

Vplyv extraktu z výliskov bazy čiernej (*Sambucus nigra*) na hypercholesterolémiu, lipoperoxidáciu a karcinogénu hrubého čreva u potkana

PAVEL BOBEK - ŠTEFAN GALBAVÝ - MAGDA MÁRIÁSSYOVÁ

SÚHRN. U samcov potkanov (Wistar), kŕmených krátko po odstave diétou s 0,3 % cholesterolu, sa sledoval vplyv prídavku 4 % extraktu z bazy čiernej (*Sambucus nigra*) do diéty na karcinogénu hrubého čreva indukovanú dimetylhydrazínom (DMH). DMH sa aplikoval subkutánne v množstve 20 mg.kg⁻¹ telesnej hmotnosti v týždňových intervaloch 3-krát (pokús trval 8 týždňov), alebo 12-krát (pokús trval 28 týždňov). Na konci pokusu boli zvieratá 18 h po odstavení od potravy usmrtené dekapitáciou v ľahkej éterovej narkóze. Extrakt bazy neovplyvnil hypercholesterolémiu v kratšom ani dlhšom pokuse. V dlhšom z nich došlo k poklesu obsahu cholesterolu v pečeni a naopak k vzostupu hladiny triacylglycerolov v sére. V kratšom i dlhšom pokuse extrakt bazy až o 40 % znížil obsah konjugovaných diénov v hrubom čreve a v dlhšom z nich signifikantne i v pečeni. V dlhšom pokuse diéta s extraktom bazy znížila aktivity superoxiddismutázy, glutatiónperoxidázy a glutatiónttransferázy v pečeni. V dlhšom pokuse extrakt bazy o 54–80 % znížil počet stredne veľkých a veľkých fokusov aberantných krypt, o 16 % znížil ich celkový počet. Pokles incidencie a objemu nádorov pozorovaný pod vplyvom extraktu bazy nebol pre veľký rozptyl údajov štatisticky preukazný.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: extrakt bazy čiernej; hypercholesterolémia; antioxidačné enzýmy; karcinogéna; hrubé črevo

Kardiovaskulárne a nádorové ochorenia predstavujú v industrializovaných krajinách závažný zdravotnícky problém a sú hlavnou príčinou morbidity a mortality [1,2]. Súčasné poznatky dovoľujú prisudzovať reaktívnym kyslíkovým druhom (ROS) významnú úlohu v etiopatogenéze aterosklerózy i rakoviny [3,4]. Zvýšené hladiny krvného cholesterolu, najmä cholesterolu nízkoenzitných lipoproteínov (LDL), sa všeobecne považujú za významné

RNDr. Pavel BOBEK, CSc., Výskumný ústav výživy, Limbová 14, 833 37 Bratislava.

Doc. MUDr. Štefan GALBAVÝ, CSc., Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava.

Ing. Magda MÁRIÁSSYOVÁ, CSc., Výskumný ústav potravinársky, pracovisko Biocentrum, Kostolná 7, 900 01 Modra.

riziko pre vznik aterosklerózy [3]. Dokázalo sa, že oxidatívne zmenené LDL sú cytotoxické, strácajú schopnosť väzby na pečeňové LDL receptory a naopak získavajú výraznú afinitu k skavengerovým receptorom makrofágov (nevybavených spätnoväzobnou kontrolou množstva vstupujúceho cholesterolu), ktoré sa menia na penové bunky, čo je prvou fázou aterosklerotickej prestavby cievnej steny [3].

Hypotéza o účasti ROS v karcinogéneze je primárne založená na pozorovaní, že mnohé karcinogény majú charakter ROS, sú konvertované na ROS in vivo, stimulujú produkciu ROS alebo sú biologickým produktom ROS-reakcií. ROS-metabolity mnohých známych karcinogénov môžu iniciovať karcinogénezu priamym poškodením DNA. Boli uvedené dôvody o účasti ROS v iniciačnej, promočnej i progresívnej fáze karcinogézy [4,5].

Biologický antioxidačný ochranný systém proti nadmernému pôsobeniu ROS (oxidačnému stresu) tvoria antioxidačne pôsobiace enzýmy a antioxidačne aktívne látky prijímané potravou. Početné experimentálne i epidemiologické štúdie dokázali, že aplikáciou antioxidačne pôsobiacich fytochemikálií, alebo ich prírodných zdrojov, sa dosiahol protektívny efekt v ateroskleróze i karcinogéneze [5,6]. V tejto súvislosti sme u potkanov s nutrične navodenou hypercholesterolémiou a dimetylhydrazínom navodenou karcinogéznou hrubého čreva skúmali možný protektívny efekt extraktu z výliskov bazy čiernej (*Sambucus nigra*), ktorý je bohatým zdrojom flavonoidov [7].

Materiál a metódy

V pokuse sme použili samce potkanov (kmeň Wistar, Top-Velaz, Česká republika, n = 60) s počiatočnou hmotnosťou okolo 70 g, chované v štandardných podmienkach bez ovplyvňovania svetelného režimu. Zvieratá mali nepretržitý prístup k pitnej vode a strave s nasledovným zložením [8] (v %): škrob 61, kazeín 18, bravčová masť 10, celulóza 5, minerálna zmes 4, vitamínová zmes 1, fel tauri (komerčná sušená volská žľč) 0,55, cholesterol 0,3 a cholínchlorid 0,15 (kontrolná diéta). Polovica zvierat mala v tejto diéte na úkor škrobu 4 % extraktu z výliskov plodov bazy čiernej (*Sambucus nigra*) (pokusná diéta). Extrakt existuje pod obchodným názvom „Farbiaci koncentrát z výliskov bazy čiernej“ a jeho príprava je predmetom PÚV-32/98 [7]. Extrakcia výliskov bazy sa uskutočnila 70 % etanolom a extrakt sa vákuovo koncentroval na sušinu 50–60 %. Extrakt obsahuje (v %): sacharidy 37, triesloviny 13, kyseliny (vyjadrené ako kyselina citrónová) 12, antokyány 5 [7]. Výrobok je určený na farbenie alebo dofarbovanie nápojov, ovocných, cukrárskych a pekárskeho výrobkov pri odporúčanej koncentrácii 0,05–1,0 %.

Polovici zvierat na oboch diétach sme na začiatku pokusu 3-krát v týždňových intervaloch subkutánne aplikovali 1,2-dimetylhydrazínhydrochlorid (DMH) f. Aldrich vo fyziologickom roztoku v množstve 20 mg.kg⁻¹ hmotnosti. Po ďalších 5 týždňoch bol pokus ukončený. Druhej polovici zvierat na oboch diétach sa 12-krát v týždňových intervaloch rovnakým spôsobom aplikovala rovnaká dávka DMH a pokus bol ukončený za ďalších 16 týždňov. Na konci pokusov boli zvieratá usmrtené dekapitáciou v ľahkej éterovej narkóze 18 h po odstavení od potravy. V sére a pečeni sme stanovili obsah cholesterolu súpravou Oxochrom Chol 2150 E, resp. Bio-La-Test a v sére obsah triacylglycerolov súpravou TG 450 T (všetky súpravy pochádzajú z Českej republiky). V plazme, erytrocytoch a v pečeni sme stanovili obsah konjugovaných diénov [9]. V pečeni a v stene hrubého čreva sme stanovili aktivity superoxiddismutázy (SOD) súpravou Randox Lab. Ltd., UK, katalázy (KAT) [10], glutatiónperoxidázy (GSH-PX) [11], glutatión-S-transferázy (GST) [12]. V pečeni a v stene hrubého čreva sme stanovili obsah proteínov [13] a v pečeni obsah redukovaného glutatiónu (GSH) [14].

Bezprostredne po usmrtení zvierat bolo vybrané hrubé črevo, pozdĺžne otvorené, prepláchnuté fyziologickým roztokom a bola makroskopicky posúdená prítomnosť nádorov. Potom bolo črevo rozdelené na 5 častí (7 cm proximálna časť, 5 cm hlavná flexúra, 2 x 3 cm distálna časť a zvyšok kolorektálny segment). Jednotlivé časti hrubého čreva boli napnuté na parafínovú podložku a 24 h fixované v neutrálnom 10 %-nom tlmenom formole. Po fixácii boli vzorky ponechané 15 min v roztoku Giemsa (6 ml/50 ml fosforečnanového tlmivého roztoku). Giemsov roztok bol potom nahradený tlmiacim roztokom a vzorky boli vyšetrené v stereomikroskope (pri 40-násobnom zväčšení) so zameraním sa na hodnotenie výskytu fokusov aberantných krýpt (ACF). Zaznamenávali sme celkový počet ACF, ako aj ich charakteristiku, so zreteľom na veľkosť, tvar a hrúbku vystielajúceho epitelu. Rozlišovali sme ACF malé (1–3 krypty), stredné (4–6 krýpt) a veľké (7 a viac krýpt). Ďalšie histologické vyšetrenie bolo prevedené len u zvierat po 12 aplikáciach DMH (28-týždňový pokus) technikou parafínových rezov farbených hematoxylínom-eozínom. Hodnotili sme celkový počet nádorov, z toho podiel karcinómu in situ (CIS: nádorové ložiská charakteru vysokodiferencovaného adenokarcinómu rastúce exofyticky bez známkov prieniku cez lamina basalis) a infiltrujúceho karcinómu (ICA: s prienikom nádorových buniek cez lamina basalis so šírením do všetkých vrstiev steny čreva). Spracovanie materiálu na morфомetrické meranie: celý histologický objekt (nádor) sme narezali sériovými rezmi o známej hrúbke rezu (10 μ). Histomorfometrickým zariadením (IMPOR, systém digitalizácie obrazu a videoanalýzy, Quant, SR) sme zmerali plochu každého rezu, vynásobili ju hrúbkou rezu a vypočítali

objem pre celý histologický objekt. Výsledky sme štatisticky hodnotili jednofaktorovou analýzou rozptylu (Instat), neparametrickým Mann-Whitney testom (Instat) a Fisherovým exaktným dvojstranným testom (Epi Info).

Výsledky a diskusia

Finálne telesné hmotnosti zvierat v 8- i 28-týždňovom pokuse neboli diétou s extraktom bazy ovplyvnené. Hladina sérového cholesterolu bola už po 8 týždňoch cholesterolovej diéty viacnásobne zvýšená (oproti fyziologickým hodnotám) a ďalej sa zvyšovala s dĺžkou pokusu na viac ako dvojnásobok. K výraznej akumulácii cholesterolu došlo aj v pečeni a s dĺžkou pokusu sa zvyšovala aj koncentrácia triacylglycerolov v sére. Extrakt bazy neovplyvnil sérové hladiny cholesterolu ani triacylglycerolov, iba v 28-týždňovom pokuse došlo k poklesu obsahu cholesterolu v pečeni (tab. 1). Obdobne suplementácia kvercetínom u zdravých jedincov síce 23-násobne zvýšila jeho plazmatickú koncentráciu, ale neovplyvnila hladiny lipidov ani trombogénnych rizikových faktorov [15]. Naproti tomu podávanie zmesi citrusových bioflavonoidov inhibovalo kľúčový enzým biosyntézy cholesterolu, HMG-CoA reduktázu, znižovalo hladinu plazmatického cholesterolu i hodnoty aterogénneho indexu u potkana [16]. Citrusové polyfenoly viazané na vlákňinový skelet sú potenciálne zaujímavým produktom, ktorý by popri antioxidačnom efekte mohol priaznivo vstupovať aj do regulácie metabolizmu cholesterolu [17].

Peroxidácia lipidov, hodnotená z hladín primárnych produktov peroxidácie, konjugovaných diénov, v 28-týždňovom pokuse, zrejme pod vplyvom vyššieho počtu dávok DMH, bola vyššia v plazme a na dvojnásobok sa zvýšila v čreve (bez ohľadu na diétu). Je potrebné pripomenúť zistenie, že pre kolon špecifický karcinogén DMH generuje oxidačný stres v pečeni, ako aj v čreve, pretože sa v sérii oxidačných krokov za účasti enzýmov pečene a hrubého čreva aktivuje na elektrofilný karcinogén [18]. Extrakt bazy v 8-týždňovom pokuse znížil hladinu konjugovaných diénov v plazme na extrémne nízku hodnotu (tento efekt nemá paralelu v 28-týždňovom pokuse). Za veľmi významný pokladáme pokles peroxidácie v cieľovom orgáne, hrubom čreve, kde obsah konjugovaných diénov poklesol pod vplyvom extraktu bazy v oboch pokusoch o 40 % (tab. 2). Antokyány izolované z bazy znižovali in vitro Cu- a peroxyl-radikálmi indukovanú oxidáciu LDL [19]. Obdobne iné prírodné zdroje antokyánov inhibovali UV-indukovanú oxidáciu lipozómov [20].

Tabuľka 1. Vplyv extraktu bazy čiernej na hmotnosť a lipidy séra a pečene v 8- a 28-týždňovom pokuse.

Table 1. The effect of the black elder pomace extract on body weight and on serum and tissue lipids in 8 and 28 week experiments.

Parameter ¹		Diéta ²			
		kontrolná ³		s bazou ⁴	
		8-týždňový pokus ⁵		28-týždňový pokus ⁶	
n		12	14	9	10
Hmotnosť ⁷	[g]	373 ± 13	327 ± 10	498 ± 18 ^E	453 ± 20 ^E
Cholesterol ⁸					
sérum ⁹	[mmol.l ⁻¹]	4,8 ± 0,3	5,5 ± 0,4	11,2 ± 0,6 ^E	12,7 ± 2,1 ^E
pečeň ¹⁰	[mmol.kg ⁻¹]	398 ± 12	383 ± 15	414 ± 13	372 ± 7 ^c
Triacylglyceroly ¹¹					
sérum	[mmol.l ⁻¹]	0,37 ± 0,02	0,45 ± 0,04	0,75 ± 0,07 ^E	1,25 ± 0,34 ^E

Údaje sú priemery ± SEM (štandardná odchýlka aritmetického priemeru) pre n počet zvierat v skupine.

a, b, c, d, e - štatistická preukaznosť oproti kontrolnej skupine: a - p < 0,05, b - p < 0,02, c - p < 0,01, d - p < 0,002, e - p < 0,001.

E - štatistická preukaznosť oproti odpovedajúcej skupine z 8-týždňového pokusu, E - p < 0,001.

Values represent means ± SEM (standard error of the mean) for n animals per group.

a, b, c, d, e - statistical significance in comparison with control group: a - p < 0.05, b - p < 0.02, c - p < 0.01, d - p < 0.001.

E - statistical significance in comparison with the respective groups of the 8 weeks experiment, E - p < 0.001.

1 - parameter, 2 - diet, 3 - control diet, 4 - diet with the black elder pomace extract, 5 - 8 week experiment, 6 - 28 week experiment, 7 - body weight, 8 - cholesterol, 9 - serum, 10 - liver, 11 - triacylglycerols.

Relatívne málo informácií je známych o vplyve flavonoidov na aktivity antioxidantných enzýmov. V našom pokuse sme predovšetkým pozorovali výrazný (30–50 %) pokles aktivít SOD a KAT v pečeni pri vyššom počte dávok DMH, bez ohľadu na prítomnosť flavonoidov v diéte. Pri aplikácii DMH dochádzalo k znižovaniu aktivít antioxidantných enzýmov [21]. Pillai [22] zistil po DMH pokles aktivít SOD a KAT a naopak vzostup GSH v pečeni a kolone. Pod vplyvom extraktu bazy poklesli aktivity SOD, GSH-PX a GST v pečeni v dlhšom pokuse a SOD v čreve v kratšom pokuse (tab. 2). V daných podmienkach teda flavonoidy bazy čiernej aktivity enzýmov tzv. primárnej ochrany (ovplyvnenie iniciačnej rýchlosti oxidácie znížením koncentrácie ROS) buď neovplyvnili, alebo znížili. Pokles lipoperoxidácie

Tabuľka 2. Vplyv extraktu bazy čiernej na obsah konjugovaných diénov v plazme a orgánoch, aktivity antioxidantných enzýmov a obsah GSH v pečeni a čreve v 8- a 28-týždňovom pokuse.

Table 2. The effect of the black elder pomace extract on the contents of conjugated dienes in plasma and tissues, antioxidant enzymes activity and GSH content in liver and colon in 8 and 28 week experiments.

Parameter ¹			Diéta ²			
			kontrolná ³	s bazou ⁴	kontrolná	s bazou
			8-týždňový pokus ⁵		28-týždňový pokus ⁶	
n			12	14	9	10
Konjugované diény ^{7*}	plazma ⁸	[d ₂₃₃ .ml ⁻¹]	0,46 ± 0,07	0,05 ± 0,01 ^e	1,0 ± 0,8	2,59 ± 0,47 ^E
	pečeň ⁹	[d ₂₃₃ .g ⁻¹]	21,2 ± 1,4	21,5 ± 0,5	30,0 ± 1,3 ^E	24,1 ± 1,3 ^c
	črevo ¹⁰	[d ₂₃₃ .g ⁻¹]	6,26 ± 0,89	3,56 ± 0,27 ^c	12,74 ± 1,13 ^E	8,08 ± 0,59 ^{e,E}
SOD ^{**}	pečeň	[U.mg ⁻¹]	29,5 ± 1,6	34,5 ± 2,7	13,9 ± 1,5 ^E	8,7 ± 1,2 ^{e,E}
	črevo	[U.mg ⁻¹]	108,8 ± 7,4	41,7 ± 4,5 ^e	100,5 ± 3,1	106,9 ± 7,1 ^E
KAT ^{**}	pečeň	[U.mg ⁻¹]	26,7 ± 1,6	25,5 ± 1,0	18,2 ± 1,6 ^C	17,0 ± 1,3 ^E
	črevo	[U.mg ⁻¹]	0,043 ± 0,003	0,059 ± 0,006	0,56 ± 0,08 ^C	0,78 ± 0,16 ^E
GSH-PX ^{**}	pečeň	[U.mg ⁻¹]	0,059 ± 0,006	0,056 ± 0,005	0,060 ± 0,006	0,039 ± 0,004 ^a
	črevo	[U.mg ⁻¹]	0,059 ± 0,006	0,056 ± 0,006	0,019 ± 0,002 ^C	0,025 ± 0,004 ^E
GST ^{**}	pečeň	[U.mg ⁻¹]	0,22 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,40 ± 0,04 ^E	0,29 ± 0,02 ^{a,C}
	črevo	[U.mg ⁻¹]	0,037 ± 0,004	0,045 ± 0,002	0,058 ± 0,002 ^E	0,062 ± 0,004 ^e
GSH ^{***}	pečeň	[U.g ⁻¹]	2,76 ± 0,13	2,38 ± 0,19	2,79 ± 0,18	2,13 ± 0,11

Údaje sú priemery ± SEM pre n počet zvierat.

* - údaje sú vyjadrené v optickej denzite (d) na ml plazmy alebo g tkaniva, ** - údaje sú vyjadrené na mg proteínov, *** - údaje sú vyjadrené na g tkaniva.

a, b, c, d, e - štatistická preukaznosť oproti kontrolnej skupine ako v Tabuľke 1.

C, E - štatistická preukaznosť oproti odpovedajúcej skupine v 8-týždňovom pokuse: C - p < 0,01, E - p < 0,001.

SOD - superoxiddismutáza, KAT - kataláza, GSH-PX - glutatiónpoxidáza, GST - glutatión-S-transferáza, GSH - redukovaný glutatión.

Values are means ± SEM (standard error of the mean) for n animals per group.

* - values are expressed in optical density (d) per ml of plasma or g of tissue, ** - values are expressed per mg of protein, *** - values are expressed per g of tissue.

a, b, c, d, e - statistical significance in comparison with the control group as shown in the Table 1.

C, E - statistical significance in comparison with the respective groups of the 8 week experiment: C - p < 0.01, E - p < 0.001.

SOD - superoxidedismutase, KAT - catalase, GSH-PX - glutathioneperoxidase, GST - glutathione-S-transferase, GSH - reduced glutathione.

1 - parameter, 2 - diet, 3 - control, 4 - diet with the black elder pomace extract, 5 - 8 week experiment, 6 - 28 week experiment, 7 - conjugated dienes, 8 - plasma, 9 - liver, 10 - colon.

pod vplyvom bazového extraktu bol teda skôr sprostredkovaný antioxidačným efektom flavonoidov, prípadne v súhre s ďalšími fytochemikáliami prítomnými v extrakte. Obdobne sa zistilo, že flavonoidy myricetín, kvercetín a rutín neovplyvňovali aktivity SOD a GSH-PX v bunkových kultúrach pečene [23]. V súvislosti s rizikom karcinogenézy sa najčastejšie uvádza obranný efekt enzýmového systému naviazaného na najvýznamnejší neenzýmový intracelulárny antioxidant - GSH. GSH je substrátom GSH-PX, ktorá eliminuje toxické peroxidy a GST sprostredkuje konjugáciu s glutatiónom, čo je rozhodujúci krok v detoxifikácii elektrofilných dekompozičných produktov z reakcií ROS s lipidmi a DNA [24]. Zistilo sa, že intracelulárne koncentrácie antioxidačných enzýmov sú indikátormi vnímavosti bunky k oxidatívne poškodeniu a že zvýšené hladiny antioxidačných enzýmov korelovali so zníženou vnímavosťou k chemicky indukovanému bunkovému poškodeniu a karcinogéze [22].

V oboch pokusoch, kratšom i dlhšom, sme u všetkých zvierat pozorovali výskyt aberantných krypt, ktoré väčšina autorov pokladá za skutočné preneoplastické lézie [25]. Ich počet bol bez ohľadu na prítomnosť extraktu bazy v diéte viaczásobne vyšší v dlhšom pokuse s vyšším počtom dávok DMH. V kratšom pokuse bolo badať pod vplyvom bazového extraktu len tendenciu k nižším hodnotám stredných a veľkých ACF. V dlhšom pokuse počet ACF v uvedených kategóriách, ako aj ich celkový zistený počet, signifikantne poklesol. Tento jednoznačne pozitívny efekt nemal odozvu v rozvoji nádorov, ktorých incidencia (CIS-karcinóm in situ) i objem (CIS i ICA-infiltrujúci karcinóm) boli pod vplyvom extraktu nižšie, ale rozdiel nebol signifikantný (tab. 3).

Potenciálny protektívny efekt bioflavonoidov v karcinogéze (ale aj v aterogéze) je sprostredkovaný antioxidačnou kapacitou širokej škály ROS: sú skavengermi peroxylových i hydroxylových radikálov vrátane peroxidu vodíka, zneškodňujú superoxid, sú chelátormi kovových iónov, čím brzdia vznik voľného hydroxylového radikálu, bránia tvorbe singletového kyslíka a znižujú H₂O₂-indukované poškodenia DNA [23,26]. Zistila sa ich schopnosť spomaľovať rast buniek kolorektálneho karcinómu, indukovať apoptózu a antiproliferačnú aktivitu [27,28]. Väčšina štúdií in vitro na bunkových kultúrach či zvieracích modeloch indikovala u niektorých flavonoidov inhibičný vplyv na viaceré kľúčové mechanizmy karcinogenézy. Protektívny efekt flavonoidov v karcinogéze u človeka však doteraz nebol jednoznačne potvrdený v epidemiologických štúdiách. Vyplýva to z dánskej štúdie, kde sa nepotvrdil protektívny efekt flavonoidov s najvyšším zastúpením v potrave (kvercetín, myricetín, kampeferol a luteolín) [29]. K obdobným záverom prišli autori zaoberajúci sa vplyvom polyfenolov čaju [30]

TABUĽKA 3. Vplyv extraktu bazy na výskyt a charakter fokusov aberantných krýpt a nádorov na hrubom čreve u potkana.

TABLE 3. The effect of the black elder pomace extract on incidence and character of aberrant crypt foci and tumors in rat colon in 8 and 28 week experiments.

Parameter ¹	Diéta ²			
	kontrolná ³	s bazou ⁴	kontrolná	s bazou
	8-týždňový pokus ⁵		28-týždňový pokus ⁶	
n	12	14	9	10
Fokusy aberantných krýpt ⁷				
malé ⁸	35,3 ± 5,3	34,7 ± 4,4	116 ± 4 ^E	108 ± 11 ^E
stredné ⁹	3,6 ± 1,2	1,2 ± 0,3	21,6 ± 1,9 ^E	9,4 ± 2,7 ^{c,C}
veľké ¹⁰	0,50 ± 0,19	0,3 ± 0,10	3,6 ± 1,10 ^A	0,8 ± 0,41 ^a
Spolu ¹¹	39,4 ± 5,9	36,2 ± 4,7	141 ± 5 ^E	118 ± 11 ^{e,E}
Nádory ¹²				
CIS*	0	0	7/78	5/56
objem ¹³ [mm ³]	-	-	569 ± 434	184 ± 120
ICA *	0	0	5/56	5/56
objem [mm ³]	-	-	15,44 ± 9,69	5,44 ± 3,63
Nádory spolu* ¹⁴	0	0	8/89	8/89
počet ¹⁵	0	0	1,78 ± 0,32	1,78 ± 0,46
objem [mm ³]	-	-	585 ± 433	190 ± 119

Údaje sú priemery ± SEM pre n počet zvierat.

* - údaje sú: počet zvierat s patologickým nálezom / podiel z celkového počtu zvierat v skupine [%].

CIS - karcinóm in situ, ICA - infiltrujúci karcinóm.

a, b, c, d, e - štatistická preukaznosť oproti kontrolnej skupine ako v Tabuľke 1.

A, C, E - štatistická preukaznosť oproti odpovedajúcej skupine v 8-týždňovom pokuse: A - p < 0,05, C - p < 0,01, E - p < 0,001.

Values are means ± SEM (standard error of the mean) for n animals per group.

* - values are: number of animals with pathological findings / portion of animals with pathological findings from total number of animals per group [%].

CIS - carcinoma in situ, ICA - infiltrated carcinoma.

a, b, c, d, e - statistical significance in comparison with the control group as shown in Table 1.

A, C, E - statistical significance in comparison with the respective groups of the 8 week experiment: A - p < 0.05, C - p < 0.01, E - p < 0.001.

1 - parameter, 2 - diet, 3 - control, 4 - diet with the black elder pomace extract, 5 - 8 week experiment, 6 - 28 week experiment, 7 - aberrant crypt foci, 8 - small, 9 - median, 10 - large, 11 - total, 12 - tumours, 13 - volume, 14 - total tumours, 15 - number.

i metaanalýza výsledkov epidemiologických štúdií, ktorá indikovala protektívny vplyv karotenoidov, ale nie flavonoidov [31]. Podľa mienky viacerých autorov je úloha flavonoidov v prevencii aterogenézy a karcinogenézy veľmi sľubná. Sú však nevyhnutné ďalšie experimentálne a klinické štúdie a predovšetkým intervenčné epidemiologické štúdie na plné zhodnotenie významu flavonoidov pre ľudské zdravie.

Literatúra

1. UEMURA, K. - PISA, Z.: Recent trends in cardiovascular disease mortality in 27 industrial countries. *World Health Statistics*, 38, 1985, s. 143-162.
2. WINGO, P. A. - TONG, T. - BOLDEN, S.: Cancer statistics, 1995. *Cancer*, 45, 1995, s. 9-30.
3. STEINBERG, D. - PARTHASARATHI, S. - CAREW, T. E.: Mechanism of disease. Beyond cholesterol (modification of low-density lipoprotein that induces atherogenicity). *New England Journal of Medicine*, 320, 1989, s. 915-924.
4. DREHER, D. - JUNOD, A. F.: Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer*, 324, 1996, s. 30-38.
5. MAYNE, S. T.: Antioxidant nutrients and cancer incidence and mortality: An epidemiologic perspectives. *Advances in Pharmacology*, 38, 1997, s. 657-675.
6. LAMPE, J. W.: Health effects of vegetables and fruits: assessing mechanism of action in human experimental studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (Suppl.), 1999, s. 475S-490S.
7. ŠILHÁR, S. - KINTLEROVÁ, A. - POLÍVKA, L. - KOVÁČ, M.: Koncentrát antokyanínových farbív z výliskov plodov bazy čiernej. Prihláška užitkového vzoru, PUV 32-98. Výskumný ústav potravinársky, Bratislava. Slovenská republika. 10. 6. 1998.
8. YAMASHITA, S. - YAMASHITA, K. - YASUDA, H.: High-fibre diet in the control of diabetes in rats. *Endocrinology of Japan*, 27, 1980, s. 169-173.
9. RECKNAGEL, R. - GLENDE, E. A.: Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. In: COLOWICK, S. R. - KAPLAN, N. O. (Ed.): *Methods in enzymology*. San Diego : Academic Press, 1984, s. 331-337.
10. CAVARACHI, N. C. - ENGLAND, N. D. - O'BRIEN, J. F.: Superoxide generation during cardiopulmonary bypass - is there a role for vitamin E. *Journal of Surgery Research*, 40, 1986, s. 519-527.
11. PAGLIA, D. E. - VALENTINE, W. N.: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 1978, s. 158-169.
12. HABIG, W. H. - PABST, M. J. - JAKOBY, W. S.: Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 1974, s. 7130-7139.
13. BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 1976, s. 248-254.
14. BEUTLER, E. - DURON, O. - KELLEY, M.: Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61, 1963, s. 882-890.
15. CONQUER, J. A. - MAIANI, G. - AZZINI, E. - RAGUZINI, A. - HOLUB, J.: Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect

- on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *Journal of Nutrition*, 128, 1998, s. 593-597.
16. BOK, S. H. - LEE, S. H. - PARK, Y. B. - BAE, K. H. - SON, K. H. - JEONG, T. S. - CHOI, M. S.: Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and Acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *Journal of Nutrition*, 129, 1999, s. 1192-1185.
 17. SAURACALIXTO, F.: Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1998, s. 4303-4306.
 18. GOLDIN, B. R.: Chemical induction of colon tumors in animals: an overview. In: *Basic and clinical perspectives of colorectal polyps and cancer*. New York : Alan R. Liss, Inc., 1988, s. 319-333.
 19. ABUJA, P. M. - MURKOVIC, M. - PFANNHAUSER, W.: Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1998, s. 4091-4096.
 20. GABRIELSKA, J. - OSZMIANSKI, J. - KOMOROWSKA, M. - LASINGNER, M.: Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effect. *Zeitschrift für Naturforschung C - Journal of Biosciences*, 54, 1999, s. 319-324.
 21. SUN, Y.: Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 8, 1990, s. 583-599.
 22. PILLAI, M. G. - THAMPI, B. S. H. - MENON, V. P. - LEELAMMA, S.: Influence of dietary fiber from coconut kernel (*Cocos nucifera*) on the 1,2-dimethylhydrazine induced lipid peroxidation in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 1999, s. 555-560.
 23. AHERNE, S. - OBRIEN, N. M.: Protection by the flavonoids myricetin, quercetin and rutin against hydrogen peroxide induced DNA damage in Caco-2 and Fep G2 cells. *Nutrition and Cancer - An International Journal*, 34, 1999, s. 160-166.
 24. KETTERER, B.: Glutathione-S-transferases and prevention of free radical damage. *Free Radical Research*, 28, 1998, s. 647-658.
 25. BIRD, R. P.: Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters*, 93, 1995, s. 55-71.
 26. CATAPANO, A. L.: Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology*, 48, 1997, s. 39-44.
 27. KAMEI, H. - KOJIMA, T. - HASEGAWA, M. - KOIDE, T. - UMEDA, T. - YUKAWA, T. - TERABE, K.: Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigation*, 13, 1995, s. 590-594.
 28. KUNTZ, S. - WENZEL, U. - DANIEL, H.: Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition*, 38, 1999, s. 133-142.
 29. GOLDBOHRM, R. A. - HERTOOG, M. G. L. - BRANTS, H. A. M. - VASNOPPEL, G. - VANDENBRANDT, P. A.: Intake of flavonoids and cancer risk: a prospective cohort study. In: *ARMANDO, R. - ANDERSON, H. - BARDÓCZ, S. - SERA, F. (Ed.): Polyphenols in food. First workshop, Aberdeen, Scotland, 1997*. Luxemburg : Office for Official Publications of the European Communities, 1998, s. 159-166.
 30. YANG, CH. S. - LEE, M.J. - CHEN, L. - YANG, G.: Polyphenols as inhibitors of carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 105, 1997, s. 971-976.
 31. DRAGSTED, L. O. - STRUBE, M. - LETH, T.: Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer? *European Journal of Cancer Prevention*, 6, 1997, s. 522-528.

Do redakcie došlo 29.12.1999.

**Influence of the black elder (*Sambucus nigra*) pomace extract
on hypercholesterolemia, lipoperoxidation and carcinogenesis of rat colon**

BOBEK, P. - GALBAVÝ, Š. - MÁRIÁSSYOVÁ, M.: Bull. potrav. Výsk., 39, 2000, p. 149-159.

SUMMARY. The influence of the diet supplemented by 4 % of the extract from black elder (*Sambucus nigra*) pomace on the colon carcinogenesis induced by dimethylhydrazine (DMH) was examined in just weaned male Wistar rats fed diet containing 0.3 % cholesterol. DMH was administered subcutaneously once a week at a dose of 20 mg.kg⁻¹ either three times (8 week experiment) or twelve times (28 week experiment). At the end of the experiments, the animals were sacrificed after a 18-h food removal by decapitation at a light ether anesthesia. The extract of black elder did not influence hypercholesterolemia either in the shorter or in the longer experiment. In the longer one, a decrease in the cholesterol content in liver and, oppositely, an increase in the serum triacylglycerol level was observed. In both experiments, the diet supplemented with the black elder extract lowered the content of conjugated dienes in colon by as much as 40 % and, in the longer one, the content of conjugated dienes significantly decreased also in liver. In the longer experiment, the diet supplemented with black elder extract decreased the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione transferase in liver. In the longer experiment, the diet supplemented with the black elder extract lowered the number of moderate and large aberrant crypts foci by 54–80 % and their total number by 16 %. The black elder extract-induced decrease in the incidence and volume of tumors was not significant because of a great variance of the data.

Keywords: black elder pomace extract; hypercholesterolemia; antioxidant enzymes; carcinogenesis; colon