

Wpływ naryngeniny na odpowiedź antyoksydacyjną oraz status oksydacyjny w soczewkach szczurów z cukrzycą

Effect of naringenin on antioxidative response and oxidative stress status in the lenses of diabetic rats

Weronika Wojnar¹, Maria Zych¹, Ilona Kaczmarczyk-Sedlak¹

¹Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec; autor korespondencyjny: wwojnar@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: naryngenina, soczewki, szczury, cukrzyca, stres oksydacyjny
Key words: naringenin, lenses, rats, diabetes, oxidative stress

Streszczenie

Naryngenina to naturalnie występujący flawonoid o działaniu przeciwutleniającym. Wśród wielu udokumentowanych działań farmakologicznych, opisany jest również korzystny wpływ tego związku na struktury oka w różnych modelach eksperymentalnych. Brak jest jednak doniesień opisujących wpływ naryngeniny na parametry związane ze stresem oksydacyjnym w soczewkach szczurów w przebiegu cukrzycy. Ze względu na fakt, iż cukrzyca może indukować powstawanie stresu oksydacyjnego oraz w konsekwencji rozwój zaćmy, celem pracy była analiza wpływu naryngeniny podawanej doustnie w dawkach 50 i 100 mg/kg na wybrane parametry związane ze stresem oksydacyjnym w soczewkach szczurów z cukrzycą. Badanie wykonano na samcach szczurów, z których po 4 tygodniach podawania naryngeniny wyizolowano soczewki. W uzyskanych z soczewek homogenatach oznaczono całkowitą odpowiedź antyoksydacyjną, całkowity status oksydacyjny, współczynnik stresu oksydacyjnego oraz zawartość białkowych i niebiałkowych grup tiolowych. Uzyskane wyniki świadczą o korzystnym, przeciwutleniającym wpływie naryngeniny na soczewkę oka u szczurów z wywołaną cukrzycą.

Summary

Naringenin is a naturally occurring flavonoid with an antioxidative activity. Among many, well-documented pharmacological properties, it reveals a beneficial effect on ocular structures in experimental animals. However, there is no report describing an effect of naringenin on oxidative stress parameters in the lenses of diabetic rats. Since hyperglycemia may induce oxidative stress and eventually cataract formation, the aim of this study was to evaluate the effect of naringenin administered orally at the doses of 50 and 100 mg/kg on selected

oxidative stress parameters in the lenses of diabetic rats. The study was conducted on male rats, from which, after 4 weeks of naringenin administration, the lenses were isolated. In homogenates prepared from the lenses, total antioxidative response, total oxidative status, oxidative stress index as well as protein and non-protein thiol groups level were assessed. Obtained results indicate, that naringenin shows beneficial, antioxidative effect in the lenses of diabetic rats.

Wstęp

Naryngenina (5,7-Dihydroksy-2-(4-hydroksyfenyl)chroman-4-on) jest naturalnym flawonoidem należącym do flawanonów występującym w formie wolnej oraz glikozydowej w wielu roślinach. Głównym źródłem tego flawonoidu są owoce cytrusowe. Naryngeninę wykryto w pomarańczach (*Citrus × aurantium* var. *sinensis* L.), mandarynkach (*Citrus reticulata* Blanco) oraz pomelo (*Citrus maxima* (Burm. f.) Merr.), jednak najbogatszym źródłem tego flawanonu są grejpfruty (*Citrus paradisi* Macfad.) i gorzkie pomarańcze (*Citrus aurantium* var. *amara* L.) [1, 2]. Do źródeł naturalnych naryngeniny można zaliczyć również pistacje (*Pistacia vera* L.), migdały (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb) czy nasiona tamaryndowca indyjskiego (*Tamarindus indica* L.) i beninkazy szorstkiej (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogniaux) [3–6]. Naryngenina obecna jest też w herbacie Honeybush (*Cyclopia intermedia* E. Mey.), propolisie oraz kielkach niektórych roślin, takich jak brokuł (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) czy soczewica (*Lens culinaris* Medik.) [7–10]. W pomidorach (*Solanum lycopersicum* L.) występuje natomiast chalkon naryngeniny, który podczas przetwórstwa spożywczego przekształca się do wolnej naryngeniny [11].

Naryngenina wykazuje działanie przeciwutleniające, które wynika bezpośrednio z budowy strukturalnej tego związku oraz zdolności do wytwarzania wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych [2, 12, 13]. Istnieją dowody na to, że naryngenina wywiera pomocnicze działanie w przebiegu cukrzycy. W modelu zwierząt laboratoryjnych wykazuje efekt hipoglikemiczny oraz zapobiega rozwojowi powikłań cukrzycowych [14, 15]. Udowodniono również, iż związek ten stosowany doustnie, dootrzewnowo lub miejscowo ma ochronne działanie na struktury oka [16, 17, 18], brak jest jednak badań *in vivo* opisujących wpływ naryngeniny na soczewkę oka w przebiegu cukrzycy.

Ze względu na fakt, iż stres oksydacyjny wywołany długotrwałą hiperglikemią może prowadzić do zmian patologicznych w obrębie soczewki, a w konsekwencji do rozwoju zaćmy cukrzycowej [19, 20], celem niniejszej pracy była

analiza wpływu naryngeniny podawanej doustnie w dawkach 50 i 100 mg/kg na status oksydacyjny oraz odpowiedź antyoksydacyjną w soczewkach szczurów z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą.

Materiał i metody

Wywołanie cukrzycy u szczurów i podawanie związków

Eksperyment przedstawiony w niniejszej pracy został zaakceptowany przez Lokalną Komisję Etyczną w Katowicach ds. Badań na Zwierzętach (numer zgody 36/2015).

Badanie zostało przeprowadzone na dojrzałych samcach szczurów (3-miesięcznych) szczepu Wistar o masie wyjściowej 200 ± 10 g. Szczury zostały podzielone na 4 grupy eksperymentalne ($n = 8-9$): K – szczury kontrolne zdrowe, DM – szczury kontrolne z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą oraz DM+N50 i DM+N100 – szczury z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą, którym podawano doustnie naryngeninę w dawkach odpowiednio: 50 mg/kg oraz 100 mg/kg.

Cukrzycę u szczurów z grup DM, DM+N50 i DM+N100 wywołano poprzez jednorazowe, dootrzewnowe podanie streptozotocyny (STZ) w dawce 60 mg/kg (roztwór w 0,1 M buforze cytrynianowym o $pH = 4,5$). Szczury z grupy K dostały jednorazowy zastrzyk zawierający jedynie 0,1 M bufor cytrynianowy o $pH=4,5$ [21]. Szczury uznano za chore, gdy stężenie glukozy po 2 tygodniach od podania STZ przekroczyło wartość 200 mg/dl.

Naryngenina szczurom z grup DM+N50 i DM+N100 podawana była przez 28 dni, raz dziennie o jednakowej porze, w postaci zawiesiny w wodzie destylowanej, przy użyciu sondy dożołądkowej. Zawiesina przygotowywana była poprzez odważenie odpowiedniej ilości związku oraz dodanie takiej ilości wody, aby na każdy 1 kg masy ciała szczura przypadało 2 ml zawiesiny. Taka sama ilość wody destylowanej podawana była sondą dożołądkową szczurom z grup K i DM. Aby zapewnić odpowiednią objętość, jaką należy podać zwierzęciu, masa ciała szczurów była monitorowana przez cały okres trwania badania. Dawki naryngeniny ustalone zostały na podstawie danych literaturowych [14].

Uśmiercenie zwierząt nastąpiło poprzez dootrzewnowe podanie mieszaniny ketaminy z ksylazyną oraz pobranie całkowitej objętości krwi z serca. Ze zwierząt wyizolowano gałki oczne, z których pozyskano soczewki. Soczewki bezpośrednio po izolacji zważono na wadze analitycznej AND HR-200 ($d = 0,1$ mg) oraz zhomogenizowano w buforze PBS (10% homogenat obj./wag.).

Homogenat zwirowano w wirówce MPW-260R w temperaturze +4°C, przy obrotach $10000 \times g$ przez 15 minut. Ze zwirowanych homogenatów pobrano nadosad, który posłużył do badań parametrów związanych z oceną statusu oksydacyjnego w soczewkach. Pomiarów spektrofotometrycznych dokonano przy użyciu czytnika mikroplitek Tecan NanoQuant Infinite M200 Pro.

Oznaczanie całkowitej odpowiedzi antyoksydacyjnej w soczewkach szczurów

Całkowitą odpowiedź antyoksydacyjną (TAR – ang. *Total antioxidative response*) zbadano poprzez dodanie do 5 μ l próbki 200 μ l odczynnika 1 zawierającego dianizydynę, jony Fe^{2+} oraz roztwór Clark'a i Lubs'a (CL). Następnie, do prób dodano odczynnik 2 złożony z nadtlenu wodoru i roztworu CL. Pierwszego pomiaru dokonano bezpośrednio po dodaniu odczynnika 1 przy długości fali 444 nm. Po 4 minutach wytrząsania w temperaturze pokojowej z odczynnikiem 2 dokonano drugiego pomiaru. Do krzywej wzorcowej wykonanej z Troloxu podstawiono wyniki uzyskane po odjęciu wartości otrzymanych w pomiarze 1 od wyników z pomiaru 2. Wyniki przedstawiono jako μ mol równoważnika Troloxu na 1 g tkanki [22].

Oznaczanie całkowitego statusu oksydacyjnego w soczewkach szczurów

Metoda oznaczenia całkowitego statusu oksydacyjnego (TOS – ang. *Total oxidative status*) opiera się na reakcji utleniania jonów Fe^{2+} do jonów Fe^{3+} . Do 35 μ l próbek dodano 225 μ l odczynnika 1, w którego skład wchodziły oranż ksylenolowy, chlorek sodu, glicerol oraz stężony kwas siarkowy (VI) oraz 11 μ l odczynnika 2, zawierającego jony żelaza Fe^{2+} i dianizydynę w stężonym kwasie siarkowym (VI). Bezpośrednio po dodaniu odczynnika 1 zmierzono absorbancję przy długości fali 560 nm i referencyjnej 800 nm (odczyt 1). Po 4 minutach wytrząsania w temperaturze pokojowej z odczynnikiem 2, dokonano pomiaru 2, przy tych samych długościach fali. Aby uzyskać wartości potrzebne do dalszej analizy, odjęto wynik pomiaru 1 od wyniku pomiaru 2. Krzywa wzorcową wykonaną została z H_2O_2 . Wyniki przedstawiono jako μ mol równoważnika H_2O_2 na 1 g tkanki [23].

Wyliczenie współczynnika stresu oksydacyjnego w soczewkach szczurów

Współczynnik stresu oksydacyjnego (OSI – ang. *Oxidative stress index*) wyliczony został zgodnie z wzorem: $OSI = TOS / (TAR \cdot 100)$ [24].

Oznaczanie białkowych i niebiałkowych grup tiolowych w soczewkach szczurów

W celu oznaczenia zawartości białkowych (PSH – ang. *Protein thiol groups*) i niebiałkowych grup tiolowych (NPSH – ang. *Non-protein thiol groups*) w soczewkach wykorzystano procedury opisane przez Ellmana [25] i Sedlak i Lindsay [26]. Protokół pozwalający oznaczyć NPSH opiera się na reakcji kwasu 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzeosowego (DTNB) z grupami tiolowymi w próbkach odbiałczonych przy pomocy kwasu trichlorooctowego. Zawartość PSH obliczono na podstawie różnicy pomiędzy całkowitymi grupami tiolowymi (oznaczonymi bez wstępnego odbiałczania próbek) a NPSH.

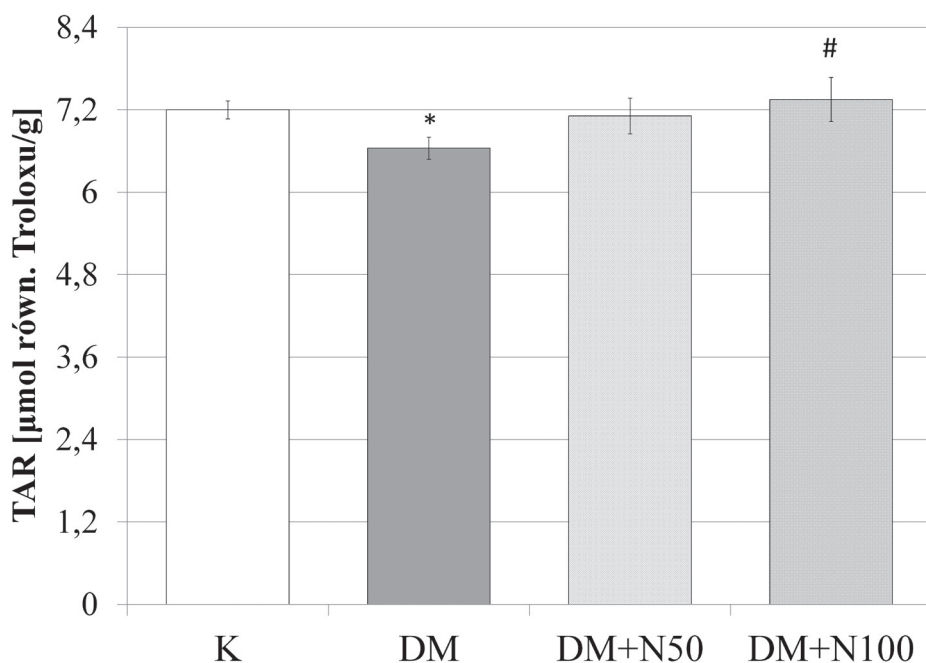
Analiza statystyczna

Wyniki uzyskane w eksperymencie zostały poddane analizie statystycznej z użyciem testu t-Studenta. Obliczeń dokonano w programie MS Excel (Microsoft Office 2010). Wartości przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Za wyniki istotne statystycznie uznano takie, dla których $p \leq 0,05$.

Wyniki

Wpływ naryngeniny na całkowitą odpowiedź antyoksydacyjną w soczewkach szczurów

W soczewkach szczurów z grupy DM zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie całkowitej odpowiedzi antyoksydacyjnej (TAR). Niższa dawka naryngeniny (50 mg/kg) spowodowała jedynie nieznaczne zwiększenie TAR w soczewkach szczurów z cukrzycą, jednak zastosowanie wyższej dawki (100 mg/kg) spowodowało istotne statystycznie zwiększenie tego parametru w porównaniu do szczurów z grupy DM. Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach TAR w soczewkach szczurów z grup DM+N50 i DM+N100 w porównaniu z wartością TAR w soczewkach szczurów z grupy K (Wykres 1).



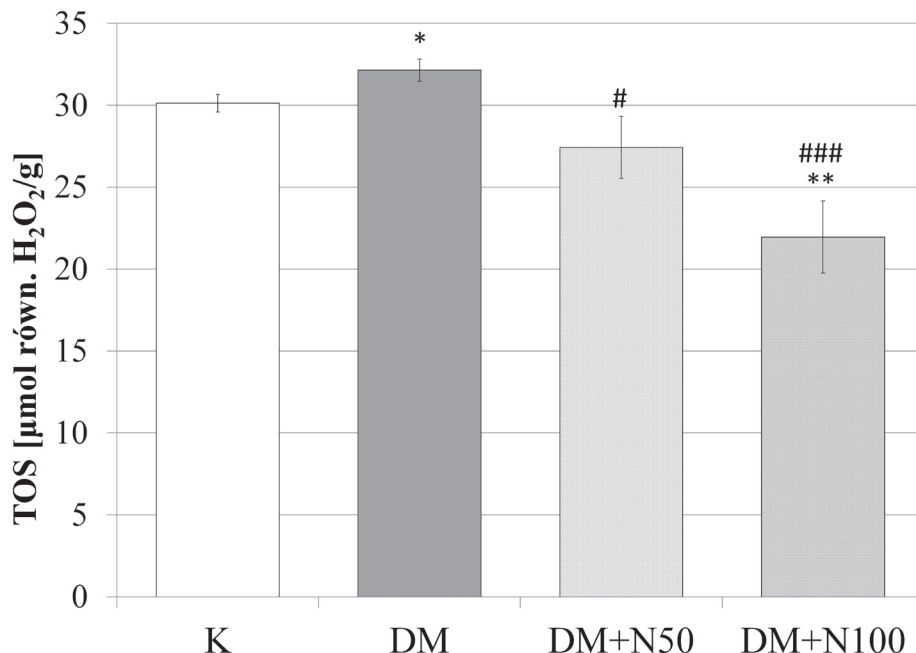
Wykres 1. Wpływ naryngeniny na całkowitą odpowiedź antyoksydacyjną (TAR) w soczewkach szczurów z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p \leq 0,05$ – różnice istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej K; # $p \leq 0,05$ – różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą DM+N50 lub DM+N100 a grupą DM

Graph 1. Effect of naringenin on total antioxidative response (TAR) in the lenses of diabetic rats. Results are presented as means \pm SEM; * $p \leq 0.05$ – statistically significant differences in comparison with the K group; # $p \leq 0.05$ – statistically significant differences between the DM+N50 or DM+N100 and DM groups

Wpływ naryngeniny na całkowity status oksydacyjny w soczewkach szczurów

Całkowity status oksydacyjny (TOS) w soczewkach szczurów z grupy DM był istotnie statystycznie wyższy niż w soczewkach szczurów z grupy K. Zastosowanie naryngeniny w dawce 50 mg/kg spowodowało istotne obniżenie wartości TOS w porównaniu do wartości uzyskanej w soczewkach szczurów z grupy DM. W grupie szczurów DM+N100 odnotowano istotne statystycznie obniżenie wartości TOS w porównaniu do wyniku uzyskanego w soczewkach szczurów z grupy DM, co więcej, całkowity status oksydacyjny w soczewkach szczurów z tej grupy obniżył się istotnie statystycznie również w porównaniu do TOS obserwowanego w grupie szczurów K (Wykres 2).

Wpływ naryngeniny na odpowiedź antyoksydacyjną oraz status

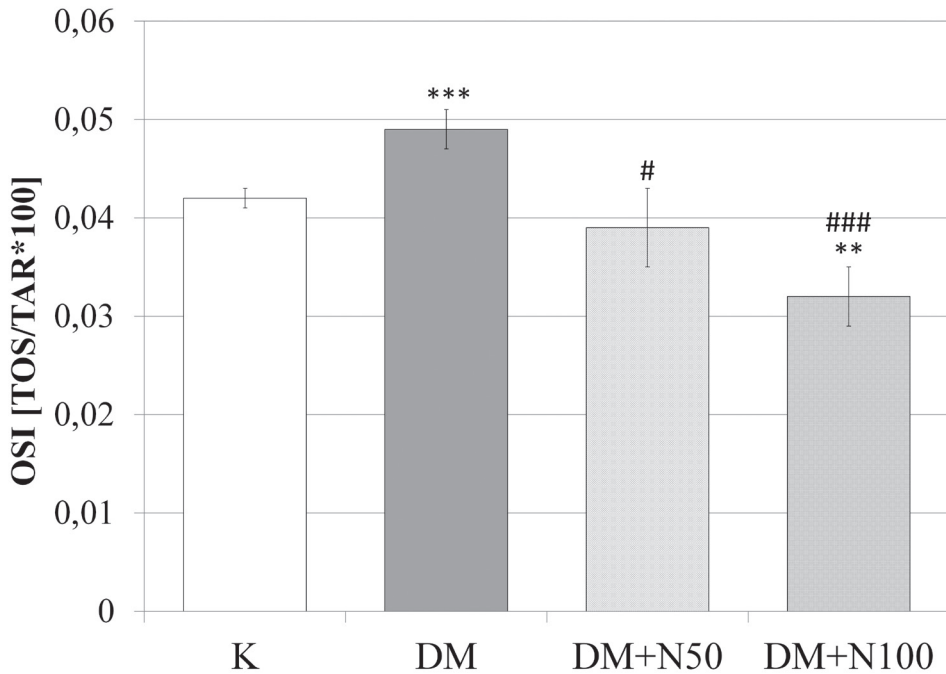


Wykres 2. Wpływ naryngeniny na całkowity status oksydacyjny (TOS) w soczewkach szczurów z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SEM; * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$ – różnice istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej K; # $p \leq 0,05$; ### $p < 0,001$ – różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą DM+N50 lub DM+N100 a grupą DM

Graph 2. Effect of naringenin on total oxidative status (TOS) in the lenses of diabetic rats. Results are presented as means \pm SEM; * $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$ – statistically significant differences in comparison with the K group; # $p \leq 0.05$; ### $p < 0.001$ – statistically significant differences between the DM+N50 or DM+N100 and DM groups

Wpływ naryngeniny na współczynnik stresu oksydacyjnego w soczewkach szczurów

Wywołanie cukrzycy u szczurów laboratoryjnych spowodowało istotne statystycznie zwiększenie współczynnika stresu oksydacyjnego (OSI) w soczewkach, w porównaniu do OSI w soczewkach szczurów kontrolnych K. W soczewkach szczurów z grupy DM+N50 odnotowano istotne obniżenie wartości tego współczynnika w porównaniu do wartości wyliczonej dla soczewek szczurów z grupy DM. Zastosowanie naryngeniny w dawce 100 mg/kg spowodowało istotne obniżenie OSI w stosunku do wartości tego współczynnika w soczewkach szczurów z grupy DM, a także w stosunku do wartości OSI w soczewkach zdrowych szczurów kontrolnych K (Wykres 3).



Wykres 3. Wpływ naryngeniny na współczynnik stresu oksydacyjnego (OSI) w soczewkach szczurów z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SEM; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – różnice istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej K; # $p \leq 0,05$; ### $p < 0,001$ – różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą DM+N50 lub DM+N100 a grupą DM

Graph 3. Effect of naringenin on oxidative stress index (OSI) in the lenses of diabetic rats. Results are presented as means \pm SEM; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – statistically significant differences in comparison with the K group; # $p \leq 0.05$; ### $p < 0.001$ – statistically significant differences between the DM+N50 or DM+N100 and DM groups

Wpływ naryngeniny na zawartość białkowych i niebiałkowych grup tiolowych w soczewkach szczurów

Wywołanie cukrzycy u szczurów z grupy DM spowodowało istotne statystycznie obniżenie zawartości białkowych (PSH) i niebiałkowych (NPSH) grup tiolowych w soczewkach tych zwierząt w porównaniu do soczewek szczurów z grupy K. W grupach szczurów DM+N50 i DM+N100 nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w zawartości zarówno PSH, jak i NPSH w porównaniu do grupy DM, a wartości uzyskane dla tych parametrów pozostały istotnie niższe niż w grupie szczurów K (Tabela 1).

Wpływ naryngeniny na odpowiedź antyoksydacyjną oraz status

Tabela 1. Wpływ naryngeniny na zawartość białkowych i niebiałkowych grup tiolowych w soczewkach szczurów z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą

Table 1. Effect of naringenin on protein and non-protein thiol groups in the lenses of diabetic rats

	K	DM	DM+N50	DM+N100
Białkowe grupy tiolowe (PSH) [μmol/g soczewki]	44,7 ± 1,3	39,4 ± 1,1**	38,3 ± 1,2**	38,9 ± 2,3*
Niebiałkowe grupy tiolowe (NPSH) [μmol/g soczewki]	4,10 ± 0,61	0,71 ± 0,13***	0,88 ± 0,19***	0,95 ± 0,15***

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM; * p≤0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 – różnice istotne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej K

Results are presented as means ± SEM; * p≤0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 – statistically significant differences in comparison with the K group

Dyskusja

Wiele dowodów naukowych wskazuje, że stres oksydacyjny ma istotny wpływ na rozwój cukrzycy oraz wtórnych komplikacji zdrowotnych związanych z tą chorobą. Długotrwałe utrzymująca się hiperglikemia powoduje zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu (ROS – ang. *Reactive oxygen species*) przez mitochondria. Konsekwencją nadprodukcji ROS jest upośledzenie mechanizmów obronnych organizmu przed ROS [19, 27, 28]. Brak takiej ochrony powoduje, że ilość ROS nie zmniejsza się, co prowadzi do uszkodzeń oksydacyjnych kolejnych struktur, w tym lipidów, białek i kwasów nukleinowych [29]. Do komplikacji zdrowotnych w przebiegu cukrzycy można zaliczyć zmiany patologiczne w obrębie oka, takie jak retinopatia cukrzycowa, obrzęk nerwu wzrokowego, jaskra, choroby rogówki oraz zaćma. Jako zaćmę rozumie się każdą nieprzezroczystość soczewki. Czynniki wpływającymi na rozwój zaćmy u pacjentów z cukrzycą są, między innymi, zarówno hiperglikemia, jak i stres oksydacyjny [30]. Zwiększona ilość ROS i zaburzona odpowiedź antyoksydacyjna organizmu sprawiają, że składniki komórkowe soczewki oka, w tym rozpuszczalne białka (krystaliny), narażone są na uszkodzenia oksydacyjne [19]. W stresie oksydacyjnym mogą powstawać nietypowe połączenia pomiędzy makrocząsteczkami. W białkach dochodzi do utleniania grup tiolowych, przez co zmienia się ich konformacja, co z kolei może prowadzić do powstawania nierozpuszczalnych kompleksów białkowych i zwiększenia zmętnienia soczewki [31].

Cząsteczki o charakterze przeciwutleniaczy mają zdolność do zapobiegania lub odwracania zmian wywołanych obecnością ROS. Przeciwutleniacze

mogą być wytwarzane przez organizm (endogenne przeciwutleniacze) lub dostarczane z zewnątrz (egzogenne przeciwutleniacze). Ze względu na fakt, iż wykonanie odrębnych pomiarów zawartości każdej substancji o charakterze przeciwutleniacza w badanej tkance lub organie jest bardzo kosztowne i czasochłonne, możliwa jest ocena sumarycznej zawartości tych związków, dzięki metodzie oznaczania całkowitej odpowiedzi antyoksydacyjnej. TAR jako parametr w literaturze naukowej określany jest również przy użyciu synonimów, takich jak TAC (ang. *Total antioxidant capacity*), czy TAS (ang. *Total antioxidant status*) [22].

ROS, jako cząsteczki, pełnią kluczową rolę w niektórych procesach zachodzących w organizmach zwierząt, w tym w wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału, różnicowaniu komórek, czy apoptozie [32]. Jednak ich nadmiar prowadzi do rozwoju zmian patologicznych. Oprócz reaktywnych form tlenu, do utleniaczy można zaliczyć też reaktywne formy azotu czy chloru [33]. Ponieważ oznaczenie zawartości każdego utleniacza osobno może wiązać się z wysokimi kosztami i ograniczeniami technicznymi, można, podobnie jak w przypadku przeciwutleniaczy, oznaczyć sumę utleniaczy, czyli całkowity status oksydacyjny [23]. Parametrem łączącym zarówno TAR jak i TOS, reprezentującym zdolność organizmu do walki ze stresem oksydacyjnym, jest współczynnik stresu oksydacyjnego OSI [24].

Ze względu na to, że w przebiegu cukrzycy mechanizmy obronne przeciw ROS są zachwiane, można wspomóc organizm poprzez dostarczanie egzogennych przeciwutleniaczy. Do naturalnych związków przeciwutleniających, powszechnie występujących w świecie roślinnym, zaliczyć można flawonoidy. Istnieją liczne doniesienia, łącznie z obszernymi pracami przeglądowymi, wskazujące na słusność stosowania flawonoidów w profilaktyce, opóźnianiu powstawania oraz leczeniu pomocniczym zaćmy cukrzycowej [34, 35].

W niniejszej pracy po raz pierwszy zbadano wpływ naryngeniny – flawonoidu występującego głównie w gorzkich cytrusach – na sumaryczne wskaźniki związane z obecnością utleniaczy i przeciwutleniaczy w soczewkach szczurów z cukrzycą.

Eksperymentalne wywołanie cukrzycy spowodowało istotne zwiększenie się całkowitego statusu oksydacyjnego i obniżenie całkowitej odpowiedzi antyoksydacyjnej, a co za tym idzie, zwiększenie się współczynnika stresu oksydacyjnego w tym narządzie. Zmiany te świadczą o rozwoju stresu oksydacyjnego w soczewkach szczurów z cukrzycą. Stres oksydacyjny w soczewkach szczurów, opisany takimi samymi parametrami, został zaobserwowany również w modelu szczurów z niedoborem estrogenów oraz hiperglikemią [36] oraz po ekspozycji szczurów na promieniowanie UVC [37]. Zaobserwowano również,

iż indukowanie cukrzycy spowodowało istotne obniżenie zawartości zarówno białkowych, jak i niebiałkowych grup tiolowych w soczewkach badanych zwierząt. Grupy tiolowe (głównie ze związków niskocząsteczkowych) pełnią funkcję endogennych przeciwutleniaczy, gdyż są donorem wodoru [38], zatem zmniejszenie ich zawartości świadczy o niekorzystnych zmianach w soczewce. Główną cząsteczką stanowiącą źródło niebiałkowych grup tiolowych w organizmie jest zredukowany glutation (GSH) [39], a obniżenie stężenia GSH w soczewkach w przebiegu cukrzycy jest dobrze udokumentowane [40–42]. Obniżenie zawartości białkowych grup tiolowych może wskazywać na utlenianie białek. W przypadku soczewek głównymi białkami są rozpuszczalne w wodzie krystaliny, które zapewniają przezroczystość tego narządu, zatem ich utlenienie i w konsekwencji zmniejszenie rozpuszczalności, prowadzi do powstawania złogów białkowych i rozwoju zaćmy [43]. Obniżenie zawartości białka rozpuszczalnego w soczewkach również jest dobrze udokumentowane u zwierząt laboratoryjnych z indukowaną cukrzycą [40–42].

U szczurów z cukrzycą wywołaną streptozotocyną zaobserwowano podwyższenie się całkowitej odpowiedzi antyoksydacyjnej jedynie po zastosowaniu naryngeniny w dawce 100 mg/kg. Pomimo że niższa dawka – 50 mg/kg – spowodowała obniżenie całkowitego statusu oksydacyjnego oraz współczynnika stresu oksydacyjnego w soczewkach szczurów, odnotowano, iż wyższa dawka wykazała silniejsze działanie na te parametry, powodując również obniżenie wartości tych parametrów względem szczurów zdrowych. Do tej pory nie zbadano wpływu naryngeniny na parametry TAR, TOS i OSI w soczewkach w żadnym modelu zwierzęcym. Istnieje jednak doniesienie opisujące wpływ bogatego w antocyjany wyciągu z kwiatu hibiskusa na te parametry u szczurów narażonych na promieniowanie UVC. Autorzy tego badania stwierdzili korzystny wpływ analizowanego wyciągu na soczewki szczurów właśnie poprzez oznaczanie TAR, TOS i OSI [37].

Jak wcześniej wspomniano, głównym źródłem niebiałkowych grup tiolowych w soczewkach jest GSH. Pomimo że wiele doniesień naukowych potwierdza korzystny wpływ związków pochodzenia naturalnego na GSH w soczewkach szczurów z cukrzycą [41, 42, 44, 45], istnieją również takie, które przedstawiają brak wpływu badanych związków na ten parametr [40, 46]. Brak wpływu naryngeniny na białkowe grupy tiolowe powinien zostać potwierdzony szczególnie badaniami parametrów związanych z uszkodzeniami białek, w tym uszkodzeń oksydacyjnych wpływających na ich strukturę i aktywność. Pomocna w takiej ocenie byłaby również analiza zawartości różnych frakcji białek czy też badanie Western Blot.

Podsumowanie

Na podstawie oceny wpływu naryngeniny na sumaryczne parametry opisujące stres oksydacyjny w soczewkach szczurów z eksperymentalnie wywołaną cukrzycą można stwierdzić, iż flawonoid ten wykazuje korzystne działanie antyoksydacyjne w obrębie soczewki oka, a efekt ten jest zależny od zastosowanej dawki.

Badania sfinansowano z Funduszy przeznaczonych na Rozwój Uczestników Studiów Doktoranckich – nr umowy: KNW-2-O04/D/6/K.

Literatura

- [1] Erlund I., Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology, *Nutrition Research*, 2004, 24, s. 851–874.
- [2] Cavia-Saiz M., Busto M.D., Pilar-Izquierdo M.C., Ortega N., Perez-Mateos M., Muniz P., Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90, s. 1238–1244.
- [3] Bozorgi M., Memariani Z., Mobli M., Surmaghi M.H.S., Shams-Ardekani M.R., Rahimi R., Five pistacia species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology, *The Scientific World Journal*, 2013, 2013, s. 1–33.
- [4] Bolling B.W., Blumberg J.B., Chen C.-Y. O., The influence of roasting, pasteurisation, and storage on the polyphenol content and antioxidant capacity of California almond skins, *Food Chemistry*, 2010, 123, s. 1040–1047.
- [5] Reis P.M.C.L., Dariva C., Vierira G.A.B., Hense H., Extraction and evaluation of antioxidant potential of the extracts obtained from tamarind seeds (*Tamarindus indica*), sweet variety, *Journal of Food Engineering*, 2016, 173, s. 116–123.
- [6] Bimakr M., Rahman R.A., Ganjloo A., Winter melon (*Benincasa hispida*) seeds and impact of extraction on composition [w:] *Processing and Impact on Active Components in Food*, (red.) Preedy V. Elsevier Inc., 2014. s. 407–414.
- [7] Kamara B.I., Brandt E.V., Ferreira D., Joubert E., Polyphenols from Honeybush tea (*Cyclopia intermedia*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, s. 3874–3879.
- [8] Volpi N., Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 2004, 25, s. 1872–1878.
- [9] Świeca M., Gawlik-Dziki U., Dziki D., Baraniak B., Kielki brokołu jako źródło potencjalnie bioprzyswajalnych antyoksydantów, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2012, 45, s. 488–493.
- [10] Świeca M., Baraniak B., Influence of elicitation with H₂O₂ on phenolics content, antioxidant potential and nutritional quality of *Lens culinaris* sprouts, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94, s. 489–496.
- [11] Tomas-Barberan F.A., Clifford M.N., Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80, s. 1073–1080.
- [12] Heim K.E., Taqliafferro A.R., Bobilya D.J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, 13, s. 572–584.
- [13] van Acker S.A.B.E., de Groot M., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., den Kelder D.O., van der Vijgh W.J.F., Bast A., A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids, *Chemical Research in Toxicology*, 1996, 9, s. 1305–1312.

- [14] Kapoor R., Kakkar P., Naringenin accords hepatoprotection from streptozotocin induced diabetes in vivo by modulating mitochondrial dysfunction and apoptotic signaling cascade, *Toxicology Reports*, 2014, 1, s. 569–581.
- [15] Annadurai T., Muralidharan A.R., Joseh T., Hsu M.J., Thomas P.A., Geraldine P., Anti-hyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2012, 68, s. 307–318.
- [16] Shen Y., Zhang W.Y., Chiou G.C., Effect of naringenin on NaIO₃-induced retinal pigment epithelium degeneration and laser-induced choroidal neovascularization in rats, *International Journal of Ophthalmology*, 2010, 3, s. 5–8.
- [17] Lin J.-L., Wang Y.-D., Ma Y., Zhong Ch.-M., Zhu M.-R., Chen W.-P., Lin B.-Q., Protective effects of naringenin eye drops on N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell death in rats, *International Journal of Ophthalmology*, 2014, 7, s. 391–396.
- [18] Kara S., Gencer B., Karaca T., Tufan H.A., Arikian S., Ersan I., Karaboga I., Hanci V., Protective effect of hesperetin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats, *The Scientific World Journal*, 2014, 2014, s. 1–8.
- [19] Sayin N., Kara N., Pekel G., Ocular complications of diabetes mellitus, *World Journal of Diabetes*, 2015, 6, s. 92–108.
- [20] Vinson J.A., Oxidative stress in cataracts, *Pathophysiology*, 2006, 13, s. 151–162.
- [21] Furman B.L., Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats, *Current Protocols in Pharmacology*, 2015, 70, s. 5.47.1–5.47.20.
- [22] Erel O., A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, *Clinical Biochemistry*, 2004, 37, s. 112–119.
- [23] Erel O., A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clinical Biochemistry*, 2005, 38, s. 1103–1111.
- [24] Kosecik M., Erel O., Sevinc E., Selek S., Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking, *International Journal of Cardiology*, 2005, 100, s. 61–64.
- [25] Ellman G.L., Tissue sulfhydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, 82, s. 70–77.
- [26] Sedlak J., Lindsay R.H., Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Analytical Biochemistry*, 1968, 25, s. 192–205.
- [27] Rolo A.P., Palmeira C.M., Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 212, s. 167–178.
- [28] Moussa S.A., Oxidative stress in diabetes mellitus, *Romanian Journal of Biophysics*, 2008, 18, s. 225–236.
- [29] West I.C., Radicals and oxidative stress in diabetes, *Diabetic Medicine*, 2000, 17, s. 171–180.
- [30] Threatt J., Williamson J.F., Huynk K., Davis R.M., Hermayer K., Ocular disease, knowledge and technology applications in patients with diabetes, *The American Journal of the Medical Sciences*, 2013, 345, s. 266–270.
- [31] Thiagarajan R., Manikandan R., Antioxidants and cataract, *Free Radical Research*, 2013, 47, s. 337–345.
- [32] Bisbal C., Lambert K., Avignon A., Antioxidants and glucose metabolism disorders, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2010, 13, s. 439–446.
- [33] Sadowska-Bartosz I., Bartosz G., Grune T., Sereikaite J., Role of oxidative, nitrative, and chlorinative protein modifications in aging and age-related diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018.
- [34] Stefek M., Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract, *Interdisciplinary Toxicology*, 2011, 4, s. 69–77.
- [35] Patil K.K., Meshram R.J., Dhole N.A., Gacche R.N., Role of dietary flavonoids in amelioration of sugar induced cataractogenesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 593, s. 1–11.
- [36] Acer S., Pekel G., Küçükatay V., Karabulut A., Yağcı R., Çetin E.N., Akyer Ş.P., Şahin B., Oxidative stress of crystalline lens in rat menopausal model, *Arquivos Brasileiros De Oftalmologia*, 2016, 79, s. 222–225.

- [37] Ozkol H.U., Koyuncu I., Tuluce Y., Dilsiz N., Soral S., Ozkol H., Anthocyanin-rich extract from *Hibiscus sabdariffa* calyx counteracts UVC-caused impairments in rats, *Pharmaceutical Biology*, 2015, 53, s. 1435–1441.
- [38] Pisoschi A.M., Pop A., The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 97, s. 55–74.
- [39] Dickinson D., Forman H.J., Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 973, s. 488–504.
- [40] Wojnar W., Kaczmarczyk-Sedlak I., Zych M., Diosmin ameliorates the effects of oxidative stress in lenses of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats, *Pharmacological Reports*, 2017, 69, s. 995–1000.
- [41] Suryanarayana P., Saraswat M., Mrudula T., Krishna T.P., Krishnaswamy K., Reddy G.B., Curcumin and turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2005, 46, s. 2092–2099.
- [42] Suryanarayana P., Saraswat M., Petrash J.M., Reddy G.B., *Emblica officinalis* and its enriched tannoids delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats, *Molecular Vision*, 2007, 13, s. 1291–1297.
- [43] Reddy V.S., Reddy G.B., Role of crystallins in diabetic complications, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1860, s. 269–277.
- [44] Sathaye S., Somani G., Bioactive fraction of *Saraca indica* prevents diabetes induced cataractogenesis: An aldose reductase inhibitory activity, *Pharmacognosy Magazine*, 2015, 11, s. 102.
- [45] El-Razek F.H.A., El-Metwally E.M., Shehab G.M.G., Hassan A.A., Gomaa A.N., Effects of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice on oxidative stress in diabetic cataract rats, *Saudi Journal of Health Sciences*, 2012, 1, s. 23–29.
- [46] Zhao W., Devamanoharan P.S., Henein M., Ali A.H., Diabetes-induced biochemical changes in rat lens: Attenuation of cataractogenesis by pyruvate, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2000, 2, s. 165–174.

Do cytowania:

Wojnar W., Zych M., Kaczmarczyk-Sedlak I., Wpływ naryngeniny na odpowiedź antyoksydacyjną oraz status oksydacyjny w soczewkach szczurów z cukrzycą, *Herbalism*, 2018, 1 (4), s. 17–30