

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2021**

**Anna Pánková**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

**Anna Pánková**

Studijní obor: Zdravotní laborant

**STANOVENÍ POLYFENOLŮ V BIOLOGICKÉM  
MATERIÁLU A JEJICH ROLE V IMUNITNÍCH  
REAKCÍCH**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

# ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	<b>Anna PÁNKOVÁ</b>
Osobní číslo:	<b>Z18B0138P</b>
Studijní program:	<b>B5345 Specializace ve zdravotnictví</b>
Studijní obor:	<b>Zdravotní laborant</b>
Téma práce:	<b>Stanovení polyfenolů v biologickém materiálu a jejich role v imunitních reakcích</b>
Zadávací katedra:	<b>Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví</b>

### Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

#### Seznam doporučené literatury:

- Štern, Petr. *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*. místo neznámé : Karolinum, 2011. 9788024619798
- Ding S, Jiang H, Fang J. Regulation of Immune Function by Polyphenols. *J Immunol Res*. 2018;2018:1264074. Published 2018 Apr 12. doi: 10.1155/2018/1264074
- Magrone T, Candore G, Caruso C, Jirillo E, Covelli V. Polyphenols from red wine modulate immune responsiveness: biological and clinical significance. *Curr Pharm Des*. 2008;14(26):2733-2748. doi:10.2174/138161208786264098
- Magrone T. & Jirillo E. (2010). Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptive immune responsiveness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 279-285. doi:10.1017/S0029665110000121

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Bc. Tomáš Vlas**

Katedra záchranářství, diagnostických oborů  
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **1. června 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2021**



**PhDr. Lukáš Štich, MBA**  
děkan



**Mgr. Stanislava Reichertová**  
vedoucí katedry

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 30. 3. 2021.

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Pánková Anna

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Stanovení polyfenolů v biologickém materiálu a jejich role v imunitních reakcích

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 47

Počet stran – nečíslované: 20

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 34

Klíčová slova: Víno, Polyfenoly, Flavonoidy, Imunitní systém, Tenkovrstvá chromatografie

### **Souhrn:**

V této bakalářské práci bylo hlavním cílem získat přehled o výrobě červeného a bílého vína. Zjistit, co jsou to polyfenoly a flavonoidy, a které z nich jsou ve vínech obsaženy. Dále bylo cílem získat přehled o imunitním systému a vlivu alkoholu na něj. Výzkum byl prováděn na 16 vzorcích červených a bílých vín. Polyfenolické látky se stanovovaly chromatograficky na tenké vrstvě a kolorimetrickým stanovením. Flavonoidy se stanovovaly kolorimetrickým stanovením.

Koncentrace polyfenolických látek velmi záleží na mnoha faktorech v pěstování a výrobě vína. Nejvyšší koncentrace polyfenolů vyšla u španělského červeného vína. Nejvyšší koncentrace flavonoidů byla u vína vyrobeného v Česku. Tím se prokázalo, že nemusí být vždy spojitost mezi polyfenoly a flavonoidy. Stanovení na tenké vrstvě prokázalo jednotlivé polyfenoly ve všech 16 vzorcích.

## **Abstract**

Surname and name: Pánková Anna

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Determination of polyphenols in biological material and their role in immune responses

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 47

Number of pages – unnumbered: 20

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 34

Keywords: Wine, Polyphenols, Flavonoids, imunní systém, thin layer chromatography

### Summary:

In this bachelor's thesis, the main goal was to get an overview of the production of red and white wine, to find out what polyphenols and flavonoids are and what are contained in wines. Furthermore, the aim was to get an overview of the immune system and find out how alcohol affects it. The research was performed on 16 samples of red and white wines. Polyphenolic substances were determined by thin layer chromatography and colorimetric determination. Flavonoids were determined by colorimetric determination.

The concentration of polyphenolic substances depends very much on many factors in the cultivation and production of wine. The highest concentration of polyphenols was found in Spanish red wine. The highest concentration of flavonoids was in wine produced in the Czech Republic. This has shown that there may not always be a link between polyphenols and flavonoids. Thin layer determination showed individual polyphenols in all 16 samples.

## **Předmluva**

Téma této práce jsem si vybrala, protože jsem chtěla zjistit více informací o polyfenolických látkách ve víně. Také mne velice zaujala souvislost vína s imunitním systémem. Cílem této práce je stanovit hodnoty polyfenolů a flavonoidů pomocí kolorimetrických stanovení a identifikovat polyfenoly ve vzorcích vína pomocí tenkovrstvé chromatografie.

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat Ing. Bc. Tomáši Vlasovi za odborné vedení při tvorbě mé bakalářské práce, za pomoc, za poskytnutí rad a podkladů a za čas, který mi věnoval. Také mu děkuji za trpělivost a za ochotu mi kdykoli vysvětlit vše potřebné. Dále bych ráda poděkovala své rodině a svému příteli, za podporu při psaní této práce a za podporu po celou dobu studia.



# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	12
SEZNAM TABULEK .....	13
SEZNAM ZKRATEK .....	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST .....	17
1 VÍNO .....	17
1.1 Výroba vína.....	17
1.1.1 Výroba bílého vína .....	17
1.1.2 Výroba červeného vína .....	19
1.2 Rozdělení vín podle kvality .....	23
1.2.1 Stolní víno .....	24
1.2.2 Zemské víno .....	24
1.2.3 Jakostní víno .....	24
1.2.4 Jakostní víno s přívlastkem .....	25
1.2.4.1 Kabinetní víno .....	25
1.2.4.2 Pozdní sběr .....	25
1.2.4.3 Výběr z hroznů .....	26
1.2.4.4 Výběr z bobulí.....	26
1.2.4.5 Výběr z cibéb .....	26
1.2.4.6 Ledové víno.....	26
1.2.4.7 Slámové víno.....	27
1.3 Polyfenolické látky ve víně.....	27
2 IMUNITNÍ SYSTÉM.....	30
2.1 Základní funkce imunitního systému.....	30
2.2 Nespecifická imunita .....	31
2.2.1 Humorální složky nespecifické imunity .....	31
2.2.1.1 Komplement .....	31
2.2.1.2 Proteiny akutní fáze.....	33
2.2.1.3 Interferony .....	34
2.2.2 Buněčné složky nespecifické imunity .....	34
2.2.2.1 Fagocyty a fagocytóza.....	34

2.2.2.2	Aktivovaný makrofág.....	35
2.2.2.3	NK-buňky.....	35
2.2.2.4	Další buňky nespecifické imunity.....	36
2.3	Specifická imunita.....	36
2.3.1	Humorální složky specifické imunity.....	37
2.3.1.1	Protilátky.....	37
2.3.1.2	Cytokiny.....	40
2.3.2	Buněčné složky specifické imunity.....	41
2.3.2.1	T-lymfocyty.....	41
2.3.2.2	B-lymfocyty.....	43
2.3.2.3	Plazmatické buňky.....	43
2.4	Vliv alkoholu na imunitní systém.....	43
2.5	Francouzský paradox.....	44
3	METODY DETEKCE POLYFENOLŮ A FLAVONOIDŮ.....	45
3.1	Tenkvrstvá chromatografie (TLC).....	45
3.2	Kolorimetrická stanovení.....	46
3.3	Spektrofotometrická stanovení.....	46
	PRAKTICKÁ ČÁST.....	47
4	CÍL A ÚKOLY PRÁCE.....	47
4.1	Hlavní cíl.....	47
4.2	Dílčí cíle.....	47
5	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY.....	48
6	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU.....	49
7	METODIKA PRÁCE.....	50
7.1	Stanovení polyfenolů pomocí fenolového činidla.....	50
7.2	Stanovení flavonoidů pomocí chloridu železitého.....	50
7.3	Stanovení pomocí tenkovrstvé chromatografie.....	51
8	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ.....	54
	DISKUZE.....	60
	ZÁVĚR.....	62
	SEZNAM LITERATURY.....	63
	SEZNAM PŘÍLOH.....	66
	PŘÍLOHY.....	67

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Kalibrační křivka standardu pro výpočet koncentrace polyfenolů pro vzorky 1-8.	56
Graf 2: Kalibrační křivka standardu pro výpočet koncentrace polyfenolů pro vzorky 9- 16	
.....	56

## **SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Popis protilátky ..... 38

Obrázek 2: Silikagelové destičky se vzorky č. 1-8 po postřiku chloridem železitým..... 52

Obrázek 3: Silikagelové destičky se vzorky č. 9-16 po postřiku chloridem železitým..... 53

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Senzorické vlastnosti mezi dobře a špatně uskutečněným JMK.....	23
Tabulka 2: Výsledné koncentrace polyfenolů, flavonoidů a identifikované polyfenoly na TLC.....	54
Tabulka 3: Retenční faktory vypočítané pomocí programu Image 1.52a .....	57

## **SEZNAM ZKRATEK**

ASVK- Aktivní suché vinné kvasinky

JMF- Jablečno-mléčná fermentace

JMK- Jablečno-mléčné kvašení

NM- Normalizovaný moštoměr

SZPI- Státní zemědělská a potravinářská inspekce

CRP- C reactive protein- C reaktivní protein

NK- natural killers- přirození zabíječi

IL- interleukin

MHC- major histocompatibility complex- hlavní histokompatibilní komplex

Th lymfocyt- Helper T lymfocyte- pomocný lymfocyt

TNF- Tumor necrosis factor- faktor nádorové nekrózy

CD- Cluster of differentiation- diferenciační skupina

Ig- Imunoglobulin

IgG- Imunoglobulin G

IgE- Imunoglobulin E

IgM- Imunoglobulin M

IgA- Imunoglobulin A

IgD- Imunoglobulin D

HLA- Human leukocyte antigen- hlavní histokompatibilní systém člověka

TGF  $\beta$ - Transforming growth factor  $\beta$ - transformující růstový faktor  $\beta$

GM- CSF- Granulocyte/macrophage colony stimulating factor- faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů

M- CSF- Macrophage colony stimulating factor- faktor stimulující kolonie makrofágů

G- CSF- Granulocyte colony stimulating factor- faktor stimulující kolonie granulocytů

TCR- T cell receptor- T buněčný receptor

BCR- B cell receptor- B buněčný receptor

Ts- Supresor T lymphocyte- supresorový T lymfocyt

Tc- Cytotoxic T lymphocyte- cytotoxický T lymfocyt

TLC- Thin layer chromatography- chromatografie na tenké vrstvě

UV- Ultraviolet- ultrafialové záření

HPTLC- High performance thin layer chromatography- vysoko-účinná tenkovrstvá chromatografie

VIS- Visible spectrum- Viditelné spektrum

NM- Normalizovaný moštoměr

## ÚVOD

Tématem mé bakalářské práce je stanovení polyfenolů v biologickém materiálu a jejich role v imunitních reakcích. Toto téma jsem si zvolila po dovolené v Jihomoravském kraji, návštěvě vinobraní a vinného sklípku v Mikulově. Návštěva vinobraní a seznámení s tamní kulturou mě inspirovalo k sepsání této bakalářské práce. Díky obyvatelům Mikulova jsem se seznámila s výrobou vína. Vzhledem k mému plzeňskému původu jsme vedli mnoho diskuzí na téma pivo versus víno, a jaký druh vína je „zdravější“. A tak mě napadla myšlenka, že bych mohla stanovit polyfenoly jak v bílém, tak i v červeném víně. Také mě velmi zajímalo, jaký vliv má víno na náš imunitní systém.

Cílem mé bakalářské práce je popsat výrobu červeného i bílého vína, přiblížit si rozdělení vín podle kvality. V praktické části se poté zaměřit na stanovení polyfenolů pomocí metody tenkovrstvé chromatografie a metodou založenou na kolorimetrickém stanovení polyfenolů ve vzorcích. Dalším dílčím cílem mé bakalářské práce je stanovit hodnotu flavonoidů ve vzorcích, neboť jsou nedílnou součástí polyfenolických látek, které slouží k dodání barvy a chuti vína. Také bych se ráda v této bakalářské práci zaměřila na prospěch vína na lidské tělo, protože polyfenolické látky mají antioxidační účinky. Také se zkoumá jejich souvislost v prevenci proti nádorovým nebo kardiovaskulárním onemocněním.

Polyfenolické a fenolické látky nejsou pouze látky ve víně, ale patří také k nejvýznamnější skupině přírodních látek, které se objevují v rostlinné stravě. Polyfenoly jsou širokou skupinou fenolických látek, kterých se v normální rostlinné stravě denně objeví až 1 g na osobu.



# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 VÍNO

### 1.1 Výroba vína

Mezi alkoholovým kvašením a sklizní hroznů proběhnou přibližně dva dny. Během této doby se musí uskutečnit řada opatření, která ovlivní hotové víno po léta nebo desetiletí. Způsob, jakým hrozny zpracujeme, jak získáme mošt, ovlivňuje výslednou kvalitu vína z 80 %. Správným rozhodnutím a odpovědností získáme to nejlepší víno. (STEIDL, et al., 2010)

V minulé dekádě došlo k výrazným změnám v mechanizaci zpracování hroznů. Nové možnosti v dnešní technologii umožňují nahradit těžkou práci a zvýšit výkonnost. Bohužel se často přehlíží, že nadbytkem mechanizace vzniká větší podíl kalů a může docházet k negativnímu ovlivnění vína, například vznikem hořčiny a víno dříve stárne. (STEIDL, et al., 2010)

V dnešní době je znatelné úsilí o získání moštu s nízkým procentem kalů a zhoršujících reziduí ohleduplným a rychlým zpracováním hroznů. Tím je dán základní prvek pro vytvoření vína bez vad a jsou vytvořeny přijatelné podmínky pro další zpracování vína ve sklepech. Nejdůležitější při zpracování hroznů je rychlost a šetrnost během celého průběhu. (STEIDL, et al., 2010)

#### 1.1.1 Výroba bílého vína

Podíl výroby červeného vína je v České republice nižší, než je tomu u bílých vín. To vyplývá v první řadě z menší plochy vinic osázených červenými odrůdami hroznů a také z lepší vyzrálости hroznů u bílých odrůd. Bílá vína vznikají převážně kvašením moštu, který se oddělí od pevné části bobule. Za podmínek hlídané teploty je také možné nechat uskutečnit krátkodobou maceraci hroznů. U bílých odrůd vína je nutné zbavit ho třapin, které mohou zapříčinit negativní tóny chuti, anebo pachuti po třapinách. Hrozny můžeme zcela rozemlít nebo částečně rozdrtit a tím zčásti rozrušit bobule, což má pozitivní vliv na konečnou kvalitu bílého vína. U bílých odrůd se ve vinařství používá takzvaná technologie lisování celých hroznů. Tím docílíme svěží, aromatická vína, obsahující jemnou kyselinku. Musíme však poukázat na skutečnost, že tato vína obsahují nízké procento fenolů, které

příspěvají k ustálenosti vín a jsou tedy vhodná ke spotřebě v prvním roce po výrobě, kdy stále udržují svoji svěžest. Je tedy lepší používat mlýnkoodzrňovač namísto mlýnku, který hrozny pouze rozemele i s třápinami. (KRAUS, et al., 2006)

O tom, zda při výrobě bílé odrůdy použijeme maceraci, rozhoduje odrůda a zralost vinné révy a typ vína, který chceme vyrobit. Bílé hrozny, které nejsou zcela v pořádku (obsahují hniloby a plísně) na maturaci nepoužíváme, neboť se v nich mohou uvolnit bylinné tóny z bobulí, může dojít k výskytu hořkosti, anebo k výskytu mikrobiálních nedostatků. Abychom dosáhli kvalitní macerace je zapotřebí mít studené hrozny, které jsou zbavené třápin, úlomků letorostů a listů, které by zapříčinili negativní chuť. Délka macerace je většinou 12-20 hodin. Nejdůležitější je hlídat teplotu mezi 10-15 °C a nepřítomnost kyslíku. Při maceraci může dojít ke zvýšení pH a snížení obsahu kyselin. Po maceraci je potřeba hrozny vylisovat, odkalit mošt, upravit cukernatost, obsah kyselin a připravit na alkoholové kvašení. (KRAUS, et al., 2006)

Alkoholové kvašení je základní technologie při výrobě a jedná se o nejdůležitější biochemický proces, u kterého je potřeba přesnost a důslednost, aby vše proběhlo v pořádku. Rozdělují se dva typy postupu: spontánní a řízené kvašení. Spontánní kvašení patří mezi nejtradičnější technologie při výrobě vína, při níž je kvůli zralosti zapotřebí delší doba na výrobu. Vzniká při tom celé spektrum aromatických látek. Při spontánním kvašení je nejdůležitější kontrola oxidu siřičitého. Ta je zcela zásadní, pokud chceme co nejvíce snížit populaci bakterií. Jednorázová dávka by proto neměla překročit hodnotu 50 mg/L. Ohrožující bod spontánního kvašení je okolo 4 % alkoholu, kdy odumírají nesacharomycetní kvasinky a vinné kvasinky se stávají dominantní. (KRAUS, et al., 2006)

Řízené kvašení je aplikace ASVK do moštu a zároveň hlídání teploty, které má velký vliv na kvalitu vyrobeného vína. V dnešní době má každý výrobce velké možnosti při volbě typu ASVK. Optimální technologie řízeného kvašení by se měla řídit teplotou moštu, která má být před kvašením mezi 15-18 °C. V průběhu by se měla zvyšovat na 20-22 °C, ale neměla by překročit 25 °C. Pokud jsou dodrženy všechny tyto podmínky, předpokládá se rychlý nástup kvašení. Poté dojde k plynulému prokvašení moštů a vzniku vína, které neobsahuje zbytkové cukry. Tato vína nemají téměř žádné mikrobiální problémy. Dnešní trh však vyžaduje vína, která mají svěží a aromatickou chuť, a proto jsou vyráběna technologií chladného kvašení. Zde se teplota pohybuje mezi 13-18 °C, kvašení probíhá déle, ve vínech je vyšší obsah zbytkového cukru s vyšším obsahem alkoholu a vyšším ob-

sahem CO<sub>2</sub>. Po ukončení kvašení přecházíme ke stáčení mladého vína. U stáčení mladého vína hlídáme minimální kontakt vína se vzduchem. Je důležité mít hadici ponořenou v obou nádobách. Pokud by byl kontakt příliš velký, mohlo by to poškodit aromaticnost vína. Provzdušnění vína je velmi důležité, pokud se snažíme pouze odstranit začínající přítomnost sirky, nebo pachů kvasnic. Po dobu dalšího zrání vína se snažíme o co nejnižší počet stáčení až do doby lahvování. Teplota pro zrání vína by měla být okolo 9-12 °C a vlhkost vzduchu by měla být 70-80 %. Správný okamžik pro výslednou úpravu kyselin neboli odkyselení nastává po prvním stáčení. U bílých odrůd dochází také velmi často k přirozenému snížení procenta kyselin, které snižují i výslednou tvorbu vinného kamene. K tvorbě kamene může dojít při maceraci, před kvašením, během i po skončení. Chemické okyselení se provádí uhličitanem vápenatým. Víno by mělo být odkyseleno maximálně o 1 g/L, výsledné procento kyselin by se mělo pohybovat mezi 5-10 g/L. Minimální hodnota kyseliny vinné by měla být 1 g/L. Ke snížení kyselosti může napomoci i snížení teploty až na -4 °C. (KRAUS, et al., 2006)

Pokud kvašení probíhá správně, v určité fázi se tvoří kvasící mošt, který se jmenuje burčák. Ten je meziproduktem při jakékoli výrobě bílé odrůdy. Obsahuje přibližně 6 % alkoholu, je velmi sladký, má v sobě velké množství živých kvasinek. Kvasinky obsahují komplex vitamínu B. Postupem času kvasinky odumírají a postupně sedimentují na dno nádoby. Tím se víno samovolně pročistí. Poté se mladé víno stáčí a tím se zbavuje odumřelých kvasinek a sedimentů. Následně je víno školeno-připravováno na lahvování. (KRAUS, et al., 2006)

### **1.1.2 Výroba červeného vína**

Barvivo, které se objevuje v červených hroznech, je až na výjimky uchováváno ve slupkách. Pokud bychom bobule na výrobu červených odrůd vín po sklizni ihned lisovaly menším tlakem, vznikl by bezbarvý mošt, ze kterého pro prokvašení vznikne bílá odrůda, která se nazývá klaret. Pokud tedy chceme vyrobit víno červené, musíme barvivo ze slupek vyluhovat. (KRAUS, et al., 2006)

Fenolická vyžralost hroznů hraje podstatnou roli v technologii výroby červeného vína. Barva červených odrůd vín je tvořena anthokyany a chuť vytváří obsah a složení taninů. Velký význam pro následnou kvalitu vína tvoří veškeré fenolické látky, které jsou více klíčové než látky aromatické. U bílých odrůd je to ovšem naopak. Struktura, koncen-

trance a povaha taninů se mění podle zrání hroznů a podle použité technologie výroby. (PAVLOUŠEK, 2006)

Slupky bobulí a semena obsahují taniny a jejich koncentrace v semenech klesá od zaměkání do zralosti. Taniny ve slupkách mají více souhrnné složení a méně se mění jejich stupeň polymerizace v průběhu dozrávání, ale taniny v semenech jsou drsnější chuťově. Pokud se vyskytuje více anthokyanů ve slupce, je to většinou spojeno s výskytem taninů také ve slupce. Podíl anthokyanů a taninů je proto důležitý při výsledné kvalitě vína. (PAVLOUŠEK, 2006)

Již na vinici se vytváří kvalita fenolů, se kterou přichází bobule ke zpracování. Faktory ovlivňujícími kvalitu jsou klimatické podmínky, stresové situace a podíl mezi listovou plochou a hmotností hroznů. (PAVLOUŠEK, 2006)

Nejčastější technologií, kterou používají i malovinaři, je macerace rmutu neboli macerace ve slupkách či nakvašením. Pokud chceme zvládnout technologii macerace, je důležité vědět, že taniny ze slupek se alkoholem extrahují snadněji, taniny ze semen obtížněji, neboť je v semenech silná vrstva takzvané kutikuly. Můžeme rozlišovat tři stupně macerace. Předfermentační macerace probíhá několik hodin až několik dnů. V této fázi alkohol nevzniká, nebo jen velmi málo. Druhý stupeň je alkoholové kvašení. V tomto stupni stoupá podíl alkoholu a dochází k extrakci taninů ze slupek a poté ze semen. Poslední stupeň je pofermentační macerace a obvykle trvá 8 dní až měsíc, ale i déle. Nastává při 10-16 objemových procentech alkoholu. Podle obsahu alkoholu se také uvolňují fenolické látky, jako jsou anthokyanová barviva, která se uvolňují hned po rozrušení, rozdrčení nebo při mletí bobulí. Mohou se také uvolnit i v roztoku, který je bez alkoholu. K tomuto dochází ihned na začátku macerace. Další se uvolní 2.-3. den macerace taniny ze slupek, které jsou chuťově jemnější. Ty ke svému uvolnění potřebují, aby obsah alkoholu byl 3-6 %. Poslední fenolické látky, která se uvolní, jsou taniny ze semen. V závislosti na vyzrállosti hroznů jsou tyto taniny chuťově ostré, trpké a hořké. Obvykle se uvolní při vyšším obsahu alkoholu-sedmi procentech a začínají se objevovat od 5. dne macerace. (PAVLOUŠEK, 2006)

Nejdůležitější v procesu macerace je udržování vhodné a stálé teploty mezi 28-30°C. Pokud je teplota mezi 30-35 °C, dochází rychleji k extrakci barviv a taninů, ale také vznikají rizikové faktory, kterými jsou například stresové situace pro kvasinky a zvýšená možnost produkce těkavých kyselin. Pokud je teplota pod 25 °C, je proces zpomalen a ma-

cerace je méně kvalitní. Macerace tedy nesmí probíhat v chladném sklepě, protože to negativně působí na kvalitu červených odrůd vín, které pak nezískávají svoji chuťovou plnost. Také častěji dochází ke zvýšenému procentu trpkých a hořkých tónů, protože nedochází k hodnotné polymerizaci barviv s taniny. Vína mohou být díky nízkým teplotám méně barevná, protože se snižuje vylouhování barviv. (PAVLOUŠEK, 2006)

Macerace může probíhat například v otevřených dřevěných a plastových kádích, v nerezových nádobách. Tímto se vyznačuje klasická výroba červených odrůd u malovinařů. Základ je pravidelně dvakrát denně rmut míchat, aby byl neustálý kontakt slupek a semen. Tím se nejlépe extrahují barviva a taniny. Při míchání bychom měli mít nádobu otevřenou, aby mohlo docházet k makrooxidaci, která vhodně působí na stabilizaci barviv a zjemnění taninů, jejich spojování a polymerizace. Macerace by se měla ukončit podle toho, jaký typ vína chceme vyrobit, a to senzoričkým hodnocením mladého vína. Macerace se musí ukončit a rmut vylisovat, pokud dojde k velmi silnému projevu taninů. Podle toho, jak jsou hrozny kvalitní, se macerace pohybuje mezi 7-30 dny. 7 dní macerace trvá u hroznů s nedokonale vyzrálými, například zelenými semeny, která uvolní velké množství trpkých a hořkých látek. Pokud necháme maceraci trvat 30 dní i déle, znamená to, že máme dokonale vyzrálé bobule s tmavohnědými až černými semeny. Na kvalitě hroznů závisí tedy doba ukončení procesu. (PAVLOUŠEK, 2006)

Jako další může macerace probíhat pomocí sprchování moštem. Pro tento postup je vhodná nádoba, která je z nerezů a má ve spodní části vývod. Uvnitř nádoby je scezovací sítko, ve víku je přívod s imitací sprchy. Oba vývody jsou spojeny hadicí přes čerpadlo. Nádoba je naplněná rmutem, jednou denně 2 minuty mošt přečerpáváme. Tento proces lze načasovat na spínací hodiny, a proto není potřeba stálé kontroly. Mošt, u kterého zvyšujeme obsah alkoholu, protéká rmutem a kladně působí na uvolňování fenolických látek. Ukončení macerace probíhá stejně jako u macerace v otevřených nádobách, jen může trvat kratší dobu, například 5 dní. (PAVLOUŠEK, 2006)

V neposlední řadě lze použít i postup výroby červeného vína ve vinifikátorech, za určitých okolností lze i v podmínkách malovinařů použít vinifikátory s možností míchání rmutu a regulace teploty, hlavně s ohřevem. Mícháním rmutu a regulací teploty dochází k optimalizaci extrakce barviv a taninů a celý proces lze načasovat podle druhu vína, které chceme vyrobit. Před macerací se přidá čistá kultura kvasinek-ASVK. Kvasinek existuje velké množství a vyberou se podle toho, jakou odrůdu chceme. Na našem trhu seženeme

kvasinky pro druhy Cabernet Sauvignon, Rulandské modré, Merlot. Primeur kvasinky jsou určeny pro vína, která budeme konzumovat jako mladá, což jsou vína z odrůd Modrý Portugal anebo vína Svatovavřínecká. Grand Cru kvasinky se používají pro dokonale fenolicky vyztáhlé bobule a pro vína, která jsou těžká a plná a zrají v dřevěných sudech. (PAVLOUŠEK, 2006)

Pokud macerace proběhla úspěšně, můžeme přejít k dalšímu kroku, k jablečno-mléčné fermentaci. Vinaři, kteří jsou již zkušení, tento krok provádějí současně s alkoholovým kvašením. Malovinaři by tento krok měli dělat až po ukončení alkoholového kvašení. Cílem tohoto procesu je enzymatická přeměna kyseliny L-jablečné na kyselinu L-mléčnou a oxid uhličitý, za pomoci mléčných bakterií. Pokud je tato přeměna kvalitní, zlepšuje to chuťovou plnost vína. Jde tedy o minimalizaci kyseliny jablečné, která je chuťově méně příjemná než kyselina mléčná. K mikrobiální stabilitě vína vede metabolismus kyseliny jablečné, který odstraní zdroje uhlíku pro výživu bakterií. Produkci negativních sensorických projevů, jako jsou například těkavé kyseliny, těkavé sirnaté látky, podporuje spontánní JMF, která probíhá v našich klimatických podmínkách s nečistou mikroflórou. Vývoj této spontánní mikroflóry je závislý na počasí a době zrání hroznů, deštivé periody nejsou pro kvalitní vývoj vhodné. Také se může na bobulích objevit hniloba. (PAVLOUŠEK, 2006)

Výhoda inokulace již známého kmene mléčné bakterie je možnost kontroly JMK a tím pozitivní vliv na sensorické vlastnosti odrůdy. Sloučeniny, které tento proces ovlivňují, pocházejí z metabolismu hroznů a mikrobiálního metabolismu. Úplný průběh je důležitý pro vlastnosti vína a pro mikrobiální stabilitu. V horších podmínkách, například při nižší teplotě nebo nízkém pH, lze využít selektované preparáty mléčných bakterií. Kvalita jablečno-mléčné fermentace má tedy velký vliv na sensorické vlastnosti vína. Tabulka číslo 1 ukazuje sensorické vlastnosti špatně a správně provedené fermentace. (PAVLOUŠEK, 2006)

Tabulka 1: Senzorické vlastnosti mezi dobře a špatně uskutečněným JMK

Dobře provedená JMK	Špatně provedená JMK
Kvasinky	Intenzivní mléčné aroma
Med	Kyselý jogurt
Vanilka	Octová příchuť
Toust	Hořká dochuť
Větší tělo vína	Animální tóny
Plnost chuti	
Kulatost chuti	
Jemné taniny	
Výraznější perzistence	

(PAVLOUŠEK, 2006)

V jižněji položených vinařských zemích probíhá tento proces kvůli přirozené mikroflóře bakterií, které jsou teplým a suchým počasím kvalitně selektované. V našich podmínkách je více vhodná čistá kultura bakterií. Kvůli horším podmínkám je na trhu větší počet přípravků bakterií k inokulaci. Pro každého vinaře je tedy důležité, aby JMF proběhla co nejrychleji, aby nedošlo k opravdové oxidaci vína, která by byla negativní pro kvalitu vína. (PAVLOUŠEK, 2006)

## 1.2 Rozdělení vín podle kvality

Vína by měla být rozdělena podle platného vinařského zákona České republiky. To je podle webové stránky (Zákony pro lidi) „zákon č. 321/2004 Sb. Zákon o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o vinohradnictví a vinařství)“.

Česká republika je jen okrajovou vinařskou oblastí. Vinice zde nalezneme na severu a hrozny mají svou speciální kvalitu. Víno řadíme do kvalitativních tříd podle procenta cukru, který je v bobulích v období sklizně. Cukr vzniká asimilací a jeho kvantita závisí na spoustě faktorů. Některé z nich jsou lidmi neovlivnitelné, například vinice, která je neopakovatelná a jedinečná. Může mít mnoho nedostatků, které nám nedovolí dosáhnout vysoké cukernatosti. Rovněž může mít zcela optimální podmínky pro pěstování. Může mít těžkou zamokřenou půdu, vinice může být otočena na severní stranu, může mít mrazovou kotlinu, díky které dojde dříve k předčasnému zmrznutí listů. Další neovlivnitelným faktorem je počasí, které bude v daném roce. Opakem jsou faktory ovlivnitelné, jako je volba odrůdy, kterou vysadíme. Například Muškát, Modrý Portugal, Veltlínské červené rané, Müller Thurgau jsou vína, která dozrávají dřív. Ryzlink vlašský, Ryzlink rýnský jsou naopak vína, která dozrávají jako pozdní. Dalším ovlivnitelným faktorem je natočení řad ke slunci a spon výsadby. Dále je důležité obdělávání vinice, keř nesmí být moc hustý a musí být za-

jištěn přísun slunce listům k asimilaci. Správný vinař si vždy musí pamatovat, že kvalita vína se dělá na vinici a hrozny musí být kvalitní. Ne až ve sklepě. (KRAUS, et al., 2006)

Cukernatost vína se měří hustoměry nebo jinými optickými přístroji. V České republice se používají takzvané stupně Československého normalizovaného moštoměru (NM), který nám udává, kolik kilogramů cukru obsahuje 100 litrů moštu. Ve Španělsku, Francii nebo Itálii používají Oechsleho stupně, které nám dávají zkrácenou hmotnost jednoho litru moštu. Vinaři se tedy ještě zcela nesjednotili na stejné jednotky. Pro normálního zákazníka je dobré vědět, že z cukru kvašením vzniká alkohol a dá se tedy vypočítat z množství v bobulích pomocí koeficientu 0,6. Rovnice se pak zapíše  $NM \times 0,6$  a vyjdou objemová procenta alkoholu. (KRAUS, et al., 2006)

### **1.2.1 Stolní víno**

Stolní víno je uváděno jako nejnižší kategorie vín. Dříve se toto víno smělo vyrábět pouze z hroznů vypěstovaných v ČR, ale dnes se smí vyrábět i z hroznů všech zemí Evropského společenství. A to z odrůd moštových, stolních, ale i neregistrovaných. U těchto druhů vín nesmí být na etiketě název odrůdy, ročník, vinařská oblast, ani jiný zeměpisný název. Cukernatost musí být minimálně 14°NM, tj. 8,3 % alkoholu. (DIVOKOVÁ, 2014), (KRAUS, et al., 2006), (OTÁHAL, 2010)

### **1.2.2 Zemské víno**

Zemské víno je druh stolních vín, který splňuje následující podmínky. Hrozny byly sklizeny na území ČR, cukernatost musí být minimálně 14°NM a výnos vinice nesmí překročit hodnotu 12 t/ha. Tento druh vín může mít na své etiketě název odrůdy, ročník a zeměpisné označení. (DIVOKOVÁ, 2014), (KRAUS, et al., 2006), (OTÁHAL, 2010)

### **1.2.3 Jakostní víno**

Jakostní víno je víno, které bylo vyrobeno pouze z tuzemských hroznů, které jsou určeny pro jakostní vína z vinic vhodných pro jakostní vína stanovené oblasti. Výroba vína musí proběhnout v té samé oblasti. Cukernatost vín musí být minimálně 15°NM (8,9 % alkoholu). Tento druh vín musí splňovat jakostní požadavky a musí být zaříděno Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí, a to jako víno jakostní odrůdové a jakostní víno známkové. Odrůdové víno je vyrobené z vinných hroznů, rmutu nebo z hroznového moštu a musí být vyrobeno nejvýše ze 3 odrůd. Tyto odrůdy musí být na seznamu odrůd pro výrobu jakostních vín. Známkové víno je vyrobeno ze směsi vinných hroznů, rmutu, hroznového moštu vyrobeného z hroznů sklizených na vinici, která je vhodná pro jakostní víno



stanovené oblasti, a smísením jakostních vín. Na etiketě se objevuje název vinařské oblasti, označení „jakostní víno“, může být uveden i název odrůdy nebo odrůd, pokud se jedná o víno odrůdové (podíl každé odrůdy musí být minimálně 15 % a odrůdy jsou seřazeny v sestupném pořadí) nebo známka, pokud je to víno známkové. Dále na etiketě může být název vinařské podoblasti, vinařské obce a viniční tratě. (DIVOKOVÁ, 2014), (KRAUS, et al., 2006), (OTÁHAL, 2010), (PAVLOUŠEK, 2010)

#### **1.2.4 Jakostní víno s přívlastkem**

Jakostní víno s přívlastkem by mělo být vyráběno pouze z tuzemských hroznů, které jsou sklizeny pouze ručně. Sklizeň musí proběhnout ve stejné vinařské podoblasti a výroba musí proběhnout ve stejné vinařské oblasti, jako probíhala sklizeň. Jejich odrůdy, původ, cukernatost a hmotnost musí ověřit SZPI. U tohoto druhu vín se nesmí nikdy zvyšovat cukernatost. Víno se může vyrábět ze rmutu, vinných hroznů nebo hroznového moštu, který je nanejvýš ze 3 odrůd. Na etiketě může být název vinařské oblasti, z níž víno pochází, název vinařské podoblasti, kde byly hrozny sklizeny, označení „jakostní víno s přívlastkem“ včetně druhu. Dále na etiketě může být odrůda nebo odrůdy, které se označují stejně jako u jakostních vín, název vinařské obce a viniční tratě. (DIVOKOVÁ, 2014), (KRAUS, et al., 2006)

Jakostní vína s přívlastkem se dělí na:

##### **1.2.4.1 Kabinetní víno**

Kabinetní víno je víno, které se vyrábí pouze z vinných hroznů cukernatosti minimálně 19°NM. Tento druh vín obsahuje nižší množství alkoholu. Některé z odrůd jako například Veltlínské zelené, Ryzlink vlašský, jsou velmi dobře pitelné a oblíbené. Většinu červených odrůd není dobré v této kategorii vyrábět, díky nízkému obsahu alkoholu, který jim nesvědčí. Většina kabinetních vín má 11-12 % alkoholu. Také bývá suché a lehčí. (DIVOKOVÁ, 2014), (KRAUS, et al., 2006), (PAVLOUŠEK, 2010), (VELKÁ VINOTĚKA, 2017)

##### **1.2.4.2 Pozdní sběr**

Pozdní sběr můžeme vyrábět pouze z hroznů cukernatosti minimálně 21°NM. Takto kvalitní hrozny se daří vypěstovat jen někde a jen někdy. Sklizeň hroznů je v pozdějším termínu. Pozdní sběr je druh vín, který tvoří většinu produkce přívlastkových vín v ČR. V této kategorii je vyráběna většina červených a bílých vín. Pozdní sběr má výraznější odrůdové charakteristiky a bývá suché s vyšším procentem alkoholu anebo s menším zby-

kem neprokvašeného cukru, tomuto vínu se pak říká polosuché. Tato kategorie je velmi kvalitní a mezi konzumenty nejoblíbenější. (DIVOKOVÁ, 2014), (KRAUS, et al., 2006), (PAVLOUŠEK, 2010), (VELKÁ VINOTÉKA, 2017)

#### **1.2.4.3 Výběr z hroznů**

Výběr z hroznů lze vyrábět pouze z vinných hroznů, které dosáhly cukernatosti minimálně 24°NM. Tato kvalita vín může být specifická. Vína mohou být vyrobená jako suchá s vyšším obsahem alkoholu, ale také s vyšším obsahem zbytkového cukru jako polosuchá až polosladká. Mají specifickou chuť a vůni, která je ovlivněna zralostí. Tato kvalita prospívá odrudám jako je například Chardonnay, Tramín červený, Rulandské šedé i bílé a Ryzlink vlašský i rýnský. Většinou je to víno plné chuti. (KRAUS, et al., 2006), (PAVLOUŠEK, 2010), (VELKÁ VINOTÉKA, 2017)

#### **1.2.4.4 Výběr z bobulí**

Výběr z bobulí se smí vyrábět pouze z vinných hroznů, které dosáhly cukernatosti minimálně 27°NM. Víno zráló velmi dlouho na vinici. Většinou se jedná o vína s vyšším podílem zbytkového cukru. Jedná se o vína polosladká až sladká. (KRAUS, et al., 2006), (PAVLOUŠEK, 2010), (VELKÁ VINOTÉKA, 2017)

#### **1.2.4.5 Výběr z cibéb**

Výběr z cibéb je velmi speciální kategorie přírodních sladkých vín, kterou lze vyrobit pouze z ušlechtilých bobulí, které byly napadeny ušlechtilou šedou hnilobou. Také se mohou tato vína vyrábět z přezrálých hroznů, které zrají na vinici velmi dlouho a změní se na hrozinky neboli cibéby. Hrozinky musí dosáhnout cukernatosti minimálně 32°NM. Bohužel neexistují každoročně optimální podmínky, aby vznikla ušlechtilá plíseň, a proto se toto víno nemusí podařit vyrobit každý rok. Tato kategorie vín je velmi vzácná, drahá, extraktivní a jsou to vína sladká, která obsahují zbytkový cukr. (KRAUS, et al., 2006), (PAVLOUŠEK, 2010), (VELKÁ VINOTÉKA, 2017)

#### **1.2.4.6 Ledové víno**

Ledové víno je druh vína, které se může vyrábět až po ověření cukernatosti SZPI. Vyrábí se většinou v severněji položených vinařských oblastech Evropy a také v Kanadě. Výroba tohoto vína je závislá na počasí, protože jen na začátku zimy se vyskytnou mrazové teploty. Tento druh lze vyrábět pouze z hroznů, které byly sklizeny při teplotách -7 °C a nižších, protože voda v hroznech se přeměnila na led. Výroba vína musí také proběhnout za podmínek, kdy jsou hrozny zmrzlé. Hrozny se ihned lisují, aby z nich vytekl zahuštěný

mošt a voda zůstala ve formě ledu ve slupkách. Mošt musí mít cukernatost nejméně 27°NM. Ledové víno má velmi specifickou chuť, je extraktivní, poměrně vzácné, má svoji specifickou barvu a vůni a díky tomu je i drahé. (KRAUS, et al., 2006), (PAVLOUŠEK, 2010), (VELKÁ VINOTÉKA, 2017)

#### **1.2.4.7 Slámové víno**

Slámové víno se smí vyrábět pouze z hroznů, které byly před zpracováním uloženy na slámě či rákosu nebo byly zavěšeny v dobře větraném suchém prostoru po dobu 3 měsíců. Část vody se z bobulí odpařuje a koncentruje se podíl extraktivních látek a pak se teprve lisuje odparem zahuštěný mošt, který musí mít cukernatost minimálně 27°NM. Na slámová vína se většinou používají bílé odrůdy vín. Hrozny musí být nepoškozené a velmi dobře vyzrálé. Tento druh patří v České republice mezi speciality sortimentu vín, které můžeme nabídnout. Většinou jsou to vína velmi sladká, vzácná, a proto i drahá. (KRAUS, et al., 2006), (PAVLOUŠEK, 2010), (VELKÁ VINOTÉKA, 2017)

### **1.3 Polyfenolické látky ve víně**

Polyfenoly jsou látky, které mají ve své molekule dvě a více hydroxylových skupin, které jsou navázané na aromatickém jádře. Najdeme téměř ve všech rostlinách, kde plní různé funkce. Mohou chránit rostliny před oxidačním stresem, patogeny, UV zářením, taniny mají ochrannou funkci v rostlinách před býložravci, polyfenoly fungují například jako signální molekuly a lignany mají za úkol tvořit mechanickou výztuhu rostlinného těla. (VOŘÍŠKOVÁ, 2017)

Ke konci 18. století se začalo s pokusy o izolaci účinných látek z rostlin. Orientační fenolový charakter se částečně stanovil podle kvalitativních reakcí účinných látek. K rozřazení fenolických látek se začaly provádět pokusy z botanické systematiky. Dále se mohly začít třídít podle svých společných vlastností, podle reakcí s proteiny, podle fyziologických účinků, podle chemické reakce a také podle fyziologických účinků na organismus. Zatím posledním stádiem vývoje techniky se polyfenoly mohou dělit podle jejich struktury. Dnes víme, že polyfenolické látky obsahují kolem 8000 sloučenin. (STEIDL, et al., 2010), (VOŘÍŠKOVÁ, 2017)

Polyfenoly jsou děleny na flavonoidy a non-flavonoidy. Mezi flavonoidy patří flavonoly, flavanoly nebo flavan-3-oly a anthokyany. Mezi non-flavonoidy patří stilbeny, fenolové kyseliny, taniny a lignany. Proces extrakce polyfenolem usnadňuje přítomnost ethanolu a jeho rozpouštěcí vlastnost. (ROVER, et al., 2013)

Fenolové kyseliny jsou primárně antioxidanty. Fenolové kyseliny se řadí mezi hydroxylové deriváty karboxylových aromatických kyselin. Tvoří se z kyseliny benzoové a skořicové. Kyselina kávová, ferulová nebo p-kumarová se tvoří z kyseliny skořicové. Naopak z kyseliny benzoové se tvoří kyselina gallová, ellagová a hydrolyzovatelné taniny. (VOŘÍŠKOVÁ, 2017)

Stilbeny můžeme v přírodě nalézt v kořenech a ve dřevě. Stilbeny se řadí mezi látky příbuzné k flavonoidům. Nejznámějším je resveratrol. Jsou to obranné rostlinné látky. (VOŘÍŠKOVÁ, 2017)

Lignany jsou dimery, které vznikají oxidativní dimerizací dvou fenylypropanových jednotek. Nejvíce je nalezneme v kůře, dřevě a pryskyřici, ale nalezneme je ve všech částech rostlin. V medicíně se využívají jako cytostatika a antivirotika. (VOŘÍŠKOVÁ, 2017)

Flavonoidy jsou nejvýznamější skupinou polyfenolů. Jsou tvořeny dvěma substituovanými benzeovými kruhy a jedním pyranovým kruhem. Nalezneme je v listech, květech a plodech rostlin. V přírodě na sebe vážou různé cukry a vyskytují se jako flavonoidní glykosidy. Jejich rozpustnost se zvyšuje v přítomnosti cukrů a hydroxylových skupin. Naopak methylové skupiny jejich rozpustnost snižují. Flavonoidy fungují jako antioxidanty. Flavonoidní sloučeniny můžeme dělit na flavanoly, flavonoly, flavony, anthokyanidiny, isoflavony a flavan-3-oly. (VOŘÍŠKOVÁ, 2017)

Červené víno je bohatým zdrojem polyfenolů, které mají velmi potřebné biologické vlastnosti. Mezi odrůdami červených vín a bílých vín je velký rozdíl ve složení a podílu fenolických látek. Tyto látky najdeme nejvíce v pečičkách, to je přibližně 50 % z celkového množství, kolem 40 % je v třapínách, 6 % je ve slupkách a zbytek obsahuje dužina. Mnoho polyfenolů má protizánětlivé, antivirové, antibakteriální, protikarcinogenní a kardioprotektivní vlastnosti. Tyto biologické vlastnosti jsou připisovány především jejich silné antioxidační aktivitě a schopnosti působit proti aktivitě volných radikálů. Mnoho publikovaných epidemiologických studií naznačuje, že pravidelná a mírná dávka červeného vína může snížit mnoho nemocí, jako je například ischemická choroba srdeční, ateroskleróza nebo výskyt rakoviny. Nejzajímavější studie jsou ty, které uvádějí spojení mezi spotřebou červeného vína a snížením rizika vzniku rakoviny. (ŠERUGA, et al., 2011)

Polyfenolické látky působí na hořkost, zabarvení vína, tríslovitost chuti, jímavost kyslíku a stárnutí vína. Podíl polyfenolů v bílých odrůdách vín je mezi 150-250 mg/L.

Podíl těchto látek v červeném víně je několikanásobně větší, kolem 4500 mg/L, podle způsobu zpracování. V průběhu zrání a stárnutí dochází k různým změnám, které ovlivní barvu a chuť výsledného produktu. Hydroxyskořicové kyseliny, které jsou řazeny mezi fenolické látky, působí na hnědnutí moštů červených i bílých odrůd. (MICHLOVSKÝ, 2014), (PAVLOUŠEK, 2010), (STEIDL, et al., 2010)

Obsah fenolů ve víně ovlivňují pěstitelské podmínky, odrůda, klimatické a půdní vlastnosti oblasti a agrotechnické zásahy na vinici. Složení fenolů a jejich kvalita závisí na kvalitě hroznů, na použité vinifikaci, a především na podmínkách macerace. (PAVLOUŠEK, 2010)

Flavonoidy tvoří většinu fenolů v červeném víně. Při klasické výrobě vína se během procesu macerace extrahuje přibližně polovina fenolických látek. Podle použité metody extrakce semen je ovlivněno množství fenolů ve víně. Také je množství vyšší při rozšířené maceraci. Pokud má víno prodlouženou dobu skladování, množství polyfenolů klesá, neboť se tvoří nerozpustné polymery. (ROVER, et al., 2013)

Polyfenoly mají různé úrovně antioxidačních účinků, které závisí na jejich chemických strukturách. Fenolová skupina je silným donorem elektronů, ale také se snadno oxiduje. Červené víno je bohaté i na sloučeniny obsahující katechol, které mají menší antioxidační aktivitu než polyfenoly. Naopak, anthokyany a taniny jsou velmi špatnými antioxidanty. Taniny nemají pro lidské tělo žádný zdravotní účinek. (ROVER, et al., 2013)

## 2 IMUNITNÍ SYSTÉM

### 2.1 Základní funkce imunitního systému

Jeden z hlavních homeostatických mechanismů organismu je imunitní systém člověka. Jeho základní funkcí je rozpoznání „škodlivého“ od „neškodlivého“ a bránění organismu před vnějšími i vnitřními škodlivinami. Díky této funkci v organismu probíhá obranyschopnost, což znamená, že imunitní systém dokáže poznat vnější patogeny a chránit organismus proti jejich toxickým účinkům. Dále v těle probíhá autotolerance, což znamená, že imunitní systém dokáže rozpoznat své vlastní buňky a nebojuje proti nim. Dalším důležitým procesem v organismu je imunitní dohled, který imunitní systém zajišťuje. Rozpozná vnitřní škodliviny v těle a průběžně je odstraňuje, například staré, poškozené nebo mutované buňky. Imunitní systém má velmi blízko k systému endokrinnímu a k systému nervovému. (HOŘEJŠÍ, et al., 2009), (ŠTERZL, 1993)

Látky, které imunitní systém rozpozná a bojuje proti nim, se nazývají antigeny. Nejčastěji se můžeme setkat s patogeny z vnějšího prostředí, kterým se říká exoantigeny, většinou to jsou infekční mikroorganismy anebo jejich produkty. Autoantigeny jsou antigeny, které pochází z našeho organismu, nejsou tedy cizorodé. Alergen je exoantigen, který již v malém množství dokáže u jedince vyvolat alergickou reakci. Superantigen v těle spouští intenzivní imunitní reakce, vyvolá nezávisle na antigenní specifitě velké množství lymfocytů. Superantigen je velmi často produkt infekčních mikroorganismů. Antigeny mohou mít jakoukoli chemickou strukturu. Antigeny musí být ve formě makromolekul, aby na ně náš imunitní systém mohl reagovat. Nejčastějšími a nejvíce významnými antigeny bývají proteiny a komplexní polysacharidy, dále také lipoproteiny a lipidy. Epitop je malá oblast antigenu, kterou dokáží imunitní receptory rozpoznat. Pokud komplexy antigenů s protilátkami a s komplementovými fragmenty tvoří celek, nazýváme to jako imuno-komplexy. (HOŘEJŠÍ, et al., 2009), (ŠTERZL, 1993)

Pokud v těle probíhá imunitní reakce, složky obrany, které bojují s infekcí, musí být zapojeny okamžitě. Tento efekt zajistí buňky a humorální složky, které nemusí mít specifickou rozpoznávací schopnost. Rozpoznat antigen a vyprodukovat proti němu specifickou protilátku a specifické T-lymfocyty trvá několik hodin až dní. Abychom tyto schopnosti humorálních a buněčných složek oddělily, rozdělujeme imunitu na nespecifickou a

specifickou. Nespecifická imunita zapojuje komplement a pomocné buňky imunity, zatímco specifická imunita využívá T- a B-lymfocytů. (FUČÍKOVÁ, 1995)

## **2.2 Nespecifická imunita**

Nespecifická imunita je evolučně starší, jde o imunitu vrozenou, neadaptivní. Vrozená imunita je především založena na buňkách a molekulách, které jsou v těle připraveny již předem a jsou většinou účinné proti mnoha různým patogenům a to tak, že reagují na funkční nebo strukturní rysy, které mají společné. Nespecifická imunita se dále dělí na buněčnou a humorální. Mezi buněčné složky nespecifické imunity patří fagocytující buňky a přirozeně cytotoxické buňky. Do humorální složky řadíme komplement, lektiny, interferony a jiné sérové proteiny. Nespecifická imunita je velmi pohotová, reaguje na patogen v těle velmi rychle, v minutách. Na každé setkání s antigenem reaguje nespecifická imunita stejně, protože nemá tzv. imunologickou paměť. Do nespecifické imunity řadíme také bariérové funkce těla, jako je povrch kůže a sliznice. (FUČÍKOVÁ, 1995), (HOŘEJŠÍ, et al., 2009), (TRÁVNÍČKOVÁ, 2003)

Pokud je kůže zdravá a neporušená tvoří spolu se sliznicí velmi dobrý obranný mechanismus proti proniknutí vnějšího antigenu. Tyto mechanismy se mohou dělit na mechanické, chemické a mikrobiální. Do mechanických mechanismů řadíme například longitudiální tok vzduchu v dýchacích cestách, pohyb řasinek nebo tekutiny v močových cestách. Chemické mechanismy jsou způsobeny například mastnými kyselinami na kůži nebo enzymy. Enzym, který se vyskytuje ve slinách, potu a slzách se nazývá lysozym. Dalším může být enzym, který se nazývá pepsin a nalezneme ho v žaludku a střevě. Také mezi chemické mechanismy řadíme antibakteriální peptidy, kterým říkáme defenziny a kyselé pH moče a žaludku. Mikrobiální mechanismus je normální nepatogenní flóra, která soutěží s patogeny o živiny a o receptorová místa, která mají za úkol zprostředkovat adhezi neboli přilnutí na epitelie a produkovat antibakteriální látky. (HOŘEJŠÍ, et al., 2009), (TRÁVNÍČKOVÁ, 2003)

### **2.2.1 Humorální složky nespecifické imunity**

Mezi humorální složky řadíme komplement, proteiny akutní fáze a cytokiny. (FUČÍKOVÁ, 1995)

#### **2.2.1.1 Komplement**

Komplementem označujeme soustavu přibližně 30 sérových a membránových proteinů, které spolupracují jak mezi sebou, tak i s ostatními imunitními mechanismy. C1-C9

jsou názvy pro 9 hlavních sérových proteinů v komplementu. Po podnětech dojde ke kaskádové aktivaci složek. Hlavní složkou celého komplementu je komponenta C3. V plazmě ji nalezneme v nejvyšší koncentraci. Při aktivaci komplementového systému poskytuje tato složka důležité aktivační a inhibiční štěpy. Fragment složky C3, který nazýváme C3b je pevně připevněn na mikrobiální povrch. Hlavní funkce komplementu jsou opsonizace, chemotaxe a osmotická lýza. Opsonizaci zajišťuje složka C3b a je to proces, při kterém je buňka nebo její část označena a určena k fagocytóze. Chemotaxi zajišťují složky C3a a C5a a znamená to pohyb buněk určitým směrem na podkladě chemického podnětu. Nejčastěji se tak pohybují makrofágy. Při osmotické lýze dojde k protržení nebo proděravění membrány mikroorganismů a způsobí to jejich lýzu, čímž je zabije. Některé složky komplementu jsou potřebné i při dalších dějích imunitního systému, imunokomplexy, které obsahují fragmenty C3dg stimulují aktivaci B-lymfocytů. (FUČÍKOVÁ, 1995), (HOŘEJŠÍ, et al., 2009), (SLOTTÁ, 2007)

Komplement můžeme aktivovat třemi různými cestami. První z nich je klasická cesta, která se zahájí na povrchu buňky, a na kterou se nevážou protilátky. Vazbou na povrch bakterie se pozmění konformace protilátky tak, že se objeví vazebné místo pro protein C1. Molekula C1 po spojení s protilátkou pozmění také svůj tvar a získá proteolytickou aktivitu a začne štěpit proteiny C2 a C4. Pro to, aby se vytvořila klasická C3-konvertáza, musí se fragmenty C4b a C2a navázat na povrch napadeného patogenu. C3-konvertáza štěpí velké množství C3 na C3a a C3b. Poté se vytváří další enzym a tím je C5-konvertáza. (FUČÍKOVÁ, 1995), (HOŘEJŠÍ, et al., 2009), (SLOTTÁ, 2007)

Nespecifickou imunitní reakcí neboli neadaptivní je alternativní cesta aktivace komplementového systému. Hlavní složka komplementu C3 se s nízkou frekvencí sama od sebe štěpí na fragment C3b, který je větší a na C3a, který je menší. Ve fragmentu C3b se objeví thioesterová skupina, která byla doposud v molekule C3 ukryta. Thioesterová skupina velmi rychle začne reagovat s hydroxy a aminoskupinami v jejím okolí. Fragment C3b se naváže na povrch částic a začne probíhat kaskáda dalších reakcí. Další částí kaskády je navázání dalšího sérového proteinu, který se jmenuje faktor B. Ten je poté štěpen sérovou proteázou, která se nazývá faktor D na dvě části Ba a Bb. Komplex, který vznikne, je poté stabilizován faktorem P a působí jako alternativní C3-konvertáza. Fragment C3b, který vznikl, se zachytí na povrchu kolem enzymově aktivního komplexu, který tento děj vyvolal a poslouží jako opsoniny. Z některých vznikají další molekuly C3-konvertázy a dochází k mnohonásobnému zesílení prvotního podnětu. Fragmenty C3a namísto toho pů-



sobí chemotakticky na fagocyty. Složité komplexy, které vzniknou z molekul C3-konvertázy, mají rozdílnou proteolytickou aktivitu a dokážou štěpit protein C5 na fragmenty C5a a C5b. Fragment C5a má velmi silné chemotaktické účinky. Vzniklý komplex je vlastně alternativní C5-konvertáza. Terminální fáze kaskády komplementu začne vznikem C5b. Tyto děje jsou zprostředkovány spontánně, nespecifickým způsobem. Toto se může stát jak na povrchu exoantigenů, tak i na povrchu vlastních buněk, což může být pro organismus škodlivé. Vlivem ochranných regulačních proteinů, které se vyskytují na povrchu vlastních buněk, nemusí dojít k rozvoji kaskády samovolnou reakcí. Umělé materiály mohou vyvolat nežádoucí aktivaci alternativní cesty. Mohou to být například umělé klouby, umělé cévní chlopně a další. Aktivace alternativní cesty komplementu může vyvolat řadu nežádoucích reakcí. (FUČÍKOVÁ, 1995), (HOŘEJŠÍ, et al., 2009), (SLOTTÁ, 2007)

Lektinová cesta aktivace komplementu je velmi podobná klasické cestě, jen s rozdílem, že místo protilátky je zapojen sérový lektin. Lektin se naváže na sacharidovou stavbu povrchu patogenů přímo a jeho funkce a složení je velmi podobné C1. Také se po vazbě na povrch mikrobu štěpí na C2 a C4. (FUČÍKOVÁ, 1995), (HOŘEJŠÍ, et al., 2009), (SLOTTÁ, 2007)

#### **2.2.1.2 Proteiny akutní fáze**

Proteiny akutní fáze se účastní na obraně organismu a mají velké spektrum aktivit. Tyto proteiny se podílí na regeneraci tkání, při reparaci, neutralizují zánětlivé antigeny a slouží k minimalizaci rozsahu lokálního poškození tkáně. Pokud bude v těle probíhat zánětlivá odpověď, v plasmě se začnou zvyšovat hladiny spousty složek komplementu. Výsledkem toho je lokální aktivace makrofágů, neutrofilů a žírných buněk. Fibrinogen, který je součástí koagulace, hraje velkou roli při hojení. Aktivitu prozáněťových enzymatických kaskád kontrolují a upravují inhibitory proteáz, které zneutralizují lysozomální hydrolázy uvolněné z již aktivovaných neutrofilů a makrofágů. Ztrátě železa zabraňují zvýšené hladiny proteinů, které dokážou vázat kovy. Každý protein, který zajišťuje odpověď akutní fáze, má značně rozdílné hladiny plazmatické koncentrace a liší se i v množství a tím se liší i jeho efektivita. CRP neboli C-reaktivní protein je jeden z hlavních proteinů akutní fáze, který zvýší svou hladinu již několik hodin po infekci. Jeho hladina se dokáže zvýšit až 1000x, ale záleží na typu onemocnění. Pokud je onemocnění virového původu, CRP není tolik zvýšeno jako u bakteriální infekce. Tento protein má schopnost působit jako opsonin pro bakterie, imunní komplexy nebo parazity a je schopen aktivovat klasickou cestu komplementu. Je schopen napodobit chování neutrofilů, monocytů, NK buněk a destiček a tím

zvýšit chemotaxi a fagocytózu neutrofilů a makrofágů. Také zvyšuje cytotoxicitu NK buněk. Produkci značně zvýší IL-6. Protein CRP se používá v praxi pro zjištění zánětu v těle a při kontrole, zda je terapie účinná. (ŠTERZL, 2005)

### **2.2.1.3 Interferony**

Interferony patří mezi cytokiny. Pokud v těle začnou působit stimuly, jako například virová infekce, jsou interferony vyprodukovány všemi jadernými buňkami. Interferony můžeme rozdělit do tří skupin: Interferon  $\alpha$ , interferon  $\beta$  a interferon  $\gamma$ . Interferon  $\alpha$  a  $\beta$  si tělo vyrobí pomocí leukocytů, makrofágů, NK-buněk a fibroblastů, které se řadí mezi pomocné buňky imunitní reakce. Interferon  $\gamma$  je produkován aktivními T-lymfocyty. Interferony indukují vznik proteinů v buňce, a ty poté zabrání vniku patogenu do vnitra buňky, to se nazývá antivirový stav. Vyšší aktivitu NK-buněk tvoří interferony, které mají vliv při jejich cytotoxickém působení na nádorem změněné buňky. Interferon  $\gamma$  je hlavní cytokin pro rozvoj buněčné specifické imunitní odpovědi. (FUČÍKOVÁ, 1995)

## **2.2.2 Buněčné složky nespecifické imunity**

### **2.2.2.1 Fagocyty a fagocytóza**

Fagocytóza je děj, při kterém dochází k pohlcování cizorodé částice, například mikrobu buňkou našeho organismu. Je to evolučně velmi starý děj. Mezi profesionální fagocyty patří neutrofilní a eosinofilní granulocyty, monocyty i jejich tkáňová forma neboli makrofágy. Jsou hlavními buňkami nespecifické imunity a zároveň klíčovými buňkami zánětlivé reakce. Buňky dendritické jsou speciálním druhem fagocytujících buněk, které mají za úkol zpracovat a prezentovat antigen. Většina charakteristik pro tyto buňky je shodná jak v enzymové, tak v receptorové výbavě. Jedním z hlavních rozdílů je, že neutrofilní granulocyty za normálních podmínek neexprimují MHC proteiny II. třídy a nejsou tedy buňkami prezentující antigen. Makrofágy fagocytují především pozůstatky vlastní buňky, které podlehnou apoptóze. Mají rovněž vliv při obraně proti intracelulárním patogenům, zatímco granulocyty jsou potřebné v antiinfekční obraně především proti extracelulárním bakteriím. Eosinofily mají vliv v obraně proti parazitárním infekcím, které jsou vyvolané mnohobuněčnými červy. Hlavní úkol dendritických buněk je zpracování a předkládání antigenu a tím tvoří spojení mezi specifickou a nespecifickou imunitou. Makrofágy se stanou funkční až po aktivaci signály, které mají od T-lymfocytů ve formě cytosinu. Granulocyty mohou svoji funkci vykonávat ihned. Dendritické buňky žijí v různých morfologických a funkčních stupních. Dendritické buňky a makrofágy žijí delší dobu než neutrofilny, ty mají poločas v krvi 6-12 hodin. Je to dáno tím, že makrofágy a dendritické

buňky se mohou transformovat a přecházet do různých aktivačních stádií. Neutrofilny tvoří 50-60 % ze všech leukocytů a jsou v první linii obrany, bojují proti bakteriím, plísním, virům a nádorovým buňkám. Fagocytózu nejsou schopny opakovat, a proto zahynou apoptózou-programovanou smrtí buňky. Oproti tomu monocyty mohou fagocytovou aktivitu opakovat. V krvi je jich mezi 5-8 % a cirkulují. Mají také digestivní aktivitu. Monocyty jsou fyziologickými prekuzory pro tkáňové makrofágové buňky. Makrofágy jsou hlavními buňkami buněčné imunity. Poskytují důležitý amplifikační mechanismus pro specifickou, získanou imunitu, díky vzájemné kooperaci s T-lymfocyty, která spočívá ve schopnosti oboustranné stimulace své funkce. (HOŘEJŠÍ, et al., 2009), (ŠTERZL, 2005)

Fagocytóza je děj, který potřebuje energii, kterou získá z metabolismu glukózy, syntézu nové buněčné membrány, proteinový systém buněk a aktivní cytoplasmatický kontraktilní systém. Fagocytóza je vícestupňová. Prvním stupněm je chemotaxe, rozpoznání cizích partikulí, adheze fagocytů na cizí částice, poté pohlcení části, metabolické zpracování usmrcení a degradace patogenu a poslední eliminace patogenu z organismu. (ŠTERZL, 2005)

#### **2.2.2.2 Aktivovaný makrofág**

Aktivovaný makrofág je funkční efektorová buňka vrozené imunity, která je schopna zabít pohlcené patogeny. Klidové makrofágy se od aktivovaných liší svou morfologií, funkčními a metabolickými vlastnostmi. Aktivovaná forma je větší, tvoří zvýšeně pseudopodia, má zvýšený metabolismus glukózy, vyšší tvorbu enzymů a zvýšeně odpovídají na chemotaktické stimuly. Aktivátor je antigen-specifický Th lymfocyt. Aktivace je v první fázi specifická, ale projevy jsou poté nespecifické. Takto aktivovaný makrofág velmi zvýší produkci reaktivních kyslíkových intermediátů, oxidu dusnatého a lysozomálních enzymů. Aktivované makrofágy zvýší sekreci cytokinů, TNF  $\alpha$ , IL-1, které přilákají bílé krvinky do místa zánětu a budou aktivovat buňky IL-12, které jsou diferenciačním faktorem pro pomocné T-lymfocyty a budou zvyšovat také sekreci interferonu  $\gamma$ . Ten indukuje specifickou imunitní odpověď a aktivuje NK-buňky. Pokud aktivované makrofágy nemohou patogen eliminovat, jejich produkty progresivně modifikují tkáň a to tak, že jako první dojde k destrukci a poté k přeměně na fibrolitickou. (ŠTERZL, 2005)

#### **2.2.2.3 NK-buňky**

NK-buňky jsou přirození zabíječi, kteří tvoří velmi specifickou třetí populaci lymfocytů. Jejich fenotypickými znaky jsou molekuly CD 56 a CD 16. Tyto buňky jsou velké granulární lymfocyty, které nemají svoje specifické receptory. V krvi tvoří přibližně 5-15

% z celkového množství cirkulujících lymfocytů. V našem organismu jsou přítomny již od narození. Jejich dovedností je spontánní cytotoxicita, hlavním cílem virová a nádorová buňka. NK-buňky nemají imunologickou paměť. Jsou raným zdrojem spousty citokinů. Rovnováha mezi aktivačními a inhibičními receptory určuje a upravuje aktivaci NK-buněk. Aktivační receptory dokážou rozpoznat cílové buňky, které MHC I molekuly ztratí. Přirození zabíječi dokážou rozpoznat 3 typy buněk. Cílovými buňkami mohou být buňky, které jsou napadené virem, nádorové buňky a opsonifikované IgG1 a IgG3. Po aktivaci se z granul NK-buněk cytolytické proteiny, kterými jsou perforiny. Imunologický dozor nad imunitním systémem, zabíjení nádorových buněk, nebo lýza virem napadených buněk jsou hlavní funkce, které plní NK-buňky. NK-buňky se mohou dělit na dvě skupiny. První jsou přirození zabíječi a druhou jsou pouze zabíječské buňky. Rozdíl těchto dvou skupin je v aktivaci pro cytotoxickou schopnost. (FUČÍKOVÁ, 1995), (ŠTERZL, 2005)

#### **2.2.2.4 Další buňky nespecifické imunity**

V nespecifické imunitě se uplatňují i další buňky jako jsou například žírné buňky, trombocyty, které produkují zánětové mediátory a endotelové buňky, které mají roli při migraci leukocytů z krve do tkáně. Žírné buňky se také jinak nazývají mastocyty. Diferencují se z granulocytových prekurzorů v kostní dřeni. Jsou velmi podobné bazofilům. Mastocyty se zapojují jako sekreční buňky. Podle lokalizace a struktury je můžeme dělit na dva základní typy- pojivové a slizniční. Tyto podtypy vznikají až vlivem mikroprostředí. Hrají důležitou roli při regulaci imunitní odpovědi, při komunikaci mezi nervovým a imunitním systémem a brání organismus proti parazitárním infekcím. Přispívají k normálnímu metabolismu pojivových tkání a k zabezpečení fyziologických funkcí sliznic. Při zánětu jsou to jedny z prvních, co se aktivují. (HOŘEJŠÍ, et al., 2009)

### **2.3 Specifická imunita**

Specifická imunita je získaná, člověk se s ní nenarodí. Tento typ imunity je evolučně mladší. Antigenně specifické mechanismy zareagují na cizorodou částici prostřednictvím velice specifických a účinných molekul. Mezi tyto molekuly patří například protilátky a antigenně specifické receptory T-lymfocytů. Specifická imunita je tedy zajištěna T- a B-lymfocyty za pomoci všech pomocných buněk imunity, cytokinů a komplementu. Aby se specifická imunita aktivovala, je k tomu potřeba několik dnů až týdnů. Specifická imunita má tzv. imunologickou paměť, to znamená, že si daný antigen dokáže zapamatovat a při dalším shledání s ním už ví, jak přesně zareagovat. Díky tomu již nevznikne choroba, i

když se v těle patogen nachází. (ADAMUS, 2007), (FUČÍKOVÁ, 1995), (HOŘEJŠÍ, et al., 2009)

### **2.3.1 Humorální složky specifické imunity**

Humorální složku tvoří protilátky a cytokiny. Protilátky jsou uvolněny z plazmocytů (aktivované B-lymfocyty). Na imunitní odpovědi se dále účastní aktivované makrofágy prezentující antigen B-lymfocytům a subpopulace T-lymfocytů, kterou je Th2 (pomocné lymfocyty). Th2 lymfocyty tvoří interleukiny 4,5,6,10 a 13. (BERNÁŠKOVÁ, 2000), (FUČÍKOVÁ, 1995), (TRÁVNÍČKOVÁ, 2003)

Když B-lymfocyty opustí kostní dřeň, zůstanou v lymfatických tkáních, než se setkají s daným patogenem. Pokud dojde k tomuto setkání, makrofágy prezentují patogen B-lymfocytu a to tak, že ji fagocytuje, částečně stráví a na svém povrchu vyprodukuje složky, které mají antigenní povahu. Na receptor B-lymfocytů se tyto složky navážou a tím je zprovozní. Aktivované lymfocyty se zvětší, dojde k jejich blastické transformaci, proliferaci a diferenciaci v plazmatických buňkách, které produkují specifické protilátky. Protilátky jsou přenášeny přes lymfatické cévy dál do krve. Aby proliferace B-lymfocytů proběhla úspěšně, je důležitý IL-4 a pro diferenciaci a sekreci protilátek je naopak důležitý IL-6. (BERNÁŠKOVÁ, 2000), (FUČÍKOVÁ, 1995), (TRÁVNÍČKOVÁ, 2003)

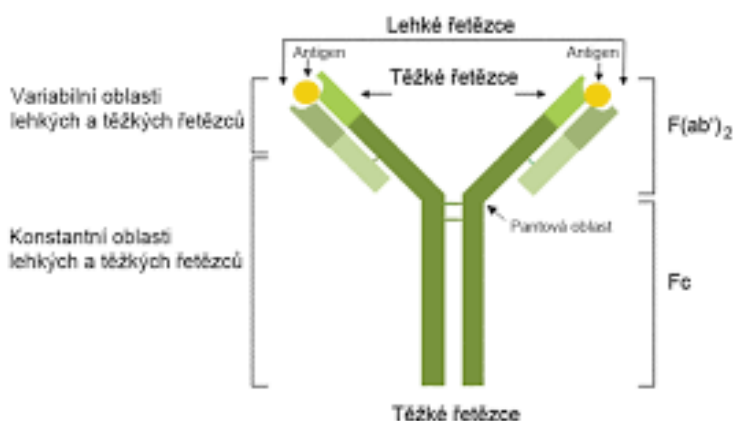
Paměťové buňky vznikají tak, že část B-buněk se po rozpoznání antigenu nepřemění, ale začne se diferencovat. Tyto buňky jsou prozatím neaktivní, jen cirkulují tělem a vstupují do lymfatických tkání. Pokud se ovšem znovu setkají s antigenem, se kterým se již setkali, začnou tvořit velké množství specifických protilátek a reagují velmi rychle. Na tomto principu je založena imunita po očkování anebo po prodělané nemoci. (BERNÁŠKOVÁ, 2000), (FUČÍKOVÁ, 1995), (TRÁVNÍČKOVÁ, 2003)

#### **2.3.1.1 Protilátky**

Protilátky neboli imunoglobuliny patří z chemického hlediska mezi glykoproteiny. To znamená, že kromě své proteinové složky tvořené aminokyselinami obsahují i složku cukernou. Každý monomer imunoglobulinu je složen ze 2 lehkých a 2 těžkých řetězců. Protilátka má tvar písmene Y pod elektronovým mikroskopem. Je brána jako základní subjednotka imunoglobulinů. Lehké a těžké řetězce propojují disulfidické můstky. Na jednom konci protilátky je oblast konstantní, která se označuje jako Fc. Na opačném konci najdeme část vysoce variabilní označovanou jako Fab, která je vazebné místo pro antigeny. Oblast, která se nachází mezi první a druhou polovinou těžkých řetězců, je značně flexibil-

ní a nazývá se pantová oblast. Je velmi citlivá na chemická činidla a k působení enzymů. Působením například trypsinu je možné v místě skloubení oddělit antigen, který váže Fab-fragment, na rozdíl od Fc-fragmentu. Ten slouží k vazbě protilátky s Fc-receptorem některých buněk, například mastocytů. (FUČÍKOVÁ, 1995), (LOCHMANNOVÁ, 2006)

Obrázek 1: Popis protilátky



zdroj: <https://labguide.cz/protilatky/>

Těžké řetězce protilátek můžeme dělit do pěti tříd: IgG, IgM, IgA, IgM, IgE. Lehké řetězce naopak můžeme dělit pouze do dvou tříd: kappa a lambda. Jednotlivá molekula lehkého řetězce nese vždy jen jeden typ, ale obě varianty se vyskytují ve všech imunoglobulinových třídách. Mezi jednotlivými třídami imunoglobulinů jsou rozdíly v prostorovém uspořádání. (LOCHMANNOVÁ, 2006)

#### a) Imunoglobulin G (IgG)

U zdravých osob představuje přibližně 75 % celkových imunoglobulinů séra. IgG se tvoří extravaskulárně i intravaskulárně. Je tvořen čtyřmi podtřídami-IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4). IgG inaktivuje viry, usnadňuje fagocytózu, neboť má opsonizační schopnost, aktivuje komplement a je účinný v neutralizaci bakteriálních toxinů. Je jediným imunoglobulinem, který prochází placentou a může tedy bránit nekojeného novorozence před infekcí v prvních týdnech života. Tvoří se při sekundární imunitní odpovědi. (FUČÍKOVÁ, 1995)

IgG1 a IgG3 působí proti proteinům virů a bakterií a jejich tvorba závisí na spolupráci s Th-lymfocyty. IgG2 se vytvářejí v odpovědi na působení polysacharidových antigenů. Může to být například proti opouzdřeným bakteriím jako je skupina streptokoků A,

pneumokokům, ale také při infekci *Haemophilus influenzae* spolu s IgG3. Tato podtřída nepotřebuje spolupráci s Th-lymfocyty ke své tvorbě. IgG4 je zaměřen proti komplexnějším strukturám, jako jsou například paraziti, složky potravin, hmyzu nebo hadí jedy. Je chronického charakteru. Váží se na povrchové receptory žírných buněk tkání a tím mají podobné vlastnosti jako IgE. Tvorba všech podtříd je regulována a usměrňována, také je ovlivněna interleukiny, které se tvoří lokálně. V krvi se nejvíce vyskytují v B-lymfocytech podtříd IgG1 a IgG2, v tonzilách se vyskytují nejčastěji IgG1 a IgG3. Biologický poločas rozpadu je většinu 21 dní, při nízké syntéze se může prodloužit a při vysoké zkrátit. V séru ho nalezneme ve formě monomeru. (FUČÍKOVÁ, 1995)

#### b) Imunoglobulin A (IgA)

IgA tvoří přibližně 15-20 % imunoglobulinů. Má dvě podtříd IgA1 a IgA2. Přibližně 90 % sérového IgA se tvoří v monomerech, ten zbylý se shlukuje a tvoří polymery a váže se na albumin nebo enzymy. Intravaskulárně najdeme přibližně polovinu imunoglobulinu A. 9:1 je poměr IgA1 a IgA2. V těle jasně převládá podtřída 1, jen v tlustém střevě najdeme převahu buněk, které tvoří podtřidu 2, která je více rezistentní proti bakteriálním proteázám. Podtřída 1 je zaměřena proti bakteriálním a potravinovým antigenům, oproti tomu IgA2 proti lipopolysacharidům. IgA neprochází placentou. Tvoří se velmi pomalu. Koncentrace IgA je srovnatelná s dospělými hodnotami až přibližně v šestnácti letech. Biologickou funkci IgA neznáme přesně, ale může aktivovat alternativní cestu komplementu. (FUČÍKOVÁ, 1995)

#### c) Sekreční IgA

Jedná se o hlavní humorální obranný faktor na sliznicích. Je tvořen připojenou sekreční komponentou a dvěma J-řetězci spojenými IgA molekulami. Produkovat ho mohou plazmatické buňky ve sliznicích převážně trávicího ústrojí, ale i v exokrinních žlázách. Poté přechází do sliznic jako sekreční IgA. Tělo ho poté koncentruje v tělních sekretech, slzách, slinách, hlenu nosní sliznice, střev anebo průdušek. Může být koncentrován i v mateřském mléce. Tím pádem je kojeneček pasivně imunizován proti střevním infekcím. Sekreční IgA má poměrně velkou rezistenci proti proteolýze. Zabraňuje adhezenci bakterií na slizniční povrch, neutralizuje viry, váže antigeny, které jsou přítomné pod epitelovou vrstvou, a tím ochraňuje sliznici. Poté se bakterie a viry přenáší ve formě imunokomplexů zpět do lumen a jsou odstraněny stolicí. Poločas rozpadu je přibližně 7 dní a sérová koncentrace ho nemůže ovlivnit. (FUČÍKOVÁ, 1995)

#### d) Imunoglobulin M (IgM)

Je přítomný na všech neaktivovaných B-lymfocytech jako membránový imunoglobulin. Vyskytuje se jako sekretovaný IgM intravaskulárně a představuje přibližně 10 % všech imunoglobulinů. Je tvořen v pentamerech a má 10 vazebných míst na každé molekule. Může se také vyskytovat v sekretech, kde se propojí se sekreční komponentou jako IgA. Je představitelem primární imunitní odpovědi, což znamená, že se tvoří až po prvním setkání s antigenem. Aktivuje velmi účinně komplement a má význam pro likvidaci bakterií, které aglutinuje. Neprochází placentou. Produkce IgM významně stoupá až po porodu. Pokud IgM nalezneme v pupečnickové krvi, odpovídá to intrauterinní infekci fétu. Přírodní protilátky, které můžeme nalézt v krvi, jsou většinou izotypu IgM. Mohou to být například heterofilní protilátky, izohemaglutininy krevních skupin AB0 a protilátky, které reagují s různými bakteriálními antigeny. Je nezávislý na koncentraci v séru a jeho poločas rozpadu je přibližně 5 dní. Přítomnost imunoglobulinu IgM svědčí pro akutní infekci v lidském těle. (FUČÍKOVÁ, 1995)

#### e) Imunoglobulin E (IgE)

IgE je přítomný jen ve velmi malých koncentracích v séru. Koncentrace v séru neodráží jeho efektivní množství pro náš organismus, neboť je rozmístěn i v jiných tkáních. Váže se svojí Fc částí na bazofilní granulocyty a na žírné buňky ve tkáních, tomu se říká homocytotropní vlastnost. Vazba je biologicky závažná, protože pokud dojde k vazbě antigenu na IgE, které jsou fixované na membráně mastocytů nebo bazofilů, dojde k degradaci a vyplaví se prozánětlivé substance. Působí na eozinofily, které jsou indukovány k cytotoxické reakci vůči některým parazitům a tím brání organismus proti parazitům. IgE se objevuje u jedinců, kteří mají sklon k alergickým reakcím závislým na IgE tím, že působí časné přecitlivosti. Nejčastěji se jedná o atopický ekzém, polipózy a některé formy asthma bronchiale. V séru je biologický poločas přibližně 2 dny, v tkáních 3 týdny. (FUČÍKOVÁ, 1995)

#### f) Imunoglobulin D (IgD)

V séru má koncentraci IgD velmi nízkou a můžeme ho uplatnit jako membránový receptor B-lymfocytů. (FUČÍKOVÁ, 1995)

#### 2.3.1.2 Cytokiny

Cytokiny jsou heterogenní skupina biologicky účinných látek neboli polypeptidy. Vytváří je různé buňky, které se zapojují do imunitní reakce, především u zánětu. Mají



velmi krátký poločas rozpadu. Moduluji aktivitu buněk, které jsou zapojeny do imunitní odpovědi ve fyziologickém zánětu a zprostředkují mezibuněčné komunikace. Jsou přítomny ve spoluúčasti na patogenezi imunopatologických stavů, včetně autoimunitních onemocnění. Aby vznikla autoimunita, podílí se na tom interleukin 1, interferon a TNF. Nejzávažnější indukci autoimunity posílením prezentace autoantigenů prostřednictvím HLA II. třídy představuje místní produkce interferonu  $\gamma$ . Interleukin 4 a TGF- $\beta$  mají v procesu opačnou úlohu, organismus ochránit. Je pro nás důležité rozpoznat cytokiny nutné pro růst buněk, prozánětlivé, cytokiny s antiproliferačním a antivirovým působením a regulační cytokiny v rámci cytokinové sítě. Mezi prozánětlivé cytokiny 1. fáze patří interleukin 1 (IL 1) a TNF. Prozánětlivé cytokiny 2. fáze jsou interleukin 2 (IL 2), IL 6, IL 4, IL 5, IL 8. Cytokiny, které podporují růst hemopoetických buněk jsou IL 3, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, erythropoetin a thymové hormony. Oproti tomu mezi regulační cytokiny řadíme IL 2, IL 4, IL 10 a interferony. Cytokiny často působí v kaskádě. Jeden indukuje tvorbu druhého a celý systém je redundátní, jednotlivé cytokiny mohou být nahrazeny jinými. Většina cytokinů je pleiotropní, působí na různé druhy buněk. (FUČÍKOVÁ, 1995), (HOŘEJŠÍ, et al., 2009)

### **2.3.2 Buněčné složky specifické imunity**

Buněčná specifická imunita je ústřední, efektorovou a regulační částí imunitního systému. Buněčné složky specifické imunity tvoří T-lymfocyty, B-lymfocyty a plazmatické buňky. Jejím úkolem je ochránit organismus proti infekcím, hlavně virovým, parazitickým a nádorovým buňkám. V thymu u nevyzrálých T-lymfocytů a v kostní dřeni u B-lymfocytů probíhá přeskupení genových úseků za vzniku genů, které kódují T-, nebo B-lymfocytární receptory pro antigen neboli TCR a BCR. Tzv. aktivace kinázových kaskád neboli signalizace je u BCR a TCR velmi podobná. V kostní dřeni pro B-lymfocyty a v thymu pro T-lymfocyty se stanovuje centrální tolerance. Za normálních podmínek je tolerance držena ve dvou úrovních, periferní a centrální. (KREJSEK, et al., 2004), (LOCHMANNOVÁ, 2006), (TRÁVNÍČKOVÁ, 2003)

#### **2.3.2.1 T-lymfocyty**

Vývoj T-lymfocytů z prekurzorových buněk v kostní dřeni a v průběhu embryonálního vývoje ve fetálních játrech a žloutkovém vaku, probíhá v primárním orgánu imunitního systému-thymu. Jen velmi malá část T-lymfocytů se tvoří mimo thymus. K aktivování a diferenciaci v jednotlivé subpopulaci lymfocytů, rozpoznání a vazba imunogenního peptidu, prostřednictvím receptoru nestačí. Vazba na receptor T-lymfocytu pro antigen musí

splňovat podmínku, že musí být stabilní a lymfocyty musí dostat signál. Signál může být stimulační nebo pomocný-kostimulační. Aby vazba mezi lymfocylem a buňkou prezentující antigen byla těsná, posílí ji další molekuly, které nalezneme na buňce, co předkládá antigen i na lymfocytech. Nazýváme je adhezivní molekuly. Jeden z hlavních růstových hormonů lymfocytů interleukin 2 dá stimulační podnět. Interleukin 2 tvoří hlavně T-pomocné lymfocyty (Th-lymfocyty), které nesou CD znak CD4+ a podporuje i jejich vlastní dělení. Buňky, které předkládají antigen a stimulované T-lymfocyty vytváří různé mediátory (cytokiny). Aby T-lymfocyty mohly projít diferenciací a dále se změnit na buňky efektorové, nebo zůstat v organismu jako paměťové buňky, musí rozpoznat svůj antigen. Paměťové buňky po dalším setkání poznají patogen dříve a ví, jak na něj zareagovat. (FUČÍKOVÁ, 1995), (KREJSEK, et al., 2004)

Rozeznáváme dvě základní funkce T-lymfocytů. Regulační pomocné s CD znakem CD4+ a regulační cytotoxické s CD8+. Regulační vliv lymfocytů vidíme pomocí cytokinů. Regulační Th-lymfocyty můžeme dělit na dvě subpopulace-Th1 a Th2. Th1-lymfocyty zapojíme, pokud chceme aktivovat makrofágy a obranné imunitní reakce pomocí tvorby cytokinů. Můžeme je využít při reakci pozdní přecitlivělosti. (FUČÍKOVÁ, 1995)

Subpopulaci Th1 využíváme, pokud produkujeme interleukin 2, interferon  $\gamma$  a faktor nekrotizující tumory (TNF). Th1 slouží v imunitní reakci IV. typu-oddálená přecitlivělost, díky své efektorové subpopulaci a působí jako pomocné buňky, když chceme ovlivnit cytotoxické T-lymfocyty. Tuto subpopulaci jde považovat za tlumící, neboť do určité míry cytokiny produkované Th1 potlačují protilátkovou imunitu. (FUČÍKOVÁ, 1995)

Subpopulace Th2 je vlastně pomocná, protože nabádá k tvorbě protilátek. Produkuje převážně interleukiny 4,5,6,10 a 13. Jsou tedy typickými pomocnými lymfocyty, protože zesilují tvorbu IL 4-6. Ty za určitých podmínek podporují tvorbu i eozinofilů a tvorbu imunoglobulinu IgE. Dále napomáhají tvorbě protilátek. Uplatníme je například v imunitní reakci I. typu-časná přecitlivělost,ale hlavně v protilátkové obraně. (FUČÍKOVÁ, 1995)

Dále se mohou vyskytovat Ts-lymfocyty-supresorové. Ty potlačí funkce Th a Tc a odpověď B-lymfocytů na antigen, tím utlumí imunitní reakci. Po odstranění patogenu v těle ukončí imunitní děj a tím zamezí aktivovaným imunokompetentním buňkám narušit vlastní tkáň. (BERNÁŠKOVÁ, 2000), (TRÁVNÍČKOVÁ, 2003)

Cytotoxické T-lymfocyty (Tc-lymfocyty) jsou efektorové buňky, které mohou zneškodnit jiné buňky cytotoxicky. Mohou rozeznat patogen na povrchu jakékoli buňky těla, porušit její membránu, vpustit cytolytické produkty a zničit ji. Jsou velmi důležité při destrukci virem napadených buněk, parazitů nebo bakterií. Také se účastní ničení rakovinných buněk. Prekurzory Tc-lymfocytů zareagují na patogen, který je na antigen prezentující buňce spolu s molekulami HLA I. třídy. (BERNÁŠKOVÁ, 2000), (NEČAS, 2005), (TRÁVNÍČKOVÁ, 2003)

#### **2.3.2.2 B-lymfocyty**

B-lymfocyty vznikají v kostní dřeni díky svým prekurzorům. Poté putují budoucí B-lymfocyty k lymfoidním orgánům. Jsou diferencovány a stimulovány na protilátky produkující plazmatické buňky a buňky paměťové, díky kontaktu s antigenem. Jejich stimulace závisí na spolupráci s T-lymfocyty. Poznat specifické antigeny B-lymfocytům pomáhají molekuly protilátek, které jsou v jejich buněčné membráně a zároveň jsou buňkami produkovány. T- a B-lymfocyty nejde chápat jako dvě oddělené třídy, které jsou v jedné třídě specializované na specifickou buněčnou imunitu a ve druhé třídě na protilátkovou imunitu. U obou tříd jejich konečná aktivita závisí i na řadě ostatních složek imunitního systému. Obě třídy se musí vzájemně podporovat. Podobně jako u T-lymfocytů se B-lymfocyt po setkání s antigenem přemění na paměťovou buňku, která si ho zapamatuje a při dalším setkání je reakce rychlejší. (FUČÍKOVÁ, 1995), (LOCHMANNOVÁ, 2006)

#### **2.3.2.3 Plazmatické buňky**

Plazmatické buňky jsou konečným stádiem diferenciací B-lymfocytů. Plazmocyty tedy ztrácejí schopnost množit se. Plazmatické buňky v sekundární imunitní odpovědi jsou zdrojem protilátek, které jsou jako humorální složka specifické imunity. Plazmocyty tvoří velké množství protilátek. (FUČÍKOVÁ, 1995), (KREJSEK, et al., 2004), (HOŘEJŠÍ, et al., 2009)

## **2.4 Vliv alkoholu na imunitní systém**

V případě imunitního systému je mírná konzumace alkoholu spojena se sníženým zánětem a zlepšenými odpověďmi na očkování, zatímco chronické nadměrné pití je spojeno se sníženou frekvencí lymfocytů a zvýšeným rizikem bakteriálních i virových infekcí. Mechanismy, kterými alkohol ovlivňuje imunitní systém v závislosti na dávce, však zůstávají špatně pochopeny kvůli nedostatku systematických studií, které zkoumají účinek více dávek a různých časových průběhů. (BARR, et al., 2016)

Několik studií ukazuje, že ethanol moduluje funkci vrozených imunitních buněk způsobem závislým na dávce a času. Mírná spotřeba alkoholu zvyšuje fagocytózu a snižuje produkci zánětlivých cytokinů, zatímco chronická konzumace velkých dávek alkoholu tlumí fagocytózu a produkci růstových faktorů. (BARR, et al., 2016)

Konzumace alkoholu má rovněž vliv na buněčnou a humorální získanou imunitu. Ve velmi rané studii bylo zneužívání alkoholu spojeno se snížením počtu CD4+ a CD8+ T-lymfocytů. Tento nálezn byl potvrzen v jiné studii u těžkých pijáků mužského pohlaví, kteří měli nižší počet B-lymfocytů než průměrní nebo lehčí pijáci. Navíc velké množství chronických alkoholiků (mužů i žen) bez onemocnění jater mělo snížený poměr CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů v periferní krvi. Zdá se tedy, že konzumace alkoholu může snížit počet lymfocytů a poklesy jsou nejzřetelnější u pacientů s chronickým alkoholismem. (BARR, et al., 2016)

## 2.5 Francouzský paradox

Alkohol nemá vliv pouze na imunitní systém, ale na celé lidské tělo. Francouzský paradox je nepopiratelný a lékařsky ověřený fakt. Ve francouzských regionech, kde se denně pije víno, je nižší výskyt infarktu, srdečních chorob a cukrovky než v dalších oblastech Evropy, kde se víno tolik nepije. Regiony, kde denně pijí víno, by měly vykazovat vyšší dlouhověkost. Víno si čím dál tím více prosazuje pověst zdravého nápoje, pokud se pije v mírné míře. Výzkum ze Spojených států prokázal již před lety, že denní pití dvou až tří decilitrů u žen a dvou až čtyř decilitrů u mužů je prospěšný. Ženy mají nižší dávku díky tomu, že obecně alkohol odbourávají hůře než muži. Dnešní pohled lékařů na francouzský paradox je sice trochu pozměněný, ale stále z toho víno vychází velmi dobře. Dříve se objevovalo, že látka, která tento paradox způsobuje, je resveratrol. Ten by měl mít pozitivní účinek spojený v boji proti rakovině a vhodné účinky na kardiovaskulární systém. Od tohoto tvrzení se postupem času ustoupilo, neboť vědci zjistili, že resveratrol do těla alkoholem dostáváme ve velmi malém množství. Z posledních výzkumů vyplývá, že látka, která způsobuje francouzský paradox je alkohol, který se ve víně vyskytuje. Víno je zdravé díky tomu, že je ideálním nosičem alkoholu, kterého je tam tak akorát. Dodnes však neexistuje žádný lékařský výzkum, který by prokazoval, že alkohol má pozitivní vliv na dlouhověkost. Podmínkou tohoto efektu je, že víno by se v takovéto míře mělo pít každý den. (Francouzský paradox, 2001), (ŽELEZNÝ et al., 2010)

## 3 METODY DETEKCE POLYFENOLŮ A FLAVONOIDŮ

### 3.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je jednou z nejrozšířenějších analytických metod používaných v laboratoři organické chemie. Často se využívá pro kvalitativní analýzu. Jde o metodu, kterou se mohou měřit například polyfenoly a flavonoidy v biologických vzorcích, jako například ve víně nebo v čaji. Jedná se o levnou metodu, která spotřebovává pouze malé množství vzorku i rozpouštědel. V použití rozpouštědla neexistují téměř žádná omezení a komerčně je dostupná řada stacionárních fází, i když  $\text{SiO}_2$  je zdaleka nejpoužívanější. Při TLC se používá jednoduché a široce dostupné laboratorní vybavení. Může být využito v terénu díky snadné přenositelnosti. Kromě skenování v UV oblasti existuje také spousta vývojových metod, včetně absorpce par jódu a máčení, postřikování například roztoky kyseliny sírové nebo manganistanu. Neexistují žádné požadavky na UV aktivitu, a proto se stává TLC jednou z nejobecnějších analytických metod. TLC používá chromatografický povrch pouze jednou a detekuje se celý analyt, což znamená, že nehrozí žádné riziko akumulace analytu na chromatografickém povrchu. Pomocí tenkovrstvé chromatografie můžeme stanovovat více analytů najednou. (JOHNSON et al., 2007)

Princip TLC známe více než 100 let, ale teprve zásluhou E. Stahla ji již 30 let využíváme analyticky. Dnes známe i modernější variantu TLC a to vysoko-účinnou tenkovrstvou chromatografií (HPTLC). HPTLC dokáže využít účinné stacionární fáze o jednotné a malé velikosti částic a příslušnou instrumentaci pro automatické dávkování, vyvíjení a detekci. HPTLC je srovnatelná s plynovou chromatografií nebo vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií. Systém uložení stacionární fáze je u TLC umístěn na ploše. V TLC je na vhodné desce, která je dodána dodavatelem, nanесena tuhá stacionární fáze v tenké vrstvě. Mobilní fáze je složena ze směsi rozpouštědel, někdy s přísávkou kyselin báží anebo tlumivých roztoků. TLC obsahuje přípravu vzorku, dávkování vzorku, vyvíjení chromatogramu-separační techniky a vyhodnocení chromatogramu. Nejrozšířenější stacionární fází je silikagel, který je silně polární, slabě kyselý absorbent s velkým měrným povrchem. Dále se mohou používat měničové iontů, chemicky vázané fáze či směsné fáze nanесené v tenké vrstvě na podložce. TLC můžeme použít pro nejširší okruh látek. Destičky pro TLC se dodávají z hliníkové fólie. Doba analýzy se pohybuje přibližně 2 hodiny. Úprava vzorku před stanovením se většinou provádět nemusí. Musí se zastavit dříve, než doběhne od startu desky do konce. (ŠTULÍK, 2004)

## 3.2 Kolorimetrická stanovení

Kolorimetrická stanovení nám pomáhají orientačně určit koncentraci roztoku podle intenzity jeho zbarvení. Pro tento účel je vhodné si předem udělat kolorimetrickou stupnici, která bude obsahovat koncentrace známých látek a s těmi poté porovnat výsledky. Můžeme použít dvě nejvíce používané metody pro kvantifikaci flavonoidů. Tyto metody jsou založeny na tvorbě komplexů flavonoid-  $\text{AlCl}_3$  a následně spektrofotometrické stanovení barevného komplexu, který nám vznikl, a je přímo úměrný jejich koncentraci. Pro tvorbu tohoto komplexu je rozhodující například reakční doba, která musí být optimální, aby se zvýšila účinnost metody. (BÁRTA, et al., 2007), (da Silva, et al., 2015), (PEKAL, et al., 2014)

Po přidání roztoku  $\text{AlCl}_3$  je tato metoda selektivní pouze pro flavonoly, které se měří při 410-430 nm. Roztok přidáme v rozmezí 2-10 %. Může se využít pouze v přítomnosti kyseliny nebo acetátového roztoku, v některých případech přidáme pouze vodu nebo methanol. Jako standardy zde můžeme využít například rutin nebo kvercetin. (PEKAL, et al., 2014)

Jako druhou možnost stanovení můžeme využít reakci s  $\text{NaNO}_2$ , která probíhá v alkalickém prostředí a je založena na nitraci kteréhokoli aromatického kruhu nesoucího katechinovou skupinu se třemi nebo čtyřmi polohami, které nejsou blokovány ani obsazené. Roztok  $\text{NaOH}$  zčervená ve chvíli, kdy přidáme žlutý roztok  $\text{AlCl}_3$ . Absorbanci měříme při 510 nm. Jako standard zde používáme katechin. (PEKAL, et al., 2014)

## 3.3 Spektrofotometrická stanovení

Stanovení polyfenolů Foli-Ciocalteuovou metodou je velice jednoduché. Vyžaduje jen běžné vybavení laboratoře, je velmi pohodlné. Výsledky vyjadřujeme v m g/L kyseliny gallové. Polyfenoly obsažené ve víně reagují s činidlem za vzniku modře zbarveného komplexu, který můžeme zhodnotit pomocí VIS spektrofotometrie. Maximální absorbance modrého komplexu je v oblasti od 750 nm. Činidlo je tvořeno z kyseliny fosfowolframové ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) a kyseliny fosfomolybdenové ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ), které se po oxidaci s polyfenoly změny na směs modrých oxidů wolframu ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) a molybdenu ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). Nevýhodou této metody je, že může být ovlivněna jinými nescifickými redukcujícími látkami, jako například cukry nebo bílkovinami. (JAVORSKÁ, 2014)

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 4 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

### 4.1 Hlavní cíl

Cílem praktické části bakalářské práce na toto téma bylo stanovit hodnoty látek s polyfenolickým charakterem ve vzorcích, kterými byla červená a bílá vína. Pomocí metody tenkovrstvé chromatografie nebo kolorimetrickým stanovením.

### 4.2 Dílčí cíle

Dalším cílem bakalářské práce bylo stanovit hodnoty flavonoidů ve vzorcích pomocí kolorimetrického stanovení. Dalším cílem bylo stanovit hodnoty polyfenolů kolorimetrickým stanovením. Dalším cílem bylo identifikovat polyfenoly na tenké vrstvě.

## **5 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY**

1. Jaká je koncentrace polyfenolů a flavonoidů v červených vínech?
2. Jaká je koncentrace polyfenolů a flavonoidů v bílých vínech?
3. Jaké polyfenoly se dají identifikovat ve vzorcích na tenké vrstvě?
4. Které víno ze stanovených vzorků jde označit za nejkvalitnější?
5. Jak velký rozdíl je mezi bílým a červeným vínem z hlediska stanovení polyfenolů a flavonoidů?



## 6 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Stanovovala jsem 16 různých červených a bílých vín. Některá byla z českých vinic a některá z ciziny. Vzorek číslo 1 bylo bílé víno Chardonnay z vinařství Nové Sady, které má hrozny dovezené z Itálie. Číslo 2 bylo také bílé víno Pálava-výběr z hroznů z roku 2018 z vinařství Znovín Znojmo. Třetí vzorek bylo víno červené Merlot-výběr z hroznů z roku 2017 z vinařství Štěpán Maňák. Číslo 4 jsem použila červené víno Rialto dovezené ze Španělska. Páté víno bylo červené Zweigeltrebe- jakostní víno z vinařství Château Val-tice. Dalším vzorkem byl Cabernet Sauvignon z vinařství Vinařství pánů z Lipé. Sedmým vzorkem byl také Cabernet Sauvignon, tentokrát z vinařství Walmaduro, které je v Chile. Osmý vzorek byl Cabernet Sauvignon z vinařství Château Valtery-Moldávie. Dalším vzorkem bylo víno Cabernet Moravia z rodinného vinařství Sedlák. Modrý Portugal z vinařství Habánské sklepy bylo použito jako vzorek číslo deset. Vzorek číslo jedenáct bylo víno Cabernet Sauvignon z vinařství Sarmentino, které je v Austrálii. Dalším vzorkem bylo víno Connoisseur Rouge, které se skládá z většího dílu Merlotu a menšího podílu Cabernetu Sauvignon, které je z vinařství Domaine Haut-Marin z Francie. Číslo 13 bylo portské víno z domácího vinařství na Moravě. Dalším vzorkem bylo víno Malbec z vinařství v Argentíně. Předposledním testovaným vzorkem byla Frankovka z vinařství Habánské sklepy a posledním stanovovaným vzorkem bylo víno z vinařství Obelisk, které se jmenovalo Svatomartinské rosé a bylo to víno lehce narůžovělé. Všechna vína jsem sbírala během jednoho roku a jsou to vína, která se dají zakoupit v běžných obchodech.

## 7 METODIKA PRÁCE

### 7.1 Stanovení polyfenolů pomocí fenolového činidla

Tímto stanovením jsem zjišťovala, jaké koncentrace polyfenolů se nacházejí ve vzorcích vybraných vín.

Nejprve se připravila kalibrační křivka tím, že se zředil standard kyseliny gallové o koncentraci 0,727 g/L dvojkovým ředěním od 1:1 do 1:32. Z důvodu předpokládané vysoké koncentrace byly vzorky předředěny 5x. Do první jamky mikrotitrační destičky se napipetoval blank, který byl 10 $\mu$ L destilované vody. Vše bylo prováděno v doubletu. Do jamek kalibrační křivky se napipetovalo 10 $\mu$ L roztoku kyseliny gallové v příslušném ředění. Do jamek, které byly určené pro vzorky, se napipetovalo 10 $\mu$ L vzorku. Do všech jamek se přidalo 100 $\mu$ L roztoku fenolového činidla a nechalo se to inkubovat 5 minut. Po 5 minutách inkubace se do každé jamky přidalo 100 $\mu$ L nasyceného roztoku uhličitanu sodného a inkubovalo se to 15 minut. Po uběhnutí 15 minut se mikrotitrační destička dala změřit na přístroj MRX2 při absorpenci 630 nm. Poté se vytvořila kalibrační křivka a vypočítaly jednotlivé koncentrace pro vzorky.

### 7.2 Stanovení flavonoidů pomocí chloridu železitého

Dalším praktickým úkol bylo zjistit, jak velké množství zaujmají flavonoidy z polyfenolických látek obsažených ve vzorcích vín. Koncentrace flavonoidů se stanovila na přístroji MRX2. Standardní roztok byl předem připraven rozpuštěním 10 mg epikatechinu ve 30 ml vody. Koncentrace standardního roztoku byla 0,027 mol.

Do zkumavky se napipetovalo 0,5 ml standardního roztoku, 1,5 ml vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Obsah zkumavky se promíchal a nechal 5 minut inkubovat. Po inkubaci se do zkumavky napipetovalo 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, zkumavku se promíchala a nechala 5 minut inkubovat. Dále se do zkumavky napipetovalo 1,5 ml 1M roztoku hydroxidu sodného a 1 ml vody. Po 15 minutách se standard měřil fotometricky proti slepému vzorku. Slepý vzorek neboli blank, byl připraven stejným způsobem, jen s tím rozdílem, že místo standardního roztoku a vody bylo do zkumavky napipetováno pouze 2 ml vody. Při stanovení flavonoidů se do zkumavky napipetovalo 0,5 ml vzorku a 1,5 ml vody. Postup byl poté stejný jako při přípravě standardního roztoku. Vzorky se mě-

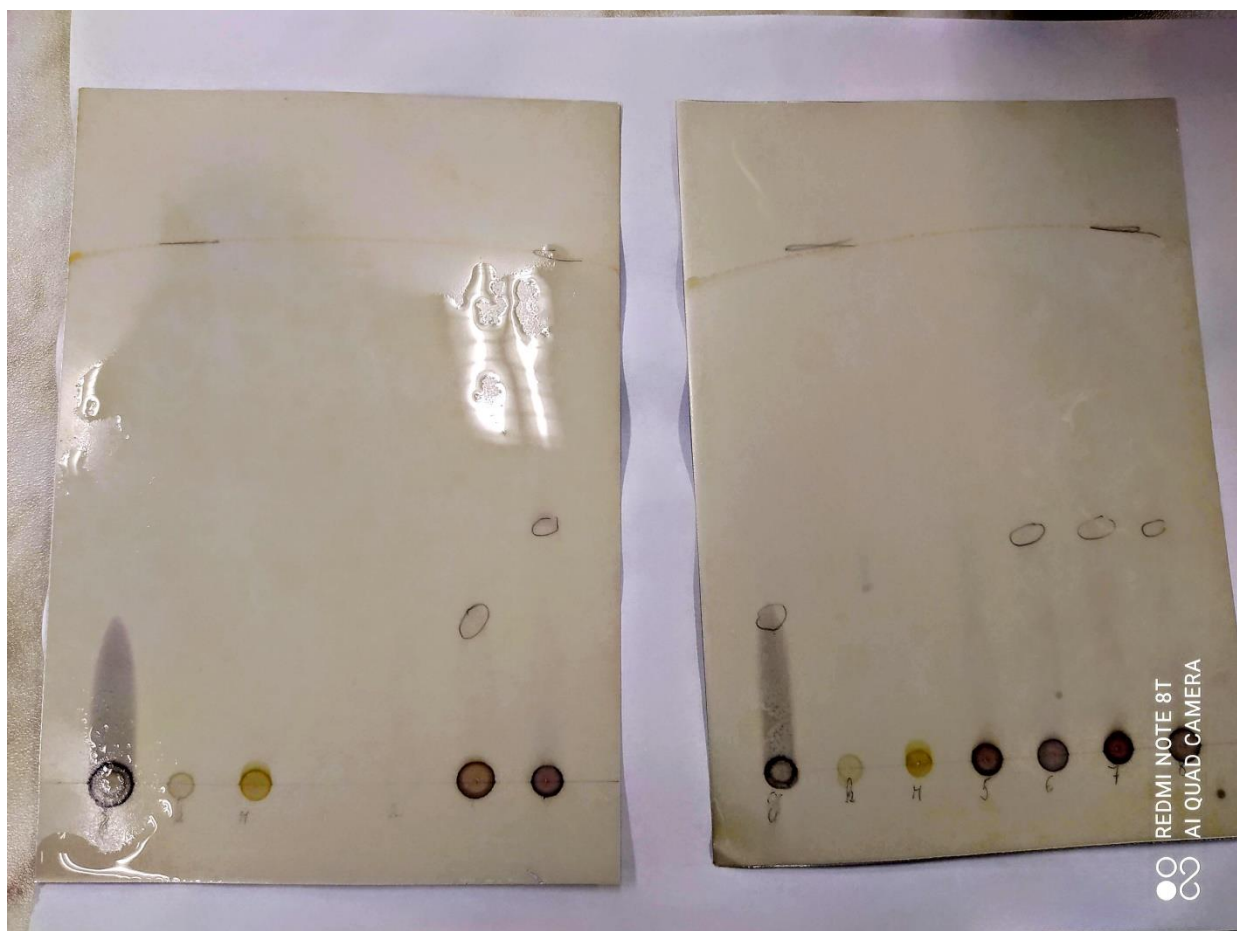
řily v doubletu. Výsledné koncentrace se poté vypočítaly pomocí klasického vzorce pro výpočet koncentrace vzorku.

### 7.3 Stanovení pomocí tenkovrstvé chromatografie

Tímto stanovením se prokazovaly polyfenolické látky obsažené ve vínech. Ke stanovení se použila TCL Silica gel 60 F<sub>254</sub>. V této metodě jde o to, že rozdělujeme jednotlivé látky mezi pohybovou (mobilní) fází rozpouštědla a pevnou (stacionární) fází vrstvy. Nejprve se připravila stacionární fáze, nejčastěji je to hliníková destička pokrytá silikagelem. Mobilní fází je poté organické rozpouštědlo a označuje se jako takzvaná vyvíjecí soustava. Jako mobilní fáze byl použit roztok chloroformu: metanolu v poměru 9:1. Každá destička se označila dle příslušných standardů a vzorků. Udělala se jen malá čárka, aby se poznalo, kam vzorek nanášet. Destička se popsala obyčejnou tužkou, neboť její povrch je velmi citlivý a mohla by se poškodit. Na spodní část se napsalo počáteční písmeno standardu nebo číslo vzorku. Aby se mohlo sledovat, jak vysoko skvrna vystoupala, a k čemu ji přirovnat. Každá destička musela obsahovat své vlastní standardy, podle kterých se poté změřily skvrny. Tyto standardy byly kyselina gallová, katechin a rutin. Na připravené destičky se nakapala jedna kapka jednorázovou pipetou příslušného standardu nebo vzorku a nechalo se to zaschnout. Tento krok se opakoval třikrát. Tato skvrna se může nazývat start a všechny skvrny musí být v přímce. Destičky se daly do vyvíjecí komory s organickým rozpouštědlem, které začalo ihned reagovat se silikagelem směrem vzhůru. Silikagel narazí na skvrny a začne je postupně dělit. Tato fáze trvala tři hodiny, aby tekutina mohla vystoupat co nejvýše po destičce. Po této fázi se destička vytáhla, označila, kam mobilní fáze dosáhla a nechala oschnout. Po oschnutí se mohl provést první odečet. Na normálním denním světle skvrny nešlo prakticky rozeznat. Po druhý odečet se použilo UV záření, protože tenká vrstva obsahovala luminifor, který je excitovaný 254 nanometry a pomáhá ke snadnější detekci excitovaných látek. Poté se destička postříkala chloridem železitým. Ten sloužil k třetímu odečtu, protože chlorid železitý reaguje s látkami, které mají polyfenolický charakter za vzniku různě barevných skvrn. Vše se vyfotografovalo a poté se vypočítal retenční faktor  $R_F$ . Ke zjištění tohoto faktoru se použil program Image 1.52a. Retenční faktor lze vypočítat jako vzdálenost skvrny od startu, která se dělí vzdáleností čela skvrny od startu. Jako vzdálenost čela skvrny od startu značíme vzdálenost, kam dovzhlíнала mobilní fáze. Retenční faktor závisí na mnoha faktorech, jako je například teplota, vyvíjecí soustava, která byla použita nebo množství naneseného vzorku. Všechny retenční faktory

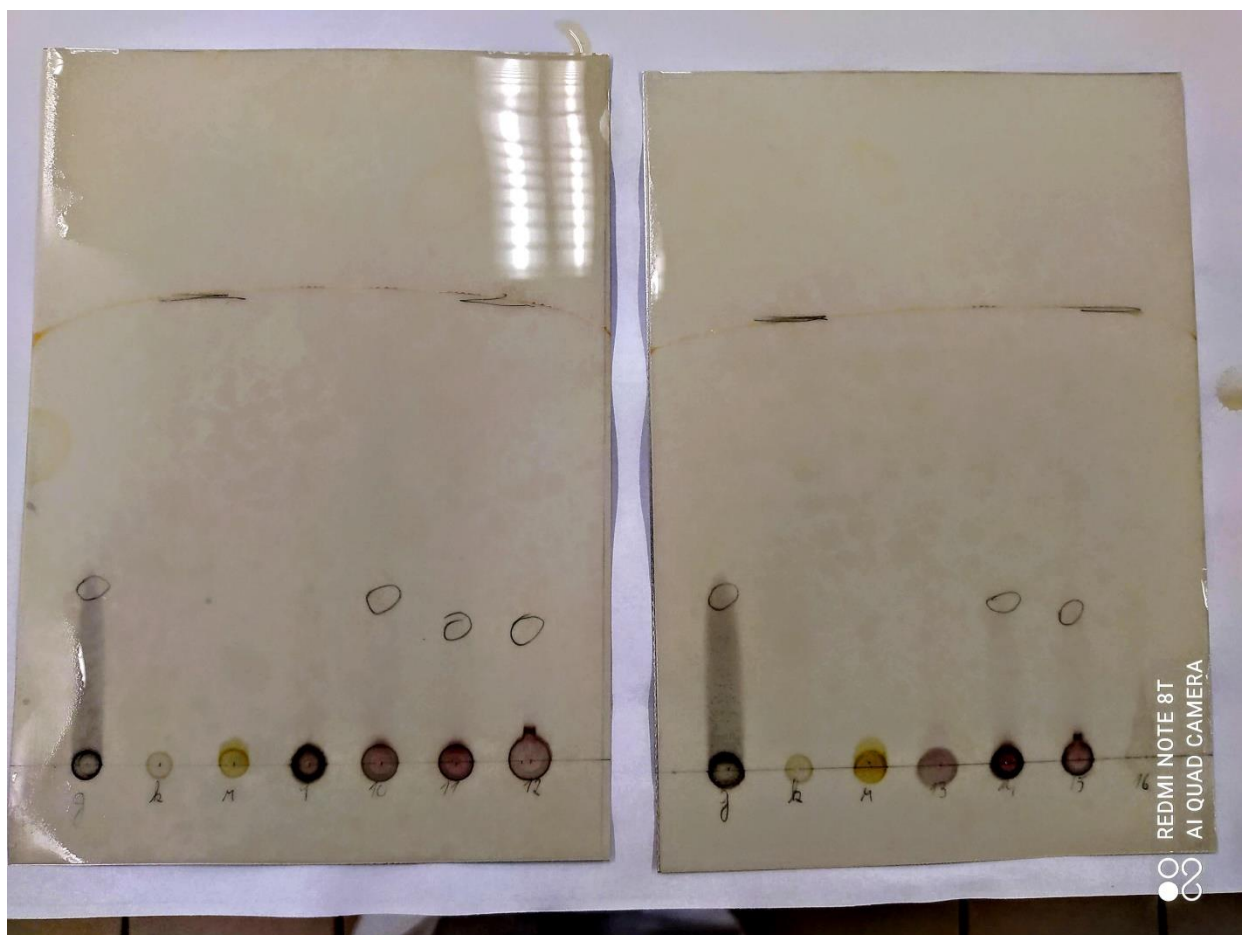
se poté zaznamenaly do tabulky a podle standardů se mohlo porovnat, o které polyfenoly se jednalo.

*Obrázek 2: Silikagelové destičky se vzorky č. 1-8 po postřiku chloridem železitým*



Zdroj: vlastní

Obrázek 3: Silikagelové destičky se vzorky č. 9-16 po postřiku chloridem železitým



Zdroj: vlastní

## 8 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Tabulka 2: Výsledné koncentrace polyfenolů, flavonoidů a identifikované polyfenoly na TLC

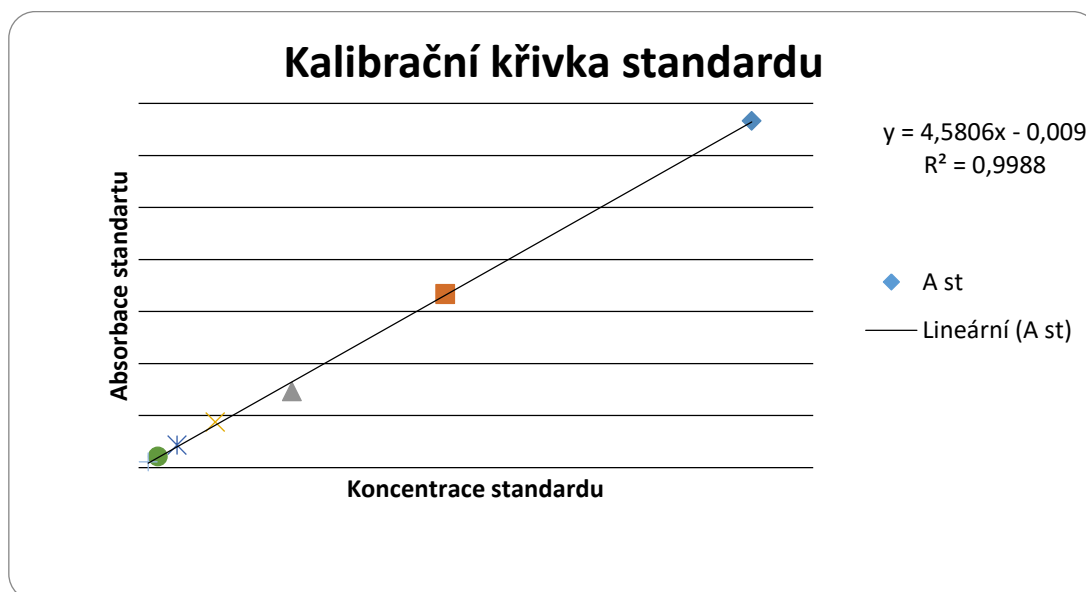
Číslo vzorku	Koncentrace polyfenolů v g/L	Koncentrace flavonoidů v g/L	Identifikované polyfenoly na TLC
1.	0,187	0,007	Nenalezeno nic
2.	0,280	0,006	Nenalezeno nic
3.	0,968	0,039	Rutin, kyselina gallová
4.	1,318	0,034	Kyselina gallová, epigalát katechin, katechin
5.	1,164	0,039	Rutin, kyselina gallová
6.	0,853	0,026	Kyselina gallová, epigalát katechin, neidentifikováno, katechin
7.	1,264	0,032	Rutin, kyselina gallová, epigalát katechin, katechin
8.	1,144	0,036	Kyselina gallová, epigalát katechin, neidentifikováno, katechin
9.	0,988	0,045	Rutin

<b>10.</b>	0,685	0,020	Rutin, kyselina gall-ová
<b>11.</b>	0,742	0,023	Rutin, kyselina gall-ová
<b>12.</b>	0,516	0,018	Rutin, kyselina gall-ová, katechin
<b>13.</b>	0,558	0,009	Rutin, kyselina gall-ová, katechin
<b>14.</b>	1,168	0,033	Rutin, kyselina gall-ová, katechin
<b>15.</b>	0,768	0,029	Rutin, kyselina gall-ová, epigalát katechin, katechin
<b>16.</b>	0,238	0,010	Rutin, neidentifikováno, katechin

Zdroj: vlastní

V tabulce č. 1 jsou vypsány koncentrace polyfenolů, které vycházely u všech vzorků kolorimetrickým stanovením. Jsou tam vidět koncentrace flavonoidů, které vycházely také kolorimetrickým stanovením a veškeré polyfenoly, které lze identifikovat na tenké vrstvě.

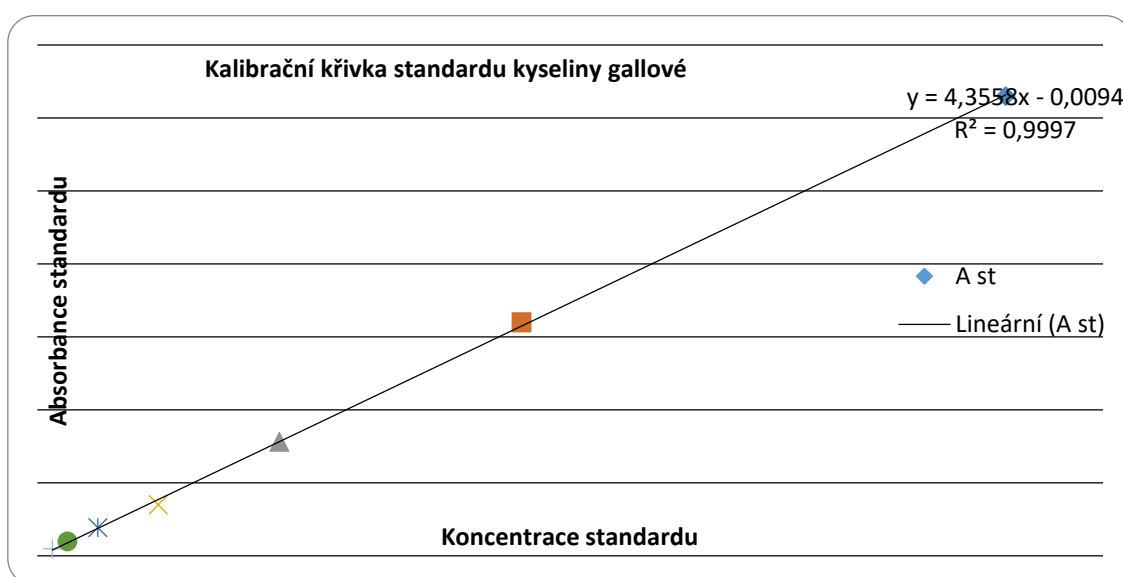
Graf 1: Kalibrační křivka standardu pro výpočet koncentrace polyfenolů pro vzorky 1-8



Zdroj: vlastní

Na grafu číslo 1 je vidět kalibrační křivka standardu pro stanovení polyfenolů ve vzorcích, kterým byla kyselina gallová pro vzorky 1-8. Hodnota spolehlivosti v tomto případě vyšla 0,9988. Hodnota spolehlivosti udává, jak spolehlivá metoda to je. Čím blíže je 1, tím více spolehlivá tato metoda je.

Graf 2: Kalibrační křivka standardu pro výpočet koncentrace polyfenolů pro vzorky 9- 16



Zdroj: vlastní



Na grafu číslo 2 je kalibrační křivka standardu pro stanovení polyfenolů ve vzorcích, kterým byla kyselina gallová pro vzorky 9-16. Hodnota spolehlivosti je v tomto případě také velmi vysoká, 0,9997.

*Tabulka 3: Retenční faktory vypočítané pomocí programu Image 1.52a*

<b>Papír</b>	<b>Číslo vzorku</b>	<b>Číslo skvrny</b>	<b>Retenční faktor</b>
<b>1.</b>	kyselina gallová	1.	0,31
	Katechin	1.	0,81
	rutin	1.	0,05
	3.	1.	0,05
		2.	0,30
	4.	1.	0,31
		2.	0,49
		3.	0,88
<b>2.</b>	kyselina gallová	1.	0,31
	katechin	1.	0,95
	rutin	1.	0,05
	5.	1.	0,05
		2.	0,31
	6.	1.	0,30
		2.	0,43
		3.	0,69
		4.	0,93
	7.	1.	0,05

		2.	0,31
		3.	0,42
		4.	0,91
	8.	1.	0,29
		2.	0,42
		3.	0,70
		4.	0,90
<b>3.</b>	kyselina gallová	1.	0,40
	katechin	1.	0,92
	rutin	1.	0,06
	9.	1.	0,06
	10.	1.	0,05
		2.	0,36
	11.	1.	0,05
		2.	0,29
	12.	1.	0,05
		2.	0,29
		3.	0,86
<b>4.</b>	kyselina gallová	1.	0,40
	katechin	1.	0,92
	rutin	1.	0,06
	13.	1.	0,05

		2.	0,35
		3.	0,93
	14.	1.	0,05
		2.	0,35
		3.	0,92
	15.	1.	0,05
		2.	0,32
		3.	0,58
		4.	0,89
	16.	1.	0,05
		2.	0,16
		3.	0,84

Zdroj: vlastní

V tabulce č. 2 jsou vidět retenční faktory, které se vypočítaly podle skvrn vzorků a standardů z tenkovrstvé chromatografie.

## DISKUZE

Hlavním cílem této bakalářské práce a zároveň první výzkumnou otázkou bylo zjištění koncentrace polyfenolů a flavonoidů v červených vínech. Všechny koncentrace polyfenolů vycházely v miligramech. Nejvyšší koncentrace polyfenolů byly většinou ve vínech dovezených z cizích zemí. Podle výzkumu Konrashova et al. (2009) mělo španělské víno Cabernet Sauvignon koncentraci polyfenolů 2414 m g/L, v mém výzkumu mělo španělské víno koncentraci 1318 m g/L, která vyšla ze stanovovaných vín jako nejvyšší. Tento rozdíl mohl způsobit rozdílný druh vín, ale také to mohlo způsobit, že mé víno bylo konzumní. Druhým vzorkem s vysokou koncentrací bylo víno Cabernet Sauvignon z Chile, které mělo hodnotu 1264 m g/L. Dle výzkumu Konrashova, který stanovoval 10 různých červených vín, vyšla koncentrace chilského Cabernet Sauvignon 1453 m g/L. V těchto dvou případech se koncentrace od sebe příliš nelišily. Naopak nejnižší koncentrace polyfenolů byl u vzorků vín číslo 12 a číslo 13. Vzorek číslo 12 bylo víno Connoisseur Rouge, které je kombinací Merlotu a Cabernet Sauvignonu. Vzorek číslo 13 bylo domácí portské víno z Moravy. Koncentrace flavonoidů byla oproti tomu nejvyšší u vzorku číslo 9, což bylo víno Cabernet Moravia, které je z rodinného vinařství Sedlák. Další víno, které mělo vysoký obsah flavonoidů, bylo víno Zweigeltrebe, to mělo i vyšší koncentraci polyfenolů. Naopak nejnižší koncentraci flavonoidů obsahovalo domácí portské víno a opět víno Connoisseur Rouge.

Druhou výzkumnou otázkou byla koncentrace polyfenolů a flavonoidů v bílých vínech. Testovala jsem dvě bílá vína a jedno víno růžové. Vyšší koncentraci polyfenolů mělo bílé víno Pálava a nižší koncentrace byla u vína Chardonnay. Dle výzkumu Pignatelliho (2005) je koncentrace polyfenolů 10krát menší. Můj výzkum to potvrdil pouze v některých případech. Růžové víno Svatomartinské rosé od firmy Obelisk mělo jen g/L nižší koncentraci než Pálava, ale vyšší než Chardonnay. Koncentrace flavonoidů vyšly u obou bílých vín také velmi podobně a byly nízké. Vyšší koncentraci mělo v tomto případě Chardonnay, ale jen o 0,001 g/L. Růžové víno mělo koncentraci 0,010 g/L.

Třetí výzkumnou otázkou bylo, jaké polyfenoly lze identifikovat na tenké vrstvě. Ve vzorcích bílých vín se mi nepodařilo identifikovat žádné polyfenoly. V růžovém víně jsem našla skvrny tři, ale identifikovala jsem pouze dvě z nich. První skvrnou byl rutin a dalším známým polyfenolem byl katechin. V červených vínech se většinou objevovaly skvrny rutin, kyseliny gallové, epigalátu katechinu a samotný katechin. Ve dvou vzorcích

jsem našla dvě skvrny, které se mi bohužel nepodařilo identifikovat, šlo o vzorky vín Cabernet Sauvignon z vinařství pánů z Lipé a Cabernet Sauvignon z moldavského vinařství. Rutin, kyselina gallová, epigalát katechin a katechin se podařilo identifikovat pouze ve dvou vzorcích červených vín. U Cabernetu Sauvignon z vinařství v Chile a poté u Frankovy z Habánských sklepů. Ve vzorku vína číslo 9 se mi naopak podařilo identifikovat pouze jeden polyfenol, kterým byl rutin. Šlo o víno Cabernet Moravia z vinařství Sedlák. Zjištěné polyfenolické látky, které se podařilo identifikovat, se mohly porovnat s výsledky výzkumu Kanga et al. (2009), který se zabýval oddělením skvrn katechinů a flavinů na tenké vrstvě. Skvrny se shodovaly s jeho výzkumem a tím se identifikované polyfenoly potvrdily i v mém výzkumu.

Čtvrtá výzkumná otázka je, které ze stanovených vín lze označit jako nejkvalitnější. Podle Steidla et al. (2010) by mělo červené víno obsahovat až 4500 mg/L polyfenolických látek. V mém případě vyšlo jako nejkvalitnější víno Rialto, které bylo dovezené ze Španělska, které mělo koncentraci 1318 mg/L. To může být dáno tím, že vína, která jsem stanovila, mohla být méně kvalitní.

Poslední výzkumná otázka je, jak velký rozdíl je mezi červeným a bílým vínem z hlediska stanovení polyfenolů a flavonoidů. Podle Šeruga et al. (2011) červená vína obsahují velké množství polyfenolických látek, ale bílá vína tyto látky v takovém množství neobsahují. Je to dáno tím, že polyfenoly jsou látky, které jsou vysoce zastoupeny ve slupkách barevných plodin. Červené víno se při výrobě slupek nezbavuje, ale bílé víno ano. Tento rozdíl znamená, že červené víno získává svoji barvu především díky slupce a jadérkům. Ve vzorcích, které jsem použila ke stanovení, je rozdíl mnohonásobně větší a dokázalo to, že bílé víno obsahuje polyfenolů méně. Pokud jde o stanovení samotné, rozdíl v tomto ohledu není. Červené víno se stanovuje na množství polyfenolů a flavonoidů stejně jako víno bílé.

## ZÁVĚR

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo stanovit hodnoty polyfenolů a flavonoidů ve vzorcích vín pomocí tenkovrstvé chromatografie a pomocí kolorimetrických stanovení. Koncentraci polyfenolů jsem stanovovala v 16 různých bílých a červených vínech. V mém případě mě výsledky tohoto výzkumu velmi překvapily. Koncentrace polyfenolických látek nebyly tak vysoké, jak by měly správně být. To mohlo způsobit mnoho faktorů, jako například druh vinné révy, ročník, sběr, cena a mnoho dalších. Pro tvorbu kvalitního vína je potřeba mnoho podmínek, jako například vhodné klima, vhodná půda, sluneční záření a další. Myslela jsem si, že vína, která byla do Čech dovezena z cizích zemí, budou mít koncentraci polyfenolů nižší, ale bylo tomu právě naopak. Dalším důležitým faktorem ve víně jsou flavonoidy, které jsou nedílnou součástí polyfenolů a jsou jeho největší složkou. Po tomto zjištění jsem předpokládala, že vína, která měla koncentraci polyfenolů nejvyšší, budou mít i hodnoty flavonoidů vysoké. Po svém výzkumu jsem se dozvěděla, že tomu není vždy tak. Vína, která měla podle mého stanovení hodnoty polyfenolů nejvyšší, koncentraci flavonoidů nejvyšší neměla. Velmi mě také překvapilo, které polyfenolické látky, jako například kyselinu gallovou, rutin, katechin či epigalát katechinu, lze vidět na tenké vrstvě. Při normálním denním světle nebylo na destičce vidět nic, ale když jsem destičku dala pod UV záření, skvrny se objevily výrazněji. Avšak dle mého názoru byly skvrny nejvýraznější, když jsem na destičku rozprášila chlorid železitý. Poté se skvrny daly odečíst snáze.

Jsem velmi ráda, že jsem se mohla teoreticky i prakticky dozvědět mnoho zajímavých věcí ohledně výroby vín, jejich rozdělení dle kvality a zajímavostí ohledně vlivu alkoholu na imunitní systém a celé lidské tělo. Myslím, že v mém výzkumu by se mohlo pokračovat, zjišťovat další opravdu pozoruhodné věci ohledně polyfenolických látek ve vínech a jejich výsledné vlastnosti při určování kvality vín, které lze zakoupit v restauracích či obchodech. Ke stanovení je potřeba malé množství vzorku, a proto by nebyl problém vzorky vín získat a stanovit. Také by se tím mohla dokázat kvalita vín dovezených z cizích zemí. Polyfenolické látky se objevují v mnoha dalších rostlinných látkách, které by se mohly těmito metodami stanovit.

## SEZNAM LITERATURY

- ADAMUS, T., 2007. *Základy mikrobiologie a imunologie*. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita. ISBN 978-80-248-1284-7. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:fddd06e0-0d91-11e8-a0cf-005056827e52>
- BARR, T., HELMS Ch., GRANT K. a MESSAOUDI I., 2016. *Opposing effects of alcohol on the immune system*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* [online]. 242-251 [cit. 2021-01-12]. ISSN 0278-5846. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584615300385>
- BÁRTA, M. a BARTOŠOVÁ, L., 2007. *Maturitní otázky - chemie*. Praha: Fragment. ISBN 978-80-253-0498-3. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:31c0a170-6953-11e8-a583-005056827e51>
- BERNÁŠKOVÁ, K., 2000. Fyziologie imunitního systému. In ROKYTA, R. aj. *Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědeckých a tělovýchovných oborech*. Praha: ISV nakladatelství. ISBN 80-85866-45-5
- DA SILVA, L. A., PEZZINI, B. R., & SOARES, L., 2015. Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacognosy magazine*, 11(41), 96–101. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.149721>
- DIVOKOVÁ, L., 2014. *Hodnocení kvality vína*. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- Francouzský paradox. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2021-01-12]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Francouzsk %C3 %BD \\_paradox](https://cs.wikipedia.org/wiki/Francouzsk%C3%BD_paradox)
- FUČÍKOVÁ, T., 1995. *Klinická imunologie v praxi*. Praha: Galén. ISBN 80-85824-24-8. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:80bd8940-45e2-11e7-aac4-005056827e51>
- HOŘEJŠÍ, V. a BARTUŇKOVÁ, J., 2009. *Základy imunologie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:6ae68d90-1bc1-11e4-8e0d-005056827e51>
- JAVORSKÁ, K., 2014. *Stanovení vybraných chemických parametrů plodů moderních odrůd angreštů*. Brno. Diplomová práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ.
- JOHANSSON, R., TRÄFF G., SUNDÉN M. a ELLERVIK U., 2007. Evaluation of quantitative thin layer chromatography using staining reagents. *Journal of Chromatography A* [online]. 298-305 [cit. 2021-01-12]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967307012502>
- KONDRASHOV, A., R. ŠEVČÍK a H. BENÁKOVÁ, 2009. The key role of grape variety for antioxidant capacity of red wines. *E-spen* [online]. e41-e46 [cit. 2021-03-21]. ISSN 1751-4991. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751499108000954>
- KRAUS, V. a KOPEČEK, J., 2006. *Setkání s vínem*. Praha: Radix. ISBN 80-86031-69-1. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:b21e3e20-f3c9-11e4-8936-005056827e51>

KREJSEK, J. a KOPECKÝ, O., 2004. *Klinická imunologie*. Hradec Králové]: Nucleus HK. ISBN 80-86225-50-X. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:227f2150-e50d-11e4-82a1-005056827e52>

LOCHMANOVÁ, A., 2006. *Základy imunologie*. Ostrava: Ostravská univerzita, Zdravotně sociální fakulta. ISBN 80-7368-153-6. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:070c60c0-9579-11e3-a744-005056827e52>

MICHLOVSKÝ, M., 2014. *Lexikon chemického složení vína: příručka praktického vinaře*. Rakvice: Vinselekt Michlovský. 262 s. ISBN 978-80-905319-2-5.

NEČAS, E., 2005. *Poruchy funkce imunitního systému*. In NEČAS, E. aj. *Obecná patologická fyziologie*. Praha: Karolinum

OTÁHAL, K., 2010. *Jak z hroznů víno dělat*. Praha: Jonathan Livingston. ISBN 978-80-86037-35-6. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:57654600-3bbe-11e8-8142-005056827e51>

PAVLOUŠEK, P., 2010. *Výroba vína u malovinařů*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3487-3. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:ef19f8d0-9dce-11e7-ae0a-005056827e52>

PEKAL, A., PYRZYNSKA, K., 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* 7, 1776–1782 . <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>

PIGNATELLI, P., A. GHISELLI a B. BUCHETTI., et. al., 2006. *Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine* [online]. 77-83 [cit. 2021-03-21]. ISSN 0021-9150. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915005006751>;

ROVER, M. R. a BROWN R. C., 2013. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [online]. 366-371 [cit. 2021-01-12]. ISSN 0165-2370. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165237013001411>

Rozdělení vín v ČR. 2017, *Velká vinotéka* [online]. Modletice, [cit. 2021-01-12]. Dostupné z: <https://www.velkovinoteka.cz/rozdeleni-vin-v-cr-m40/>

Souvislosti. c2010-2021, *Zákony pro lidi* [online]. AION CS, [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-321/souvislosti>

SLOTTÁ, Z., 2007. *Výživa a imunita – vztah k jednotlivým živinám*. Brno. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ.

STEIDL, R., SCHÖDL, H. a SEDLO, J., 2010. *Sklepní hospodářství*. Valtice: Národní vinařské centrum. ISBN 978-80-903201-9-2. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:f53f8940-5742-11e8-9a07-005056827e52>

ŠERUGA, M., NOVAK I. a JAKOBEK L., 2011. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*. [online]. 1208-1216 [cit. 2021-01-12]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814610009003>



ŠTERZL, I., 2005. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0972-X. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:7de3b470-84ec-11e3-a606-005056827e51>

ŠTERZL, J., 1993. *Imunitní systém a jeho fyziologické funkce*. Praha: Česká imunologická společnost. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:e27e2010-d8bb-11e7-8d21-005056827e52>

ŠTULÍK, K., 2004. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0852-9. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:74411cf0-a1d0-11e2-9a08-005056827e52>

TRÁVNÍČKOVÁ, E., 2003. Fyziologie imunitního systému. In TROJAN, S. aj. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a. s., s. 771, s. 157-177

VOŘÍŠKOVÁ, Z., 2017. *Stanovení obsahu polyfenolů v základních potravinách a stanovení velikosti jejich příjmu v české populaci*. Plzeň. Diplomová práce. Západočeská univerzita v Plzni.

WANG, K., LIU, Z., HUANG, J. et al., 2009. TLC Separation of Catechins and Theaflavins on Polyamide Plates. *JPC-J Planar Chromat* 22, 97–100. <https://doi.org/10.1556/JPC.22.2009.2.4>

ŽELEZNÝ, V. a SLÍVA, J., 2010. *Dobré rady milovníka vína*. Praha: Mladá fronta. ISBN 978-80-204-2217-0. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:2aee6940-3125-11ea-b0e3-005056827e52>

## **SEZNAM PŘÍLOH**

# PŘÍLOHY