednom litru vína (Khafizova and Michlovský, 2009). Jakkoliv se může na první pohled zdát tento nárůst vysoký, v porovnání s průměrným množstvím polyfenolů (1000–4000 mg/l) vyskytujícím se v červeném víně, je zvýšení o 100 mg/l u bílého vína s kolísajícími hodnotami mezi 100–700 mg polyfenolů v 1 litru pořád zanedbatelná hodnota (Xanthopolou et al., 2010). Z tohoto vinařství pochází i námi jeden testovaný vzorek Cabernetu Moravia, který byl ovšem také zpracován klasickým výrobním postupem a oproti gruzínským vzorkům vykazuje u obou metod jen slabou antioxidační aktivitu. V experimentu Glonti, (2010) se vyhodnocoval vliv výrobního procesu na obsah polyfenolů také u několika odrůd červených gruzínských vín. U vína Kakhuri, zpracovaným Kachetínským postupem, bylo zjištěno navýšení dokonce o 3100 mg/l (na celkovou hodnotu 4200 mg/l) polyfenolů v porovnání s klasickým evropským postupem zpracování, který se v Gruzii byť zřídka, tak také objevuje. U červených vín by tedy technologie zpracování mohla nabývat mnohem vyššího významu, o čem ostatně svědčí i naše výsledky ve srovnání s českými víny. Otázkou však zůstává skutečnost, které další faktory a vlivy se mohou podílet na někdy významných rozdílech antioxidační aktivity mezi jednotlivými gruzínskými zástupci. Všechny vzorky pocházely z odrůdy Saperavi a dokonce i ze stejné pěstitelské oblasti Kakheti. Čtyři z nich také od stejného pěstitele, tudíž se nepředpokládají odlišné postupy zpracování, které se i v rámci Gruzie a jednotlivých vinařských oblastí mohou někdy mírně lišit. Přesto je například v ORAC testu mezi nejsilnějším vzorkem u Saperavi organic ($11,82 \pm 1,02$ mM TE/l) a neslabším Akhasheni ($9,96 \pm 1,44$ mM TE/l) určitý rozdíl, v rámci metody DPPH se jedná dokonce o rozdíl $7,71 \pm 2,35$ mM TE/l. Víno Akhasheni navíc patří mezi druhý nejstarší ročník ze všech jedenácti vzorků (rok 2004) a podle (Del Álamo et al. (2008) a Schwarz et al. (2012), kteří hovoří o závislosti mezi stoupající tendencí akumulace polyfenolů s časovým obdobím, by mohlo být potenciálně mnohem aktivnější než Saperavi organic z roku 2007. Dle literatury (Akçay et al., 2004, Mulero et al., 2011) nevznikají téměř žádné rozdíly v obsahu polyfenolů ve finálním složení vína mezi bio vinnou révou a běžnou révou. Studie Bunea et al., (2012) na druhou stranu vyšší antioxidační aktivitu u organické vinné révy stejně jako v našem případě dokázala. Určitým vysvětlením by mohla být například vyšší akumulace resveratrolu u organické vinné révy, která je pouze minimálně chemicky ošetřovaná a musí se tedy výrazněji sama bránit proti stresu a napadením plísní právě produkcí tohoto fytoalexinu. Pokud jsou však brány v potaz spíše výsledky měření v rámci ORAC testu, jakožto citlivější metody, nejsou rozdíly mezi jednotlivými gruzínskými vzorky z hlediska antioxidační aktivity natolik markantní, aby se předpokládalo značně odlišné složení jednotlivých vzorků z hlediska obsahu polyfenolů. Nejnižší antioxidační

aktivitu v rámci obou metod vykazovala česká vína Cabernet Moravia ($7,3 \pm 1,11$ mM/l) a Cabernet Sauvignon ($5,11 \pm 0,39$ mM/l). Při DPPH testu byly naše výsledky srovnatelné se studií Stratil et al. (2008), kteří vyhodnotili u Cabernetu Moravia hodnotu $6,21 \pm 0,01$ mM ET/l a $5,88 \pm 0,1$ mM ET/l u Cabernetu Sauvignon. V tomto experimentu však autoři neuvedli přesný název vína a pěstitele, od kterého daný vzorek pochází, tudíž jsou hodnoty uváděny pouze orientačně. Druhý vzorek od stejné odrůdy Cabernetu Sauvignon, avšak jiného výrobce, vykazoval v naší studii u DPPH metody mnohem silnější antioxidační aktivitu ($12,46 \pm 0,33$ mM ET/l), tudíž by se dalo soudit, že pěstitelské metody a postupy mohou ovlivňovat kvalitu vín také v rámci ČR.

Pro zjištění protizánětlivé aktivity bylo všech 11 vzorků testováno metodou inhibice cyklooxygenázy. V rámci inhibiční aktivity na COX-1 a COX-2 vykazovala gruzínská vína v průměru vyšší inhibiční potenciál ve srovnání s víny z ČR. Při testování inhibiční aktivity na COX-1, ke které se váže zejména kardioprotektivní ochrana (Perrone et al., 2010) a s tím související podstata Francouzského paradoxu byla zjištěna nejsilnější inhibiční aktivita u vína Saperavi. Některé studie hovoří (Szewczuk and Penning, 2004b) o resveratrolu jako látce, která přednostně inhibuje COX-1. Průměrné množství tohoto stilbenu bylo v gruzínském Saperavi ve studii Shalashvili et al. (2012) stanoveno na 1,47 mg/l. Pro porovnání, průměrné množství resveratrolu ve studii Kumšta et al., (2012), kteří testovali 43 vzorků červených českých vín, se pohybovalo mezi 0,02–0,82 mg/l. Hodnota, která byla naměřena u Saperavi by však v našem měření pravděpodobně stejně nebyla sama o sobě schopná vykázat (při ředění vín 400 krát) tak silnou inhibiční aktivitu. Saperavi ale navíc obsahuje velmi vysoké množství epikatechinu (29,5 mg/l) a katechinu (115,4 mg/l). Katechin se pravděpodobně také projevuje o trochu silněji na inhibici COX-1, což by mohlo být jedním z potenciálních vysvětlení (McFadden et al., 2006). Zajímavým zjištěním se současně stalo i víno Akhasheni, které i přes nejnižší antioxidační potenciál z gruzínských vzorků, vykazovalo vysokou inhibiční aktivitu na COX-1 (zároveň také i na COX-2). U tohoto odrůdového červeného vína byl ve studii Bezhuashvili et al., (2011) zjištěn ve slupce vinné révy nejvyšší obsah resveratrolu z pěti zástupců odrůdy Saperavi (6,67 mg/100g). V tomto případě by tedy víno Akhasheni mohlo právě dokazovat skutečnost, dle které některá literatura (Sun et al., 2010) usuzuje, že ne vždy koresponduje vysoký obsah biologicky aktivních látek se stejně úměrnou antioxidační aktivitou.

K zajímavým poznatkům přispěla v naší studii česká vína, která všechna inhibovala silněji COX-2. Nicméně je velmi obtížné odhadnout na základě jakého faktoru nebo přítomné látky reagovala česká vína právě takto, pokud není k dispozici přehled složení alespoň nejvýznamnějších flavonoidů. U Rulandského modrého, pocházejícího z vinařské Velkopavlovické oblasti od Vinium a. s., byl dokonce naměřen nejvyšší protizánětlivý potenciál ze všech českých i gruzínských vzorků ($72,38 \pm 2,15$ %). Z hlediska antioxidační aktivity dle ORAC testu bylo také nejsilnější z českých zástupců, v celkovém hodnocení mu náleželo čtvrté pořadí. Přestože nebyla dohledána podobná studie, která by umožnila kritické porovnání významné protizánětlivé aktivity Rulandského modrého s výsledky této práce, zvýšená inhibiční aktivita na COX-2 byla publikována v rámci této odrůdy u zahraničních producentů. Paul et al., (2009) například v Pinot Noir zjistili přítomnost pterostilbenu, strukturního analogu resveratrolu, avšak s lepší vstřebatelností *in vivo* a výraznou inhibiční aktivitou na COX-2. (Auger et al., 2005) zase zjistili inhibici aterosklerózy v počáteční fázi (až 80 %) u laboratorních křečků, krměných extrakty z révy Pinot Noir, která taktéž souvisí se zvýšenou přítomností COX-2 (Cipollone and Fazia, 2006) Obecně by se z naší studie dalo usuzovat, že gruzínská vína, která vykazují silnější inhibiční potenciál na COX-1, by se mohla výrazněji podílet při prevenci kardiovaskulárních onemocnění než u zánětlivých procesů, které souvisí hlavně s inhibicí COX-2. Opačným trend byl zjištěn u českých vzorků, která vykazovala výraznější inhibiční aktivitu na COX-2. V konečném vyhodnocení jsou však gruzínská vína v porovnání s českými na inhibici obou forem cyklooxygenázy stále aktivnější, přestože rozdíly mezi nimi nejsou statisticky významné ($p > 0,05$). Předpokládá se tedy, že tradiční gruzínská výroba vína hraje klíčovou roli na vznik a složení polyfenolických látek, které se svými pozitivními účinky uplatňují zejména při prevenci srdečních onemocnění. Stále je však nutné brát na vědomí, že veškeré výsledky byly vyhodnoceny z *in vitro* testů a nemusí nutně vykazovat stejnou aktivitu v lidském těle, a to především z důvodu jejich biologické dostupnosti k cílovým tkáním a orgánům.

7 Závěr

Tato studie pomohla dle stanovení antioxidační a protizánětlivé aktivity porovnat diverzitu jednotlivých vzorků vybraných červených vín a zároveň stanovit, která z nich se vyznačují nejvyššími pozitivními účinky ve vztahu ke zdraví. Gruzínská červená vína se v naší studii vyznačovala především vysokou inhibiční aktivitou na COX-1. Tímto navázala na výsledky experimentů mnoha výzkumů, které označují červené víno za hlavní podstatu

Francouzského paradoxu. Česká červená vína nevykazovala pravděpodobně z důvodu nižšího obsahu biologicky aktivních látek, především polyfenolů, tak významnou antioxidační a protizánětlivou aktivitu. S obsahem flavonoidních složek souvisí tedy mimo odrůdu a klimatické faktory také výrobní technologie, kterou lze v našem případě označit za klíčový faktor.

8 Seznam grafů

Graf 1. Příklad stanovení EC_{50} dle DPPH testu pro vzorek vína Saperavi.....	40
Graf 2. Stanovení ORAC testu pro vzorek vína Cabernet Sauvignon.....	41
Graf 3. Přehled výsledků měření dle DPPH testu seřazených sestupně od nejvyšší antioxidační aktivity	47
Graf 4. Přehled výsledků měření dle ORAC testu seřazených sestupně od nejvyšší antioxidační aktivity	47
Graf 5. Přehled výsledků měření inhibiční aktivity na COX-1 a COX-2.....	48
Graf 6. Srovnání antioxidační aktivity gruzínských a českých vín dle DPPH	48
Graf 7. Srovnání antioxidační aktivity gruzínských a českých vín dle ORAC	49
Graf 8. Srovnání inhibiční aktivity gruzínských vín a českých vín na COX-1.	49
Graf 9. Srovnání inhibiční aktivity gruzínských vín a českých vín na COX-2.	50
Graf 10. Stanovení koeficientu determinace pro metody DPPH a ORAC	50
Graf 11. Stanovení koeficientu determinace pro metody DPPH a COX-2	51

9 Seznam tabulek

Tab. 1. Procentuální zastoupení jednotlivých složek v červeném a bílém víně	16
Tab. 2. Základní rozdělení jednotlivých sloučenin a jejich hlavní zástupci	20
Tab. 3 Průměrné zastoupení nejvýznamnějších polyfenolů v červeném a bílém víně ...	21
Tab. 4. Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku	25
Tab. 5. Přehled testovaných vín a jejich stručný popis.....	37
Tab. 5. Přehled testovaných vín a jejich stručný popis – pokračování.....	38
Tab. 6. Přehled naměřených hodnot dle testování DPPH, ORAC, COX-1, COX-2	46

10 Seznam obrázků

Obr. 1. Noe pijící víno ve své vinici	10
Obr. 2. Mapa rozšíření vinné révy	12
Obr. 3. Gruzínské vinařské oblasti.....	13
Obr. 4. Kvevri	14
Obr. 5. Izomery resveratrolu.....	24
Obr. 6. Významné OH skupiny u kvercetinu z hlediska antioxidační aktivity	26
Obr. 7. Schéma přeměny kyseliny arachidonové	31
Obr. 8. Strukturní vzorec kyseliny arachidonové	32
Obr. 9. Strukturní vzorec prostaglandinu a tromboxanu	33
Obr. 10. Schéma přeměny DPPH na DPPH:H	39

11 Seznam zkratek

AA – kyselina arachidonová

COX-1 – cyklooxygenáza 1

COX-2 – cyklooxygenáza 2

DN – diabetická neuropatie

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DPPH-H – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin

EC₅₀ – koncentrace vzorků, při kterých je redukován z 50 % radikál

ET – ekvivalent troloxu

HDL – lipoproteiny s vysokou hustotou

LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou

NO – oxid dusnatý

NSAIDs – nesteroidní protizánětlivá léčiva

ORAC – oxygen radical absorabance capacity

PGs – prostaglandiny

PMNs – polymorfonukleární leukocyty

R – koeficient korelace

R² – koeficient determinace

RNS – reaktivní formy dusíku

ROS – reaktivní formy kyslíku

SD – směrodatná odchylka

TNF – faktor nádorové nekrózy

12 Seznam literatury

- Adams C. (2010)** Diets high in arachidonic acid lead to increased inflammation. Dostupné z: <http://voices.yahoo.com/diets-high-arachidonic-acid-lead-increased-inflammation-5627168.html?cat=51>. cit. 20. 1. 2013
- Akçay Y. D., Yildrin H. K., Güvenç U., Sözmen E. Y. (2004)** The effects of consumption of organic and nonorganic red wine on low-density lipoprotein oxidation and antioxidant capacity in humans. *Nutrition research* 7: 541–554.
- Alcaron L., Villegas I. (2005)** Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Molecular nutrition and food research* 49: 405–430.
- Altman R., Luciardi H. L., Muntaner J., Herrera R. N. (2004)** The antithrombotic profile of aspirin. Aspirin resistance, or simply failure? *Thrombosis journal* 2:1.
- Anand P. Sundaram Ch., Jhurani S, Kunnumakkara A. B., Aggarwal B. B. (2008)** Curcumin and cancer: An “old-age” disease ith an “age-old” solution. *Cancer letters* 67: 3–16.
- Anand P., Kunnumakkara A. B., Newman R. A., Aggarwal B. B. (2007)** Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharmaceutics* 4 (6): 807–818.
- Ansley D. M., Wang B. (2013)** Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *Journal of pathology* 229 (2): 232–241.
- Aoshiha K., Nagai A. (2003)** Oxidative stress, cell death, and other damage to alveolar epithelial cells induced by cigarette smoke. *Tobacco induced diseases* 1 (1): 21.
- Arora R. B. (1971)** Anti-inflammatory studies on *Curcuma longa* (Turmeric). *Indian journal of medical research* 59: 1289–1295.
- Auger C., Rouanet J. M., Vanderlinde, R., Bornet A., Decorde, K., Lequeux N., Cristol J. P., Teissedre P. L. (2005)** Polyphenols-enriched Chardonnay white wine and sparkling Pinot Noir red wine identically prevent early atherosclerosis in hamsters. *Journal of agricultural and food chemistry* 53 (25): 9823–9829.
- Avila M. A., Velasco J. A., Harter K. W. (1996)** Quercerin as a modulátor of the cellular neoplastic phenotype. *Advances in experimental medicine and biology* 401: 101–110.

- Badarinath A. V., Rao K. M., Chetty C. M. S., Ramkanth S., Rajan T. V. S., Gnanaprakash K. (2010)** A review on In-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International journal of pharmtech research* 2 (2): 1276–1285.
- Baghel S. S., Shrivastava N., Baghel R. S., Preeti A., Sarlesh R. (2012)** Review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 1(1): 146–160.
- Barata A., Pagliara D., Piccininno T., Tarantino F., Ciardulli W., Malfeito M. F., Loureiro V. (2008)** The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS Yeast Research* 8 (7): 1097–1102.
- Barishashvili G. (2011)** Making wine in kvevri – a unique Georgian tradition. Dostupné z: http://www.gwa.ge/upload/file/qvevri_eng_Q.pdf citováno: 22. 1. 2013
- Barnard H., Dooley A. N., Areshian G., Gasparyan B., Faull K. F. (2010)** Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the late Chalcolithic Near Eastern highlands. *Journal of archaeological science* 38: 977–984.
- Basavaraju S. R., College B., North G. (2009)** Cardiovascular disease: A brief review. Dostupné z: <http://www.muscadinenaturals.com/sellsheets/Heartpaper09.pdf>. cit. 2. 2. 2013
- Belguendouz L., Fremont L., Linard A. (1997)** Resveratrol inhibits metal independent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. *Biochemical pharmacology* 53: 1347–1355.
- Berliner J. A., Heinecke J. W. (1996)** The role of oxidised lipoproteins in atherosclerosis. *Free radical biology and medicine* 20: 707–727.
- Berthels N. J., Otero R. R. C., Bauer F. F., Thevelin J. M., Pretorius I. S. (2006)** Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast research* 4 (7): 683–689.
- Berthels N. J., Otero R. R. C., Bauer F. F., Pretorius I. S., Thevelein J. M. (2008)** Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Applied microbiology and biotechnology* 77 (5): 1083–1091.
- Bible** (Genesis, kapitola 9: 20 -21) dostupné z: <http://www.bible21.cz/online> cit. 31. 1. 2013

- Bonilla P. E., Akoh C. C., Sellappan S., Krewer G. (2003)** Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine kapes. *Journal of agricultural and food chemistry* 51: 5497–4503.
- Brown L., Kroon P. A., Das D., K., Das S., Tosaki A., Chan V., singer M. V., Peick P. (2009)** The Biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcoholism. Clinical and experimental research* 33 (9): 1513–1523.
- Brownlee M. (2001)** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414 (6865): 813–820.
- Bunea C. I., Pop N., Babeş A. C., Matea C., Francisc V Dulf F., Bunea A. (2012)** Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry central journal* 6: 666.
- Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. (2004)** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life science* 74 (17): 2157–84.
- Cavallaro A., Ainis T., Bottari C., Fimiani V. (2003)** Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. *Physiological research* 52: 555–562.
- Cederbaum A. (2001)** Oxidative stress and cell Injury. *Free radical biology and medicine* 31: 1524–1526.
- Cipollone F., Fazia M. L. (2006)** COX-2 and atherosclerosis. *Journal of cardiovascular pharmacology* 47 (1): 26–36.
- Cláira J. (2003)** Cyclooxygenase-2 Biology. *Current Pharmaceutical design* 9: 2177–2190.
- Cook N. C., Samman S. (1996)** Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of nutritional biochemistry* 7 (2): 66–76.
- Creasy L. L, Creasy M. T. (1998)** Grape chemistry and the significance of resveratrol: An overview. *Pharmaceutical biology* 36 (1): 8–13.
- Cronstein B. N., Weissmann G. (1993)** The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis & Rheumatism* 36: 147–157.
- D'Archivio M., Filesi C., Benedetto R., Gargiulo R, Giovannini C., Masella R. (2007)** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 43 (4): 348–361.

- Dani C., Oliboni L. S., Vanderlinde R., Pra D., Dias J. F., Yoneama M. L., Bonatto D., Salvador M., Henriques J. A. P. (2009)** Antioxidant activity and phenolic and mineral content of rose grape juice. *Journal of medicinal food* 12: 188–192.
- Del Álamo M., Nevares L., Martín C., Merino S. (2008)** Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chimica Acta* 621: 86–99.
- Delaney B., Phillips K., Vasquez C., Wilson A., Cox D., Wang H. B., Manthey J. (2002)** Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones. *Food and chemical toxicology* 40 (5): 617–24.
- Dubois N. R., Abramson S. B., Crofford L., Gupta R. A., Simon L. S., Van de Putte L. B. A., Lipsky P. (1998)** *The FASEB journal* 12: 1063–1073.
- Dudley, J. I., Lekli, I. Mukherjee S., Das M., Bertelli, A. A. A., Das D. K., (2008)** Does white wine qualify for french paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: Resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Journal of agricultural and food chemistry* 56 (20): 9362–9373.
- Eberhard M. V., Lee C. Y. Liu R. H. (2000)** Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405: 903–904.
- Ekhvaia J., Akhalkatsi M. (2010)** Morphological variation and relationships of Georgian populations of *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (C. C. Gmel.) Hegi. *Flora - morphology, distribution, functional ecology of plants* 205 (9): 608–617.
- Fahey J. W., Kensler T. W. (2007)** Role of dietary supplements/nutraceuticals in chemoprevention through induction of cytoprotective enzymes. *Chemical research of toxicology* 20 (4): 572–576.
- Farkas O., Jakus J., Héberger K. (2004)** Quantitative structure – antioxidant activity relationship of flavonoid compounds. *Molecules* 9: 1079–1088.
- Ferenčík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Mat'ba J. (2005)** Imunitní systém – informace pro každého. Přeložila Kristýna Pokorná. 1. vydání. Praha: Grada, 2005. 236 str. ISBN 80-247-1196-6.
- Ferguson L. R. (2001)** Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation research fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* 2: 89–111.

- Ferreira I. C. F. R., Baptista P., Vilas M. B., Barros L. (2007)** Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry* 100: 1511–1516.
- Ferry D. R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D. W., de Takats P. G., Anderson D., Baker J. Kerr D. J. (1996)** Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clinical cancer research* 2 (4): 659–68.
- Fontecave M., Lepoivre M., Elleingand E. (1998)** Resveratrol, a remarkable inhibitor ribonucleotide reductase. *FEBS letters* 421 (3): 277–279.
- Formica J. V., Regelson W. (1995)** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology* 33 (12): 1061–1080.
- Frankel E. N., Bosanek Ch. A., Meyer A. S., Siliman K., Kirk L. L. (1998)** Commercial grape juices inhibit the *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of agricultural and food chemistry* 46: 834–838.
- Fuhrman B., Lavy A., Aviram M. (2005)** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation. *British journal of nutrition* 93 (2): 233–240.
- Funk C. D., Kennedy L. B., Pong A. S., Fitzgerald G. A. (1991)** Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: DNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB* 5: 2304–2312.
- Gaziano Y. M., Buring J. E., Breslow J. L. (1993)** Moderate alcohol intake increased level of high density lipoprotein and its subfractions and decreased risk of myocardial infarction. *Biochemical journal* 294: 829–834.
- Ghasemzadeh A., Jafaar H. Z. E., Rahmat A. (2010)** Antioxidant activities, total phenolic and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger. *Molecules* 15: 4324–4333.
- Ghosh D. Konishi T. (2007)** Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye fiction. *Asia pacific clinical nutrition* 16 (2):200–208.
- Glonti T. (2010)** Phenolic sources of wine made from grapes of “Kakhuri Mtsvivani” and some other vine (V. vinifera L.) breeds. Dostupné z:http://www.oiv2010.ge/POSTER/POST_OENOLOGY/P.II.18No%2085%20P%20Glonti%20Teimu

raz%20Phenolicsources%20corr%20Volatile%20aroma-forming%20compounds.pdf citováno 1. 4. 2013

Gnekow B., Ough C. S. (1976) Methanol in wines and musts: Source and amounts. *American journal of enology and viticulture* 27: 1–6.

Greenberg E. R., Baron J. A., Freeman D. H. (1993) Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users (1993). *Journal of the national cancer institute* 85 (11): 912–916.

Haberland M. E., Fogelman A. M. (1987) The role of altered lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *American heart journal* 113: 573–577.

Halliwell B. (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of biochemistry and biophysics* 476: 110–112.

Hao Ch. M., Breyer M. D. (2007) Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annual review of physiology* 70: 357–377.

Hatzakis E., Archavlis E. (2007) Determination of glycerol in wine using P-NMR spectroscopy. *Journal of American oil chemists 'society* 84: 615–619.

He S., Sun C., Pan Y. (2008) Red wine polyphenols for cancer prevention. *International Journal of Molecular sciences* 9: 842–853.

Hecht S. S. (2007) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the national cancer institute* 91 (14): 1194–1210.

Huang D., Ou B., Prior R. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of agriculture and food chemistry* 53: 1841–1856.

Hughes F. M., Tjandrawinata R., Sayyah L. C. (2005) Arachidonic acid, an omega-6 fatty acid, induces cytoplasmic phospholipase A2 in prostate carcinoma cell. *Carcinogenesis* 26 (9): 1520–1526.

Chacona M. R., Ceperuelo-Mallafrea V., Maymo-Masipa E., Mateo Sanzb J. M., Arolac L., Guitierrez M. R., Fernandez-Relald J. M., Ardevolc A. Simona I., Venderell J. (2009) Grape seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes *in vitro*. *Cytokine* 47: 137–142.

Chang Ch. Ch., Chang Ch. Y., Wu Y. T., Huang J. P., Yen T. H., Hung L. M. (2001) Resveratrol retards progression of diabetic neuropathy through modulation of oxidative stress, proinflammatory cytokines-activated protein kinase. *Journal of biomedical science* 18: 47–57.

Chang W. S., Lee Y. J., Lu F. J., Chiang H. C. (1993) Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer research* 113 (6A): 2165–2170.

Chen Y. J., Wang J. S., Chow S. E. (2007) Resveratrol protects vascular endothelial cell from ox-LDL-induced reduction in antithrombotic activity. *The Chinese journal of physiology* 50 (1): 22–8.

Chow C. K. (1991) Vitamine-E and oxidative stress. *Free radical biology and medicine* 11 (2): 215–232.

Jackson R., Scragg R., Beaglehole R. (1991) Alcohol consumption and risk of coronary heart disease. *British medical journal* 303: 211–216.

Jackson R. S. (2008) Wine Science. Principles and applications. Third edition. Academic Press. 776 pages. ISBN 0123736463.

Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W., Fong H. H., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D. Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275 (5297): 218–20.

Jannin B., Menzel M., Berlot J. P., Delmas D. (2004) Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochemical pharmacology* 68: 1113–1118.

Kahl R., Kappus H. (1993) Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in the comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Lebensm unters forsch* 196: 329–338.

Khafizova A., Michlovský M. (2009) The influence of grape processing and winemaking techniques on phenolic compounds in wine produced from Malervina winegrape variety, south Moravia, Czech Republic. Dostupné z: http://mnet.mendelu.cz/mendelnet09agro/files/mendelnetagro_09_full_text.pdf

Killian P. H., Kronski E., Katharina Michalik K., Ottavia Barbieri O., Astigiano S., Sommerhoff Ch. P., Pfeffer U., Nerlich A. G., Bachmeier B. E. (2012) Curcumin inhibits prostate

cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Carcinogenesis* 5: 201.

Klatsky A. L. (2007) Alcohol, wine and vascular diseases: an abundance of paradoxes. *The American journal of physiology - Heart and circulatory* 294 (2): 582–583.

Klučková D. (2010) *In-vitro* inhibiční aktivita vietnamských léčivých rostlin na xantin oxidázu. Praha 2010. Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky.

Kumšta M., Pavloušek P., Kupsa J. (2012) Influence of terroir on the concentration of selected stilbenes in wines of the cv. Riesling in the Czech Republic. *Horticultural science* 39 (1): 38–46.

Lamson D. W., Brignall M. S. (2000) Antioxidants and cancer: quercetin. *Alternative medicine review* 5 (3): 196–208.

Lamuela-Raventos R. M., Torre-Boronat M. C. (1999) Beneficial effects of white wines. *Drugs under experimental and clinical research* 25 (2-3): 121–124.

Lanas A. (2001) Cyclo-oxygenase-1/cyclo-oxygenase-2 non selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: epidemiology of gastrointestinal events. *Digestive and liver disease* 33 (2): 29–34.

Lee C. K. (1987) Chemistry and biochemistry of the sweetness of sugar. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* 45: 195–351.

Lee, S. J., Kim, M. M. (2011) Resveratrol with antioxidant activity inhibits matrix metalloproteinase via modulation of SIRT1 in human fibrosarcoma cells. *Life sciences* 88 (11–12): 465–472.

Leiro J., Alvarez E., Garcia D., Orallo F. (2002) Resveratrol modulates rat macrophage functions. *International immunopharmacology* 2: 767–774.

Lu H., Ouyang W., Huang Ch. (2006) Inflammation, a key event in cancer development. *Molecular cancer research* 4: 221–223.

Lucena A. P. S., Nascimento R. J. B., Maciel J. A. C., Tavares J. X., Barbosa-Filho J. M., Oliviera E. J. (2010) Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. *Journal of food composition and analysis* 23 (1): 30–36.

Manika D., Dipak D. (2010) Resveratrol and cardiovascular health. *Molecular aspects of medicine* 31 (6): 503–512.

Mar Q., Marta M., Amaya A. (2013) Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological research* 68 (1): 125–131.

Marcone, M. (2012) Analytical Techniques in Food Biochemistry, in Food Biochemistry and Food Processing, Second Edition (ed B. K. Simpson), Wiley-Blackwell, Oxford, UK. doi: 10.1002/9781118308035.ch2

Markus M. A, Morris B. J. (2008) Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clinical interventions in aging* 3 (2): 331–9.

Marnett L. J. (2009) Mechanisms of Cyclooxygenase-2 Inhibition and Cardiovascular Side Effects–The Plot Thickens. *Cancer prevention research* 2: 288.

Marques F. Z., Markus A., Morris B. J. (2009) Resveratrol: Cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 (11): 2125–2128.

Mateus N., Proenca S., Ribeiro P., Machado J. M., De Freitas V. (2001) Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinifera* varieties concerning vineyard attitude. *Ciencia e tecnologia de alimentos* 3 (2): 102–110.

Mazière C., Conte M. A., Mazière J. C. (2001) Activation of JAK2 by the oxidative stress generated with oxidized low-density lipoprotein. *Free radical biology & medicine* 31: 1334–1340.

McGovern P., Glusker D., Exner L. (1996) Neolithic resinated wine. *Nature* 381: 480–481.

Meng X., Maliakal P., Lu H., Lee M. J. (2004) Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in human mice and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *Journal of agriculture and food chemistry* 52: 935–942.

Messina M. J. (1991) Oxidative stress status and cancer – methodology applicable for human studies. *Free radical biology & medicine* 10 (4): 175–176.

Meyer A. S., Heinonen M., Frankel E. N. (1998) Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry* 61 (1–2): 71–75.

Monagas M., Hernandez B., Gomez C., Bartolomé B. (2006) Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 319–327.

- Mozetič B., Tomažič I., Škvarč A., Trebše P. (2006)** Determination of Polyphenols in White Grape Berries cv. Rebula. *Acta chimica Slovenica* 53: 58–64.
- Mulero J., Zafrilla P., Cayuela J. M., Martínez-Cachá A, Pardo F. (2011)** Antioxidant activity and phenolic compounds in organic red wine using different winemaking techniques. *Journal of food science* 76(3): 436–40.
- Myles S., Boyko A. R., Owens Ch. L., Brown P. J., Grassi F., Aradhya M. K., Prins B., R., Chia J. M., Ware D., Bustamante C. D., Buckler E. S. (2011)** Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 108: 3530–3535.
- Nakamura T., Fujiwara N., Sugaya T., Ueda Y., Koide H. (2009)** Effect of red wine on urinary protein, 8-hydroxydeoxyguanosine, and liver-type fatty acid-binding protein excretion in patients with diabetic nephropathy. *Metabolism clinical and experimental volume* 58 (8): 1185–1190.
- Nathan C. (2002)** Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846–852.
- Nikfardjam M. D. P., Mark L., Avar P., Figler M., Ohmacht R. (2006)** Polyphenols, anthocyanins, and *trans*-resveratrol in red wines from Hungarian Villány region. *Food chemistry* 98: 453–462.
- Nunez-Selles A. J. (2005)** Antioxidant therapy: Myth or reality? *Journal of the brazilian chemical society* 16 (4): 699–710.
- Oldřichová T. (2003)** Kachetinská vína. *Vinařský obzor* 96 (6): 271.
- Paul S., Rimando A. M., Lee H. J. (2009)** Cancer cells the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in colon anti-inflammatory action of pterostilbene is mediated through. *Cancer prevention research* 2: 650–657.
- Paulová H., Bochářková H., Táborská E. (2004)** Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* 98 (4): 174–179.
- Pavloušek P. (2011)** Pěstování révy vinné. Moderní vinohradnictví. Dostupné z: http://books.google.com.tr/books?id=rYkLNbrzHUC&pg=PA72&lpg=PA72&dq=flavan&source=bl&ots=kQx4VdSpNB&sig=z05RPsrb6ymLpcm1hbM6jfCGH0U&hl=cs&sa=X&ei=pOvuUPW5O4iphAeRpYFo&redir_esc=y#v=onepage&q=flavan&f=false str. 72 cit. 1. 2. 2013
- Perrone G., M., Scilimati, A., Simone L., Vitale, P. (2010)** Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. *Current medicinal chemistry* 17 (32): 3769–3805.

- Pervaiz N., Goetze H. L. (2012)** Immune cell inflammatory cytosine responses differ between central and systematic compartments in response to acute exercise in mice. *Excercise immunology review* 18: 142–157.
- Petronni A., Blasevich M., Salami M., Papini N. (1995)** Inhibition platelet-aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis research* 78 (2): 151–160.
- Prior R. L., Wu X., Schaich K. (2005)** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agriculture and food chemistry* 53 : 4290–4302.
- Proteggente A. R., Pannala A. S., Paganga G, Van Buren L., Wiseman S, Van P. F., Dacombe C., Rice-Evans C. A. (2002)** The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Journal of agricultural and food chemistry* 50 (25): 7449–54.
- Rahman I., Biswas S. K., Kirkham P. A. (2006)** Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology* 77 (11): 1439–1452 .
- Rao Y. K., Geethangili M., Fang S. H., Tzeng Y. M. (2007)** Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study. *Food and chemical toxicology* 45 (9): 1770–1776.
- Ratola N., Faria J. L. Alves1 A. (2004)** Analysis and quantification of trans-resveratrol in wines from alentejo eegion (Portugal). *Food technology and biotechnology* 42 (2): 125–130.
- Reed D. W., Bradshaw W. S., Xie W., Simmons D. L. (1996)** *In vivo* and *in vitro* expression of non-mammalian cyclooxygenase-1. *Prostagladins* 52: 269–284.
- Reininger E. A., Bauer R. (2006)** Prostaglandin-H-synthase (PGHS)-1 and-2 microtiter assays for the testing of herbal drugs and in vitro inhibition of PGHS-isoenzymes by polyunsaturated fatty acids from Platycodi radix. *Phytomedicine* 13 (3): 164–169.
- Ricciotti E., FitzGerald G. A. (2011)** Prostagladins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology* 31: 986–1000.
- Rodrigo R., Rivera G. (2002)** Renal damage mediated by oxidative stress: A hypothesi sof protective effect of red wine. *Free radical biology and medicine* 33 (3): 400–422.

Rodríguez F. J. (2003) Fisiopatología de la inflamación: Consejo general de colegios oficiales de farmacéuticos. *Avances en inmunología, inflamación y dolor, Accion medica* 1: 49–74.

Rosenberg L., Palmer J. R., Zauber A. G., Warshauer M. E., Stolley P. D., Shapiro S., (1991) A hypothesis-nonsteroidalantiinflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancel. *Journal of the national cancer institute* 83 (5): 355–358.

Rothman N., Baris D., Karagas M. R., Koutros S., Colt J. S., Johnos A., Schwenn M., Fisher A. H., Figueroa J. D., Berndt S. I., Han S., Fremann L. E. B., Lubin J. H.,Cherala S., Cantor K., P., Jacobs K., Chanock S., Chatterjee N., Rothma N., Silverman D. T. (2012) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and other analgesic use and bladder cancer in northern New England. *Journal of cancer* 132 (1): 162–173.

Rotondo S., Rajtar G., Manarini S., Celardo A. (1998) Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound on human polymorphonuclear leukocyte fiction. *British journal of pharmacology* 123: 1691–1699.

Sahu S. C., Gray G. C. (1994) Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer letters* 85: 159–164.

Sanz M., Simón F. B, Cadahía E., Esteruelas E., Muñoz A. M., Hernández M. T., Estrella I. (2012) Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging. *Analytica chimica acta* 30 (732): 33–45.

Şendoğdu N., Aslan M., Delíorman Orhan D., Ergun F., Yeşilada E. (2006) Antidiabetic and antioxidant effects of *Vitis vinifera* L. leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Turkish journal of pharmaceutical sciences* 3: 7–18.

Shaik Y. B., Castellani M. L., Perrella A. (2006) Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 20 (3–4): 47–52.

Shalashvili A., Ugrekhelidze D., Targamadze I., Zambakhidze N., Tsereteli L. (2011) Phenolic compounds and antiradical efficiency of Georgian (Kakhetian) wines. *Journal of food science & engineering* 1(5): 361.

Shalashvili A., Ugrekhelidze D., Mitaishvili T., Targamadze I., Zambakhidze N. (2012) Phenolic compounds of wines from Georgian autochthonous grapes, Rkatsiteli and Saperavi, prepared by Georgian (Kakhetian) Technology. *Buletin of the Georgian national academy of sciences* 6 (3).

- Shi J., Ye X., Jiang B., Ma Y., Liu D., Xue S. (2010)** Traditional medicinal wines. *Functional foods of the aast* 17: 417–430.
- Shukla V., Mishra S. K., Pant H. C. (2011)** Oxidative stress in neurodegeneration. *Advances in pharmacological science* 2011: 571634.
- Schlesier K., Harwat M., Bohm V., Bitsch R. (2002)** Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research* 36 (2): 177–187.
- Schwarz M., Rodríguez M. C., Guillén D. A. Barroso C. G. (2012)** Evolution of the colour, antioxidant activity and polyphenols in unusually aged Sherry wines. *Food chemistry* 133 (2): 271–276.
- Siebert K., Zhang Y., Leahy K., Hauser S., Masferrer J., Perkins W. (1994)** Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of national academy of sciences of the united states of America* 91: 1201–1213.
- Simmons D. L., Botting R. M. Hla T. (2004)** Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews* 56: 387–437.
- Simon S. I., Goldsmith H. L. (2002)** Leukocyte adhesion dynamics in shear flow. *Annual review of biomedical engineering* 30: 315–332.
- Singleton V. L., Zaya J., Trousdale E. (1984)** Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction – product during processing. *Vitis* 23 (2): 113–120.
- Skibola Ch., Smith M. T. (2000)** Potencial health impacts of excessive flavonoid intake. *Free radical biology and medicine* 95: 375–383.
- Slanina J., Táborská E. (2004)** Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy* 98: 235–249.
- Sohal R. S., Allen R. G. (1990)** Oxidative stress as a casual factor in differentiation and aging – a unifying hypothesis. *Experimental gerontology* 25 (6): 499–522.
- Soleas G. J., Diamandis E. P., Goldberg D. M. (1997)** Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of clinical laboratory analysis* 11: 287–313.
- Soleas G. J., Grass L., Josephy P. D., Goldberg D. M., Diamandis E. P. (2002)** A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical biochemistry* 35(2): 119–24.

- Spanos G. A., Wrolstad R. E. (1990)** Influence of processing and storage on the phenolic composition on Thomson seedless grape juice. *Journal of agricultural and food chemistry* 35: 1576–1571.
- Srivastava K. C., Mustafa T. (1992)** Ginger (*Zingiber officinale*) in rheumatism and musculoskeletal disorders. *Medical hypotheses* 39: 342–348.
- Staedler D., Idrizi E., Kenzaoui B. H., Jeanneret J. L. (2011)** Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 68 (5): 1161–72.
- Stratil P., Kubáň V., Fojtová J. (2008)** Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech journal of food sciences* 26 (4): 242–253.
- Su Ch. Ch., Yang J. S., Yuanlin S., Lu H. F., Lin S. S., Chang Y. H., Huang W. W., Li Y. Ch., Chang S. J., Chung J. G. (2008)** Curcumin inhibits WEHI-3 leukemia cells in BALB/c mice. *In vivo* 22: 63–68.
- Sugimura T., Nagao M., Wacabayashi K. (2013)** Carcinogenicity of food mutagens. *Environmental health perspectives* 104 (3): 429–433.
- Sun, A. Y. Wang Q., Simoni A., Sun, G. Y. Sun, Grace Y. (2010)** Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology* 41 (2–3): 375–383.
- Szewczuk L. M., Forti L., Stivala L. A., Penning T. M. (2004 a)** Resveratrol is Peroxidase-mediated Inactivator of COX-1 but not COX-2. *The journal of biological chemistry* 279 (21): 22727–22737.
- Szewczuk L. M., Lee S. H., Blair I. A., Penning T. M. (2004 b)** Viniferin formation by COX-1: evidence for radical intermediates during co-oxidation of resveratrol. *Journal of natural products* 68(1): 36–42.
- Szewczuk L. M., Penning T. M. (2004)** Mechanism-based Inactivation of COX-1 by red wine *m*-hydroquinones: A structure-activity relationship study. *Journal of natural products* 67 (11): 1777–1782.
- Štípek S. (2000)** Antioxidanty a volné radikály ve zdraví. 1. vydání. Praha: Grada, 2000. 320 str. ISBN 80-7169-704-4.

- This P., Lacombe T., Thomas M. R. (2006)** Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in genetics* 22 (9).
- Tsang C., Higgins S., Duthie G. G., Duthie S. J., Howie M., Mullen W., Lean M. E., Crozier A. (2005)** The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *British journal of nutrition* 93 (2): 233–40.
- Volf K., Andrs F. (2008)** Flavonoidy a jejich biologické působení. Dostupné z: <http://www.juwital.cz/Upload/Documents/FLAVONOIDY.pdf> cit. 25. 1. 2013
- Vouillamoz J. F., McGovern P. E., Ergul A., Söylemezoğlu G., Tevzadze G., Carole P. Meredith C. P., Grando M. S. (2006)** Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Transcaucasia and Anatolia. *Table of contents* 4: 2.
- Wallace J. L. (2008)** Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself? *Physiological reviews* 88 (4): 1547–1565.
- Welton A. F., Hurley J., Will P. (1988)** Flavonoids and arachidonic acid metabolisms. *Progress in clinical and biological research* 280: 301–312.
- Williams A. A., Rosser P. R., (1981)** Aroma enhancing effects of ethanol. *Chemical senses* 6 (2): 149–153.
- Witt L. D. (1999)** Cox-2-Selective Inhibitors: The New Super Aspirins. *Molecular pharmacology* 55: 625–631.
- Xanthopoulou M. N., Fragopoulou E., Kalathara K., Nomikos T., Karantonis H. C., Antonopoulou S. (2010)** Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. *Food chemistry* 120 (3): 665–672.
- Xia E. Q., Deng G. F., Guo Y. J., Li H. B. (2010)** Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences* 11: 622–646.
- Xu Y., Oliverson, B. G., Simmons, D. L. (2007)** Trifunctional inhibition of COX-2 by extracts of *Lonicera japonica*: direct inhibition, transcriptional and post-transcriptional down regulation. *Journal of ethnopharmacology* 111 (3): 667–670.
- Yoon J. S., Lee H. J., Chae M. K., Lee S. Y. Lee E. J. (2013)** Cigarette smoke extract-induced adipogenesis in Grave's orbital fibroblasts is inhibited by quercetin via reduction in oxidative stress. *Journal of endocrinology* 216: 145–156.

Yoshikawa T., Naito Y. (2002) What is oxidative stress? *The Japan medical association journal* 45 (7): 271–276.

Zülli F., Belser E., Neuenschwander M., Muggli R. (2001) Antioxidants from grape seeds protect hair against reactive oxygen species. *Personal care* 65–67.