

## **Wpływ hesperydyny na rozwój stresu oksydacyjnego w sercu szczurów z cukrzycą typu 1**

### **Effect of hesperidin on the development of oxidative stress in the heart of type 1 diabetic rats**

Piotr Bramora, Maria Zych, Weronika Borymska,  
Ilona Kaczmarczyk-Żebrowska

Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, e-mail: d200746@365.sum.edu.pl

---

**Słowa kluczowe:** cukrzyca typu 1, hesperydyna, stres oksydacyjny, serce

**Keywords:** type 1 diabetes, hesperidin, oxidative stress, heart

---

### **Streszczenie**

W przebiegu cukrzycy obserwuje się hiperglikemię, która jest jedną z przyczyn rozwoju stresu oksydacyjnego uszkadzającego różne tkanki i narządy organizmu, w tym serce. Suplementacja związków pochodzenia roślinnego o właściwościach antyoksydacyjnych może być skuteczną metodą zapobiegania powstawaniu stresu oksydacyjnego. W niniejszym badaniu określono rolę flawonoidu hesperydyny na parametry stresu oksydacyjnego w tkance serca w przebiegu cukrzycy typu 1. W tym celu hesperydynę w dawkach 50 i 100 mg/kg podawano *per os* przez 28 dni samcom szczurów szczepu Wistar, u których wywołano cukrzycę poprzez wstrzyknięcie dootrzewnowe streptozotocyny. U gryzoni z cukrzycą wykazano wzrost aktywności katalazy, peroksydazy glutationowej oraz zawartości aldehydu dimalonowego w sercu. Zastosowanie hesperydyny w obu dawkach spowodowało spadek aktywności dysmutazy nadadtlenkowej, zmniejszenie zawartości aldehydu dimalonowego, natomiast efektem wyższej dawki flawonoidu było także obniżenie całkowitego statusu oksydacyjnego połączone ze wzrostem całkowitej odpowiedzi antyoksydacyjnej. Można stwierdzić, że hesperydyna łagodzi zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej w tkance serca w przebiegu cukrzycy typu 1.

### **Summary**

In the course of diabetes, hyperglycemia is observed, which is one of the reasons for the development of oxidative stress that damages various tissues and organs of the body, including the heart. Supplementation of plant-derived compounds with

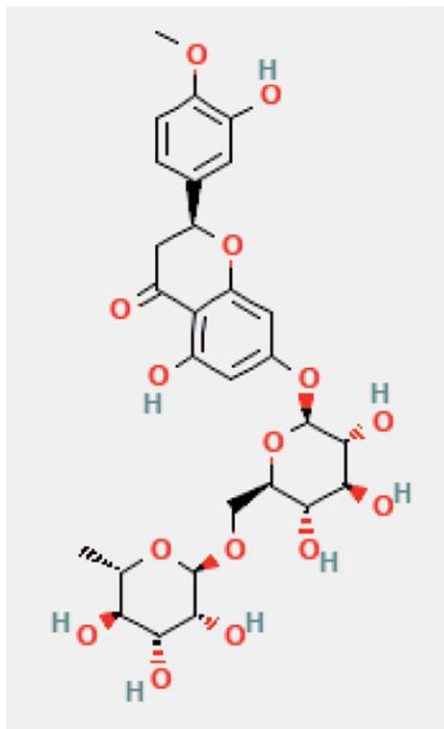
antioxidant properties can be an effective method of preventing oxidative stress. In this study, the effect of the flavonoid hesperidin on the oxidative stress parameters in the heart tissue in the course of type 1 diabetes was determined. For this purpose, hesperidin at the doses of 50 and 100 mg/kg was administered *per os* for 28 days to male Wistar rats, in which diabetes was induced by an intraperitoneal injection streptozotocin. Diabetic rodents showed an increase in the catalase, glutathione peroxidase activities and dimalonialdehyde content in the hearts. The use of hesperidin at both doses resulted in a decrease in the activity of superoxide dismutase, a decrease in the content of dimalonialdehyde, while the higher dose of this flavonoid also resulted in a decrease in the total oxidative status combined with an increase in the total antioxidant response. It can be concluded that hesperidin alleviates redox imbalances in heart tissue in the course of type 1 diabetes.

## Wstęp

Według danych udostępnionych przez International Diabetes Federation (pol. Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna) na cukrzycę (łac. *diabetes mellitus*) zachoruje 67 mln Europejczyków w 2030 r., zaś w ciągu kolejnych 15 lat prognozowane jest 69 mln nowych przypadków zachorowań. W tym czasie prawdopodobnie około 36% diabetyków nie będzie świadomych, że cierpi na cukrzycę. Na podstawie dostępnych danych epidemiologicznych można stwierdzić, że cukrzyca staje się coraz bardziej powszechną chorobą metaboliczną o ogromnych konsekwencjach społecznych, zdrowotnych oraz ekonomicznych [1]. Warto zauważyć, że cukrzyca nie jest schorzeniem jednorodnym. Pod tym terminem kryje się wiele wariantów tej choroby, w których dominuje typ 1 i 2. Cukrzyca charakteryzuje się przewlekłą hiperglikemią, która wynika z deficytu insuliny, insulinooporności tkanek bądź insulinoopenii połączonej z obniżoną wrażliwością tkanek organizmu na insulinę [2]. Powoduje u pacjentów liczne powikłania sercowo-naczyniowe, w tym niewydolność serca, niezależnie od makronaczyniowych powikłań, takich jak nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa oraz miażdżycy [3]. Coraz większa liczba przeprowadzanych eksperymentów sugeruje, że w przebiegu cukrzycy dochodzi do nadprodukcji wolnych rodników w sercu, przy jednoczesnym upośledzeniu endogennych mechanizmów obronnych [4–6]. Obecnie brakuje skutecznych terapii, które można wdrożyć w początkowej fazie cukrzycy, aby zmniejszyć ryzyko wystąpienia powikłań narządowych [7, 8].

Z tego powodu przeprowadza się wiele badań eksperymentalnych dotyczących nowych metod zapobiegania i leczenia komplikacji cukrzycowych, w których także bada się niektóre związki pochodzenia roślinnego posiadające właściwości antyoksydacyjne [9].





**Rysunek 1.** Wzór strukturalny hesperydydy.

**Figure 1.** Structural formula of hesperidin.

Źródło: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10621>.

Hesperydyna jest związkiem chemicznym zaliczanym do flawonoidów. Znajduje się przede wszystkim w skórce owoców cytrusowych, a zwłaszcza pomarańczy gorzkiej (*Citrus aurantium*), pomarańczy Hassaku (*Citrus hassaku*) i mandarynki Satsuma (*Citrus unshiu*) [10]. Obecne wyniki badań wskazują, że hesperydyna może mieć korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy [11–15]. W modelu niedokrwiennego uszkodzenia reperfuzyjnego hesperydyna hamowała generowanie wolnych rodników, wzmacniała endogenne mechanizmy obrony antyoksydacyjnej oraz zapobiegała zmianom patologicznym w cytoarchitektonice tkanki serca [11]. Zaś u szczurów z kardiotoxycnością wywołaną jednocześnie przez streptozotocynę i izoproterenol zaobserwowano wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz zwiększone stężenia białek PPAR i Bcl-2 połączone ze spadkiem stężenia Bax po podaniu niniejszego związku [12]. Udokumentowano, że wysokie dawki hesperydydy (200 mg/kg, *per os*) mają działanie hipotensyjne u szczurów z samoistnym nadciśnieniem tętniczym [13–15]. Doniesiono także, że hesperetyna (aglikon hesperydydy) pozytywnie wpływa na układ naczyniowy [16], hamuje agregację płytek krwi indukowaną kwasem arachidonowym [17] oraz działa kardioprotekcyjnie [18, 19].

Hesperydyna chroni przed stresem oksydacyjnym, hamuje proces apoptozy poprzez ochronę mitochondriów, a także działa hipoglikemizująco oraz hipolipemizująco w cukrzycy typu 1 [10, 15, 20]. Na podstawie dostępnej literatury można stwierdzić również, że powyższy związek wykazuje działanie przeciwdepresyjne, przeciwzapalne oraz mukoprotekcyjne [10, 15]. Ma szeroko pojęte właściwości przeciwtoksyczne, włączając w to działanie hepatoprotekcyjne i nefroprotekcyjne [15].

W niniejszym eksperymencie określono rolę hesperydyny w rozwoju stresu oksydacyjnego w sercu szczurów szczepu Wistar z wywołaną cukrzycą typu 1. W tym celu oznaczono poziom markerów stresu oksydacyjnego oraz określono wydolność systemu antyoksydacyjnego. Ponadto oszacowano stres oksydacyjny w sercu poprzez zbadanie całkowitego stanu oksydacyjnego wraz z całkowitą odpowiedzią antyoksydacyjną.

## **Materiał i metody**

### **Zwierzęta laboratoryjne**

Dokonano tygodniowej aklimatyzacji 3-miesięcznych samców szczurów szczepu Wistar w docelowym pomieszczeniu, gdzie panowała stała temperatura otoczenia, wynosząca  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  oraz 12-godzinny cykl światło/ciemność. Zwierzęta otrzymywały standardową karmę hodowlaną (Labofeed B, Wytwórnia Pasz „Morawski”, Kcynia) i wodę *ad libitum*. Projekt eksperymentu został zatwierdzony przez Lokalną Komisję Etyczną działającą przy Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach (zgoda nr 36/2015). Szczury zostały kupione w Centrum Medycyny Doświadczalnej SUM w Katowicach.

### **Wywołanie cukrzycy typu 1**

W niniejszym badaniu wykorzystano model cukrzycy typu 1, który jest dobrze scharakteryzowany w dostępnej literaturze [21–23]. W tym celu podano jednorazowy, dootrzewnowy zastrzyk zawierający streptozotocynę (STZ) rozpuszczoną w buforze cytrynianowym (0,1 M, pH 4,5) w dawce 60 mg/kg. Stężenie glukozy we krwi oznaczono za pomocą glukometru (MicroDot, Glukopharma) po upływie 2 tygodni po iniekcji STZ. Gryzonie umieszczano w przygotowanym poskromie. Następnie pobierano krew z końcówki ogona. Jeżeli wartości pomiarów stężenia glukozy przekraczały 200 mg/dl, to uznawano, że u szczurów wystąpiła cukrzyca i kwalifikowano je do dalszej części doświadczenia [21, 22].

### **Projekt eksperymentu**

Zwierzęta laboratoryjne były podzielone na 4 grupy:

- grupa I (K): zdrowe szczury otrzymujące wodę,



- grupa II (DM): szczury z cukrzycą typu 1 otrzymujące wodę,
- grupa III (DM+Hes50): szczury z cukrzycą typu 1 otrzymujące hesperydynę w dawce 50 mg/kg *per os*,
- grupa IV (DM+Hes100): szczury z cukrzycą typu 1 otrzymujące hesperydynę w dawce 100 mg/kg *per os*.

Na koniec eksperymentu liczba szczurów wynosiła odpowiednio: n + 9 dla grupy C, n + 8 dla grupy DM, n + 9 dla grupy DM+Hes50, n + 8 dla grupy DM+Hes100. Woda oraz hesperydyna w obydwu dawkach były podawane przy użyciu zgłębnika żołądkowego codziennie przez okres 4 tygodni. Po upływie 28 dni dokonano eutanazji szczurów w znieczuleniu ogólnym.

Do tego celu zastosowano mieszaninę 2 związków wykorzystywanych w anestezji: ketaminę (Ketamina 10%, Biowet Puławy, Puławy) oraz ksylazynę (Xylapan, Vetoquinol Biowet, Gorzów Wlkp.) w dawkach 87,5 i 12,5 mg/kg. Gdy zwierzęta zostały uśpione, pobrano krew przez nakłucie serca, a następnie przystąpiono do pobrania serc oraz określenia ich wagi.

#### **Uzyskiwanie homogenatów serca do analizy biochemicznej**

Pobierano fragmenty serca, które homogenizowano w 10 mM buforze PBS w celu uzyskania 10% (obj./wag.) homogenatów. Uzyskane homogenaty wirowano w wirowce MPW-352R (10 000 × g, 4°C, 15 min). Supernatanty zabezpieczono do oznaczeń biochemicznych poprzez natychmiastowe zamrożenie.

#### **Analiza biochemiczna**

Do pomiarów wykorzystano czytnik mikropłytek Tecan Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd., Männedorf, Szwajcaria) z oprogramowaniem Magellan 7.2.

#### **Pomiar stężenia białka w homogenatach serca**

Stężenie białka oznaczono metodą opisaną przez O.H. Lowry'ego i wsp. [24]. Pomiar został wykonany w celu standaryzacji otrzymanych wartości aktywności enzymów antyoksydacyjnych i zawartości zaawansowanych produktów utleniania białek (AOPP).

#### **Pomiar aktywności enzymów antyoksydacyjnych**

Do oceny aktywności enzymatycznej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) oraz peroksydazy glutationowej (GPx) zastosowano komercyjne zestawy odczynnikowe produkowane przez firmę Cayman (Cayman Chemicals, AnnArbor, MI, USA).

Wpływ hesperydyny na rozwój stresu oksydacyjnego w sercu szczurów...

**Oznaczenie markerów uszkodzeń oksydacyjnych: dialdehydu malonowego (MDA), AOPP oraz stężenia witaminy C**

MDA, AOPP określono zgodnie z metodami opracowanymi przez J.A. Buege i wsp. [25], V. Witko-Sarsat i wsp. [26], zaś witaminę C oznaczono, wykorzystując do tego protokół przedstawiony przez S.K. Jagotę i wsp. [27].

**Ocena zawartości glutationu**

Zawartość glutationu całkowitego (tGSH), utlenionego (GSSG) oraz zredukowanego (GSH) w sercu zbadano za pomocą komercyjnego zestawu odczynnikowego Cayman (Cayman Chemicals, AnnArbor, MI, USA).

**Oszacowanie stresu oksydacyjnego poprzez zbadanie całkowitego statusu oksydacyjnego (TOS) wraz z całkowitą odpowiedzią antyoksydacyjną (TAR)**

Wartości TAR i TOS w tkance serca zostały określone zgodnie z metodami przedstawionymi przez O. Erela [28, 29].

**Analiza statystyczna**

Uzyskane wartości parametrów przedstawiono jako średnią  $\pm$  błąd standardowy średniej (SEM). W analizie statystycznej wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA), a następnie test post-hoc NIR. Wyniki uznawano za istotne, w przypadku gdy wartość  $p < 0,05$ . Do obliczeń wykorzystano program komputerowy Statistica 13.3 software (TIBCO Software Inc.). Przedstawione wyniki są częścią dużego projektu badawczego, dlatego uzyskane wartości dla grupy C i DM są takie same jak w opublikowanym wcześniej artykule [30].

## Wyniki

**Wpływ hesperydyny na aktywność enzymów antyoksydacyjnych**

Aktywność SOD w sercu szczurów kontrolnych (grupa K) wynosiła  $3,99 \pm 0,49$  U/mg białka. U szczurów z cukrzycą (grupa DM) aktywność SOD w badanym narządzie nie była istotnie różna w porównaniu do wartości zaobserwowanej w grupie K. Aktywność SOD w sercu szczurów otrzymujących hesperydynę w dawce 50 mg/kg (DM+Hes50) i w dawce 100 mg/kg (DM+Hes100) była istotnie mniejsza ( $p < 0,05$ ) w odniesieniu do aktywności tego enzymu zaobserwowanej w grupie DM. W sercu szczurów z grupy K aktywność CAT wynosiła  $8,71 \pm 1,20$  nmol/min/mg białka. Aktywność CAT odnotowana w sercu szczurów z grupy DM w porównaniu do grupy K była istotnie większa ( $p < 0,01$ ). U szczurów z grup DM+Hes50 i DM+Hes100 aktywność CAT w badanym narządzie nie uległa zmianie w porównaniu



do aktywności katalazy obserwowanej w sercu szczurów z grupy DM. U szczurów z grupy K aktywność GPx w sercu wynosiła  $127,55 \pm 6,44$  nmol/min/mg białka. Aktywność GPx zmierzona w sercu szczurów w grupie DM w porównaniu do grupy K była istotnie większa ( $p < 0,01$ ). Aktywność GPx w sercu u szczurów z grup DM+Hes50 i DM+Hes100 nie uległa zmianie w porównaniu do aktywności GPx w sercu szczurów z grupy DM.

**Tabela 1.** Wpływ hesperydyny na aktywność enzymów antyoksydacyjnych SOD, CAT i GPx w sercu szczurów z cukrzycą typu 1.

**Table 1.** Effect of hesperidin on the activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx in the heart of rats with type 1 diabetes.

Rodzaj parametru	K	DM	DM+Hes50	DM+Hes100
SOD (U/mg białka)	$3,99 \pm 0,49$	$4,90 \pm 0,36$	$3,49 \pm 0,36\#$	$3,37 \pm 0,39\#$
CAT (nmol/min/mg białka)	$8,71 \pm 1,20$	$25,75 \pm 5,71^{**}$	$24,55 \pm 3,07^{**}$	$20,90 \pm 3,40^*$
GPx (nmol/min/mg białka)	$127,55 \pm 6,44$	$161,25 \pm 9,13^{**}$	$149,98 \pm 9,42$	$159,79 \pm 9,53^*$

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM.

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$  – statystycznie istotne różnice w odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów kontrolnych (grupa K)

#  $p < 0,05$  – statystycznie istotne różnice w odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów z cukrzycą (grupa DM)

Źródło: badanie własne.

### Wpływ hesperydyny na zawartość tGSH, GSH i GSSG i współczynnik GSH/GSSG

Zawartość tGSH w sercu szczurów z grupy K wynosiła  $223,10 \pm 6,77$   $\mu$ M/g tkanki. Zawartość tGSH w grupie DM w porównaniu do grupy K nie uległa zmianie w badanym narządzie. U szczurów z grup DM+Hes50 i DM+Hes100 zawartość tGSH nie różniła się istotnie od wyniku uzyskanego u szczurów z grupy DM.

W grupie K zawartość GSH w sercu wynosiła  $112,32 \pm 4,56$   $\mu$ M/g tkanki. U szczurów z grupy DM zawartość GSH w sercu nie różniła się w stosunku do grupy K. Zawartość GSH w sercu szczurów z grup DM+Hes50 i DM+Hes100 nie uległa zmianie w porównaniu do wartości uzyskanych dla szczurów z grupy DM.

W sercu szczurów z grupy K zawartość GSSG wynosiła  $110,78 \pm 2,79$   $\mu$ M/g tkanki. U szczurów z grupy DM zawartość GSSG w analizowanym narządzie nie różniła się istotnie statystycznie od wyniku uzyskanego w grupie K. U szczurów z grup DM+Hes50 i DM+Hes100 zawartość GSSG w sercu nie uległa zmianie w porównaniu do szczurów z grupy DM.

## Wpływ hesperydyny na rozwój stresu oksydacyjnego w sercu szczurów...

W sercu szczurów z grupy K współczynnik GSH/GSSG wynosił  $1,014 \pm 0,029$ . Współczynnik GSH/GSSG wyliczony dla serc szczurów z grupy DM był podobny do wyniku otrzymanego dla grupy K. U szczurów z grup DM+Hes50 i DM+Hes100 współczynnik GSH/GSSG w sercu nie uległ zmianie w porównaniu do wartości otrzymanej u szczurów z grupy DM.

**Tabela 2.** Wpływ hesperydyny na stężenie tGSH, GSH i GSSG oraz na współczynnik GSH/GSSG w sercu szczurów z cukrzycą typu 1.

**Table 2.** Effect of hesperidin on the concentration of tGSH, GSH and GSSG and on the GSH/GSSG ratio in the heart of rats with type 1 diabetes.

Rodzaj parametru	K	DM	DM+Hes50	DM+Hes100
tGSH ( $\mu\text{M/g}$ tkanki serca)	$223,10 \pm 6,77$	$210,88 \pm 29,01$	$252,45 \pm 4,35$	$237,27 \pm 6,18$
GSH ( $\mu\text{M/g}$ tkanki serca)	$112,32 \pm 4,56$	$120,41 \pm 7,87$	$126,21 \pm 3,42$	$125,55 \pm 2,36$
GSSG ( $\mu\text{M/g}$ tkanki serca)	$110,78 \pm 2,79$	$116,65 \pm 2,78$	$119,67 \pm 1,66^*$	$117,95 \pm 1,34^*$
GSH/GSSG	$1,014 \pm 0,029$	$1,015 \pm 0,050$	$1,054 \pm 1,66$	$1,071 \pm 0,021$

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM.

\* $p < 0,05$  – statystycznie istotne różnice w odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów kontrolnych (grupa K)

Źródło: badanie własne.

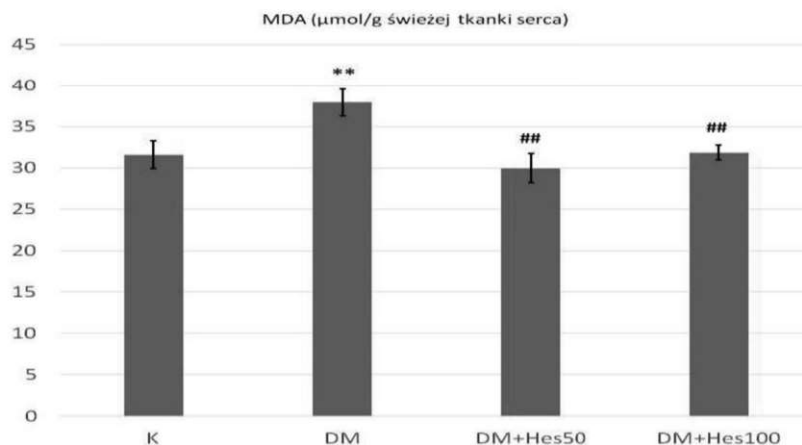
## Wpływ hesperydyny na zawartość MDA, AOPP i witaminy C

Zawartość MDA w sercu szczurów z grupy K wynosiła  $31,60 \pm 1,67 \mu\text{mol/g}$  tkanki. Zawartość MDA w sercu w grupie DM w porównaniu do grupy K była istotnie większa ( $p < 0,01$ ). Zawartość MDA w sercu szczurów z grup DM+Hes50 oraz DM+Hes100 była istotnie mniejsza ( $p < 0,01$ ) w odniesieniu do grupy DM.

U szczurów z grupy K zawartość AOPP w sercu wynosiła  $1,80 \pm 0,08 \text{ nmol/mg}$  białka. W sercu szczurów z grupy DM zawartość AOPP nie różniła się w porównaniu do wartości odnotowanej w grupie K. Zawartość AOPP w sercu szczurów z grup DM+Hes50 i DM+Hes100 nie była istotnie różna od wyników uzyskanych u szczurów z grupy DM.

W sercu szczurów z grupy K zawartość witaminy C wynosiła  $1,998 \pm 0,110 \text{ nmol/mg}$  białka. W grupie DM zawartość witaminy C w badanym narządzie nie różniła się istotnie w porównaniu do grupy K. Zawartość witaminy C w sercu szczurów z grup DM+Hes50 i DM+Hes100 nie uległa zmianie w odniesieniu do wartości odnotowanej dla tego parametru w grupie szczurów DM.





**Wykres 1.** Wpływ hesperydyny na stężenie MDA w sercu szczurów z cukrzycą typu 1.

**Figure 1.** Effect of hesperidin on MDA concentration in the heart of rats with type 1 diabetes.

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM.

\*\* $p < 0,01$  – statystycznie istotne różnice w odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów kontrolnych (grupa K)

## $p < 0,01$  – statystycznie istotne różnice w odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów z cukrzycą (grupa DM)

Źródło: badanie własne.

**Tabela 3.** Wpływ hesperydyny na stężenie AOPP i witaminy C w sercu szczurów z cukrzycą typu 1.

**Table 3.** Effect of hesperidin on the concentration of AOPP and vitamin C in the heart of rats with type 1 diabetes.

Rodzaj parametru	K	DM	DM+Hes50	DM+Hes100
AOPP (nmol/mg białka)	1,80 $\pm$ 0,08	2,30 $\pm$ 0,10	1,99 $\pm$ 0,19	1,83 $\pm$ 0,17
Witamina C ( $\mu$ g/g tkanki serca)	1,998 $\pm$ 0,110	1,867 $\pm$ 0,125	2,000 $\pm$ 0,120	2,050 $\pm$ 0,130

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM.

Źródło: badanie własne.

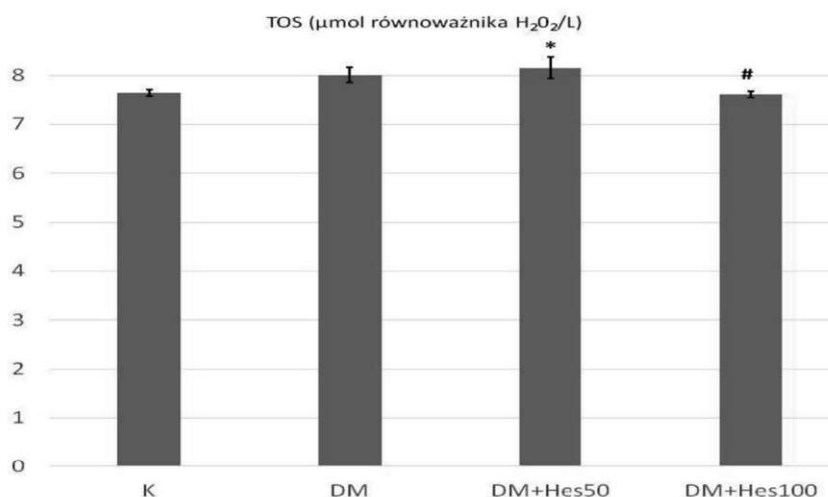
### Wpływ hesperydyny na wartość TOS i TAR

Dla serca szczurów z grupy K wartość TOS wynosiła  $7,64 \pm 0,07$   $\mu$ mol równoważnika  $H_2O_2/L$ . U szczurów z grupy DM wartość TOS w sercu była podobna do wartości zmierzonej w sercu szczurów z grupy K. Wartość TOS wyznaczona dla serca szczurów z grupy DM+Hes100 była istotnie mniejsza ( $p < 0,05$ ) w odniesieniu do grupy DM. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w wartościach TOS pomiędzy grupami szczurów DM+Hes50 i DM.

Wartość TAR oznaczona dla serca szczurów z grupy K wynosiła  $79,80 \pm 3,53$   $\mu$ mol równoważnika troloksu/L. U szczurów z grupy DM wartość TAR w sercu nie uległa zmianie w porównaniu do grupy K. Wartość TAR zmierzona w sercu szczurów z grupy

## Wpływ hesperydydy na rozwój stresu oksydacyjnego w sercu szczurów...

DM+Hes100 była istotnie większa ( $p < 0,01$ ) w odniesieniu do grupy DM. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w wartości TAR w porównaniu do grupy DM w sercu szczurów, u których stosowano hesperydydę w dawce 50 mg/kg.



**Wykres 2.** Wpływ hesperydydy na wartość TOS w sercu szczurów z cukrzycą typu 1.

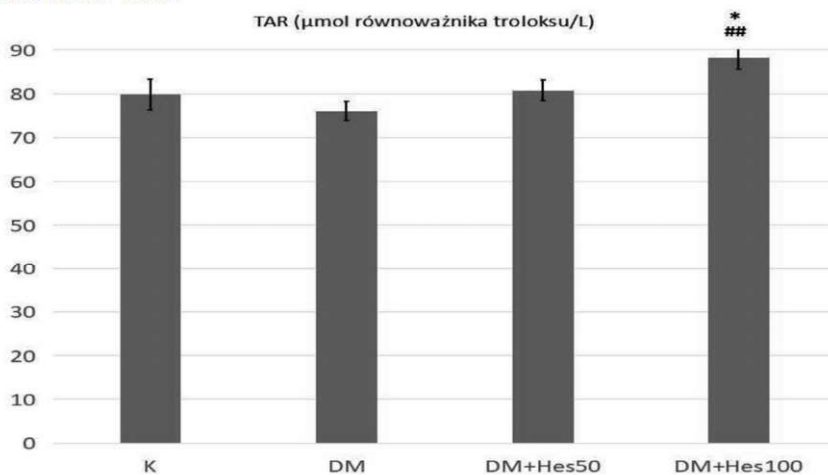
**Figure 2.** Effect of hesperidin on the TOS value in the heart of rats with type 1 diabetes.

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM.

\* $p < 0,05$  – statystycznie istotne różnice w odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów kontrolnych (grupa K)

\* $p < 0,05$  – statystycznie istotne różnice w odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów z cukrzycą (grupa DM)

Źródło: badanie własne.



**Wykres 3.** Wpływ hesperydydy na wartość TAR w sercu szczurów z cukrzycą typu 1.

**Figure 3.** Effect of hesperidin on the TAR value in the heart of rats with type 1 diabetes.

Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej  $\pm$  SEM.

\* $p < 0,05$  – statystycznie istotne różnice w odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów kontrolnych (grupa K)

\*\* $p < 0,01$  – statystycznie istotne różnice w odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów z cukrzycą (grupa DM)

Źródło: badanie własne.



## Dyskusja

Na przestrzeni ostatnich lat wzrasta odsetek eksperymentów dotyczących związków pochodzenia roślinnego, które zapobiegają zmianom patologicznym (mikro- i makroangiopatiom) w przebiegu cukrzycy typu 1 i 2 u zwierząt laboratoryjnych. Rezultaty większości doświadczeń wskazują na obiecującą rolę powyższych związków chemicznych w prewencji przytoczonych powikłań cukrzycowych [30–35].

Do tej pory nie udało się opracować skutecznej terapii zapobiegającej rozwojowi uszkodzenia serca u pacjentów z cukrzycą [36, 37]. W niniejszej pracy próbowano ocenić wpływ hesperydyny na parametry związane ze stresem oksydacyjnym w sercu szczurów w przebiegu cukrzycy typu 1. W tym celu wykorzystano dobrze poznany model cukrzycy streptozotocynowej, który jest powszechnie stosowany w tego typu badaniach [21, 22].

U szczurów jednorazowe podanie streptozotocyny spowodowało zwiększenie aktywności enzymatycznej CAT i GPx w sercu względem grupy K. Podobny trend zaobserwowano również w przypadku SOD, jednak zmiana ta nie była istotna statystycznie. Na podstawie dostępnej literatury można stwierdzić, że aktywność omawianych enzymów antyoksydacyjnych może zwiększać się [30, 38, 39] lub zmniejszać [11, 40–42] w homogenatach tkanek pozyskanych od szczurów z cukrzycą. U zwierząt otrzymujących badany związek odnotowano zmniejszenie aktywności SOD w sercu w porównaniu do gryzoni stanowiących grupę DM, co może wskazywać na korzystne działanie hesperydyny względem analizowanego enzymu. W innym doświadczeniu dotyczącym wpływu hesperydyny na stres oksydacyjny w tkance serca Rezaeyan i wsp. [43] poddali zwierzęta promieniowaniu rentgenowskiemu w dawce 18 Gy. Zwierzęta otrzymywały 100 mg/kg mc. badanego związku roślinnego przez okres jednego tygodnia przed napromieniowaniem. Badacze zauważyli, że zastosowanie hesperydyny spowodowało odwrócenie niekorzystnych zmian związanych z aktywnością SOD w mięśniówce, czego nie odnotowano u gryzoni z grupy, u której związku nie stosowano. W przypadku aktywności CAT i GPx u zwierząt z grup DM+Hes50 oraz DM+Hes100 nie zaobserwowano zmian w stosunku do szczurów z grupy DM. Na podstawie dotychczasowych prac dotyczących wpływu flawonoidów cytrusowych, w tym hesperydyny, stwierdza się na ogół, że pod ich wpływem zwiększa się aktywność CAT oraz GPx w mięśniu sercowym szczurów z cukrzycą streptozotocynową, jeśli wcześniej aktywność tych enzymów w wyniku cukrzycy została patologicznie obniżona [11, 38, 44, 45]. Jak wspomniano powyżej, w niniejszym doświadczeniu zaobserwowano wzrost aktywności tych enzymów w badanym narządzie u szczurów z cukrzycą typu 1, co może wynikać z występujących u zwierząt mechanizmów kompensacyjnych (obronnych) [46], jednak w zastosowanym układzie doświadczalnym użyte dawki flawonoidu nie wpłynęły na ich aktywność.



GSH jest istotnym przeciwutleniaczem endogennym, który wspiera utrzymanie prawidłowej struktury i funkcji komórek. Najczęściej poziom stresu oksydacyjnego w danej tkance jest odzwierciedlany poprzez stosunek GSH do GSSG [47]. W przedstawionym doświadczeniu nie zaobserwowano istotnych zmian w zawartości tGSH, GSH, GSSG oraz wartości współczynnika GSH/GSSG w sercu szczurów z grupy DM w porównaniu do szczurów K, a także po zastosowaniu hesperydyny w grupach DM+Hes50 i DM+Hes100 w odniesieniu do grupy DM. Można przypuszczać, że brak zmian w zawartości wszystkich form glutationu w sercu badanych zwierząt może być związany z mechanizmami kompensacyjnymi w obrębie tego narządu [46], jednak udowodnienie tego wymaga dodatkowych badań.

Udokumentowano wzrost stężenia MDA w sercu szczurów z cukrzycą typu 1 w porównaniu do szczurów z grupy K. Wyniki są zgodne z danymi dostępnymi w literaturze, które dotyczyły badań nad cukrzycą [45, 48, 49]. Po podaniu hesperydyny zwierzętom z cukrzycą typu 1 wykazano niższą zawartość MDA w sercu w odniesieniu do szczurów z grupy DM. Otrzymane rezultaty są w pełni spójne z wynikami przedstawionymi w poprzednim badaniu dotyczącym innego flawonoidu obecnego w cytrusach – naryngeniny [30]. Podobne obserwacje poczyniono w badaniu dotyczącym neuroprotektoryjnego działania hesperydyny u szczurów z cukrzycą typu 1. Zwierzętom podawano przytoczony flawonoid w dawce 200 mg/kg mc. przez 35 dni, czego efektem było obniżenie MDA w tkance mózgowia [50]. Stężenie AOPP w homogenatach serc było podobne we wszystkich badanych grupach szczurów. Brak zmian w tym parametrze po wywołaniu cukrzycy, jak również po zastosowaniu związków może być, podobnie jak w przypadku GSH, wynikiem mechanizmów naprawczych występujących w badanym narządzie.

Wykazano niewielki wzrost wartości TOS w sercu szczurów z cukrzycą. Sugeruje to zwiększony stres oksydacyjny w tym narządzie u szczurów z grupy DM w porównaniu do zwierząt z grupy K. Podobny kierunek zmian obserwowali inni eksperymentatorzy w różnych modelach i narządach [51, 52], a także w badaniach klinicznych obejmujących pacjentów z nefropatią cukrzycową w przebiegu cukrzycy typu 1 [53]. W niniejszym badaniu u gryzoni otrzymujących hesperydynę w dawce 100 mg/kg zanotowano spadek TOS oraz wzrost TAR w odniesieniu do zwierząt z grupy DM. Potwierdza to korzystne antyoksydacyjne właściwości hesperydyny.

W innych badaniach podjęto wstępne próby określenia mechanizmu działania hesperydyny w przebiegu cukrzycy typu 1. E. Dokumacioglu i wsp. [54] stwierdzili, że powyższy flawonoid prawdopodobnie działa hepato- i nefroprotektoryjnie poprzez zwiększenie poziomu ekspresji czynnika wzrostu fibroblastów-23 oraz obniżenie ekspresji białka alfa-klotho. Podobne badania z użyciem metod molekularnych warto wykonać w stosunku do serca w modelu cukrzycy typu 1.



W niniejszym doświadczeniu oznaczono wybrane parametry biochemiczne w homogenatach tkanki serca szczurów (samce szczepu Wistar), u których wywołało cukrzycę. W przyszłości należałoby wykonać diagnostykę histologiczną, na którą się składa histopatologia i immunohistochemia połączona z komputerową analizą obrazu. Ponadto celowa zdaje się ocena profilu cytokin prozapalnych u zwierząt chorych oraz leczonych badanymi związkami. Dodatkowo można również oznaczyć ścieżki sygnałowe wewnątrzkomórkowe, a także markery apoptozy i autofagii. Dlatego należy kontynuować wielośrodkowe eksperymenty naukowe dotyczące hesperydyny, aby definitywnie wyjaśnić jej rolę w terapii powikłań cukrzycy typu 1.

### **Wnioski**

Niniejszy eksperyment sugeruje, że hesperydyna przeciwdziała wybranym zaburzeniom równowagi oksydacyjno-redukcyjnej w przebiegu cukrzycy typu 1. Prawdopodobnie jest to spowodowane właściwościami antyoksydacyjnymi tego flawonoidu. Uzyskane wyniki wskazują, że warto prowadzić dalsze badania nad tą substancją pochodzenia roślinnego, w celu dowiedzenia, czy może stać się ona w przyszłości środkiem farmakologicznym skutecznym w prewencji oraz wspomaganiu terapii cukrzycy i jej powikłań.

### **Podziękowanie**

*Niniejsza praca została sfinansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (PCN-2-021/N/2/F).*

### **Literatura**

- [1] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B., Karuranga S., Unwin N., Colagiuri S., Guariguata L., Motala A.A., Ogurtsova K., Shaw J.E., Bright D., Williams R., Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9 th edition, Diabetes Research and Clinical Practice, 2019, 157, s. 107843.
- [2] Harreiter J., Roden M., Diabetes Mellitus-Definition, classification, diagnosis, screening and prevention, Wiener Klinische Wochenschrift, 2019, 131(Suppl. 1), s. 6–15.
- [3] Van der Wall E.E., Asymptomatic diabetes: screening by routine imaging beneficial?, Netherlands Heart Journal, 2015, 23(2), s. 79–81.
- [4] Hansen S.S., Aasum E., Hafstad A.D., The role of NADPH oxidases in diabetic cardiomyopathy, Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease, 2017, 1864, s. 1908–1913.
- [5] Huynh K., Bernardo B.C., McMullen J.R., Ritchie R.H., Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways, Pharmacology & Therapeutics, 2014, 142, s. 375–415.

- [6] Kayama Y., Raaz U., Jagger A., Adam M., Schellinger I.N., Sakamoto M., Suzuki H., Toyama K., Spin J.M., Tsao P.S., Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, s. 25234–25263.
- [7] Accord Study Group, Nine-Year Effects of 3.7 Years of Intensive Glycemic Control on Cardiovascular Outcomes, *Diabetes Care*, 2016, 39(5), s. 701–708.
- [8] Gilbert R.E., Krum H., Heart failure in diabetes: effects of anti-hyperglycaemic drug therapy, *Lancet*, 2015, 385(9982), s. 2107–2117.
- [9] Wang H.X., Ng T.B., Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities, *Life Science*, 1999, 65, s. 2663–2677.
- [10] Li Ch., Schluesener H., Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(3), s. 613–631.
- [11] Agrawal Y.O., Sharma P.K., Shrivastava B., Ojha S., Upadhya H.M., Arya D.S., Goyal S.N., Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR- $\gamma$  pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats, *PLOS One*, 2014, 9, s. e111212.
- [12] Agrawal Y.O., Sharma P.K., Shrivastava B., Arya D.S., Goyal S.N., Hesperidin blunts streptozotocin-isoproterenol induced myocardial toxicity in rats by altering of PPAR- $\gamma$  receptor, *Chemico-Biological Interactions*, 2014, 219, s. 211–220.
- [13] Galati E.M., Trovato A., Kirjavainen S., Forestieri A.M., Rossitto A., Monforte M.T., Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note III): antihypertensive and diuretic activity in rat, *Farmaco*, 1996, 51, s. 219–221.
- [14] Ikemura M., Sasaki Y., Giddings J.C., Yamamoto J., Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Phytotherapy Research*, 2012, 26(9), s. 1272–1277.
- [15] Ganeshpurkar A., Saluja A., The pharmacological potential of hesperidin, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 2019, 56, s. 287–300.
- [16] Kumar B., Gupta S.K., Srinivasan B.P., Nag T.C., Srivastava S., Saxena R., Hesperetin ameliorates hyperglycemia induced retinal vasculopathy via anti-angiogenic effects in experimental diabetic rats, *Vascular Pharmacology*, 2012, 57, s. 201–207.
- [17] Jin Y.R., Han X.H., Zhang Y.H., Lee J.J., Lim Y., Chung J.H., Yun Y.P., Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC- $\gamma$ 2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity, *Atherosclerosis*, 2007, 194(1), s. 144–152.
- [18] Yang Z., Liu Y., Deng W., Dai J., Li F., Yuan Y., Wu Q., Zhou H., Bian Z., Tang Q., Hesperetin attenuates mitochondria-dependent apoptosis in lipopolysaccharide-induced H9C2 cardiomyocytes, *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(5), s. 1941–1946.
- [19] Trivedi P.P., Kushwaha S., Tripathi D.N., Jena G.B., Cardioprotective effects of hesperetin against doxorubicin-induced oxidative stress and DNA damage in rat, *Cardiovascular Toxicology*, 2011, 11(3), s. 215–225.
- [20] Hanchang W., Khamchan A., Wongmanee N., Seedadee C., Hesperidin ameliorates pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rat model, *Life Sciences*, 2019, 235, s. 116858.
- [21] Furman B.L., Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats, *Current Protocols in Pharmacology*, 2015, 70, s. 1–20.



- [22] Goyal S.N., Reddy N.M., Patil K.R., Nakhate K.T., Ojha S., Patil C.R., Agrawal Y.O., Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes – A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics, *Chemo-Biological Interactions*, 2016, 244, s. 49–63.
- [23] Qinna N.A., Badwan A.A., Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats, *Drug Design, Development and Therapy*, 2015, 9, s. 2515–2525.
- [24] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.I., Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193, s. 265–275.
- [25] Buege J.A., Aust S.D., Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 1978, 52, s. 302–310.
- [26] Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillère-Blandin C., Nguyen-Khoa T., Nguyen A.T., Zingraff J., Jungers P., Descamps-Latscha B., Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney International*, 1996, 49, s. 1304–1313.
- [27] Jagota S.K., Dani H.M., A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent, *Analytical Biochemistry*, 1982, 127, s. 178–182.
- [28] Erel O., A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry*, 2005, 38, s. 1103–1111.
- [29] Erel O., A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, *Clinical Biochemistry*, 2004, 37, s. 112–119.
- [30] Bramora P., Borymska W., Zych M., Kaczmarczyk-Sedlak I., Effect of naringenin on oxidative stress in the heart tissue of type 1 diabetic Wistar rats, *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 2021, 78(5), s. 693–703.
- [31] Mutavdzin S., Gopcevic K., Stankovic S., Jakovljevic Uzelac J., Labudovic Borovic M., Djuric D., The Effects of Folic Acid Administration on Cardiac Oxidative Stress and Cardiovascular Biomarkers in Diabetic Rats, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, s. 1342549.
- [32] Li C.L., Liu B., Wang Z.Y., Xie F., Qiao W., Cheng J., Kuang J.Y., Wang Y., Zhang M.X., Liu D.S., Salvianolic acid B improves myocardial function in diabetic cardiomyopathy by suppressing IGFBP3, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2020, 139, s. 98–112.
- [33] Ali T.M., Abo-Salem O.M., El Esawy B.H., El Askary A., The Potential Protective Effects of Diosmin on Streptozotocin-Induced Diabetic Cardiomyopathy in Rats, *The American Journal of the Medical Sciences*, 2020, 359(1), s. 32–41.
- [34] Talebi A.R., Mangoli E., Nahangi H., Anvari M., Pouretezari M., Halvaei I., Vitamin C attenuates detrimental effects of diabetes mellitus on sperm parameters, chromatin quality and rate of apoptosis in mice, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2014, 181, s. 32–36.
- [35] Sun Y., Zhou S., Guo H., Protective effects of sulforaphane on type 2 diabetes-induced cardiomyopathy via AMPK-mediated activation of lipid metabolic pathways and NRF2 function, *Metabolism*, 2020, 102, s. 154002.
- [36] American Diabetes Association, 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2019, *Diabetes Care*, 2019, 42(Suppl. 1), s. 90–102.

- [37] Larsson S.C., Wallin A., Håkansson N., Stackelberg O., Bäck M., Wolk A., Type 1 and type 2 diabetes mellitus and incidence of seven cardiovascular diseases, *International Journal of Cardiology*, 2018, 262, s. 66–70.
- [38] Rani N., Bharti S., Bhatia J., Nag T.C., Ray R., Arya D.S., Chrysin, a PPAR- $\gamma$  agonist improves myocardial injury in diabetic rats through inhibiting AGE-RAGE mediated oxidative stress and inflammation, *Chemico-Biological Interactions*, 2016, 250, s. 59–67.
- [39] Sharma I., Aaradhya M., Kodikonda M., Naik P.R., Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activity of phenolic rich extract of *Brassica oleracea* var gongyolodes on streptozotocin induced Wistar rats, *SpringerPlus*, 2015, 4, s. 212.
- [40] Bhatti R., Sharma S., Singh J., Ishar M.P., Ameliorative effect of *Aegle marmelos* leaf extract on early stage alloxan-induced diabetic cardiomyopathy in rats, *Pharmaceutical Biology*, 2011, 49(11), s. 1137–1143.
- [41] Aju B.Y., Rajalakshmi R., Mini S., Protective role of *Moringa oleifera* leaf extract on cardiac antioxidant status and lipid peroxidation in streptozotocin induced diabetic rats, *Heliyon*, 2019, 5(12), s. e02935.
- [42] Al-Numair K.S., Chandramohan G., Veeramani C., Alsaif M.A., Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats, *Redox Report*, 2015, 20(5), s. 198–209.
- [43] Rezaeyan A., Haddadi G.H., Hosseinzadeh M., Moradi M., Najafi M., Radioprotective effects of hesperidin on oxidative damages and histopathological changes induced by X-irradiation in rats heart tissue, *Journal of Medical Physics*, 2016, 41(3), s. 182–191.
- [44] Zhang N., Yang Z., Xiang S.Z., Jin Y.G., Wei W.Y., Bian Z.Y., Deng W., Tang Q.Z., Nobiletin attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, and inflammatory in streptozotocin: induced diabetic cardiomyopathy, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016, 417(1–2), s. 87–96.
- [45] Bao H., Chen L.I., Icarin reduces mitochondrial oxidative stress injury in diabetic rat hearts, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, 36(11), s. 1503–1507.
- [46] Hayes J.P., Jenkins S.H., Individual Variation in Mammals, *Journal of Mammalogy*, 1997, 78(2), s. 274–293.
- [47] Jones D.P., Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance, *Methods in Enzymology*, 2002, 348, s. 93–112.
- [48] Zhang Y.F., Meng N.N., Li H.Z., Wen Y.J., Liu J.T., Zhang C.L., Yuan X.H., Jin X.D., Effect of naringin on oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in diabetic cardiomyopathy, *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, 43(3), s. 596–602.
- [49] Soetikno V., Sari F.R., Sukumaran V., Lakshmanan A.P., Mito S., Harima M., Thandavarayan R.A., Suzuki K., Nagata M., Takagi R., Watanabe K., Curcumin prevents diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats: possible involvement of PKC-MAPK signaling pathway, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 47(3), s. 604–614.
- [50] Ibrahim S.S., Protective Effect of Hesperidin, a Citrus Bioflavonoid, on Diabetes-Induced Brain Damage in Rats, *Journal of Applied Sciences Research*, 2008, 4(1), s. 84–95.
- [51] Hazman Ö., Serhat O., Investigation of the anti-inflammatory effects of safranal on high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model, *Inflammation*, 2015, 38(3), s. 1012–1019.



- [52] Turhan U., Yilmaz E., Gul M., Melekoglu R., Turkoz Y., Ozyalin F., Parlakpinar H., Simsek Y., Investigation of the effect of gestational diabetes on fetal cardiac tissue in streptozotocin induced in rats, *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2018, 33(4), s. 306–313.
- [53] Aslan M., Sabuncu T., Kocyigit A., Celik H., Selek S., Relationship between total oxidant status and severity of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 2007, 17(10), s. 734–740.
- [54] Dokumacioglu E., Iskender H., Musmul A., Effect of hesperidin treatment on  $\alpha$ -Klotho/FGF-23 pathway in rats with experimentally induced diabetes, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 109, s. 1206–1210.

Do cytowania:

Bramora P., Zych M., Borymska W., Kaczmarczyk-Żebrowska I., Wpływ hesperydyny na rozwój stresu oksydacyjnego w sercu szczurów z cukrzycą typu 1, *Herbalism*, 2023, 1(9), s. 50–66.