

lek. dent. **Agnieszka Kossakowska**

tytuł pracy: „*Aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnie indukowanej cukrzycy typu 1*”

Streszczenie

Cukrzyca insulinozależna to choroba o charakterze ogólnoustrojowym. Zaburzenia metaboliczne w przebiegu tej choroby prowadzą do dysfunkcji wielu narządów, m.in. gruczołów ślinowych. Prawidłowe funkcjonowanie gruczołów ślinowych wynika m.in. z zachowania równowagi pomiędzy procesami degradacji i odnowy elementów komórkowych i pozakomórkowych. Jedną z grup enzymów zaangażowanych w proces przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej gruczołów ślinowych są egzoglikozydazy lizosomalne. Biorą one bowiem udział w katabolizmie glikokoniugatów macierzy. Analiza zmian aktywności specyficznej HEX, jej izoenzymów HEX A, HEX B, a także GAL, MAN, FUC i GLU w tkance gruczołów ślinowych przyuszných, jak i podżuchowych, nie była jednak dotąd przedmiotem opracowań naukowych dotyczących cukrzycy indukowanej streptozotocyną.

Dlatego też celami pracy była odpowiedź na następujące pytania:

1. Czy cukrzyca indukowana streptozotocyną wpływa na aktywność specyficzną egzoglikozydaz lizosomalnych gruczołów ślinowych?
2. Czy aktywność specyficzna egzoglikozydaz lizosomalnych w referencyjnych gruczołach ślinowych zależy od wieku szczurów?
3. Czy czas trwania cukrzycy indukowanej streptozotocyną wpływa na aktywność specyficzną egzoglikozydaz lizosomalnych w gruczołach ślinowych szczurów?
4. Czy aktywność specyficzna egzoglikozydaz lizosomalnych zależy od rodzaju badanego gruczołu ślinowego, zarówno w zdrowiu, jak i w przebiegu cukrzycy indukowanej streptozotocyną?
5. Czy cukrzyca indukowana streptozotocyną wpływa na funkcję wydzielniczą gruczołów ślinowych?
6. Czy istnieje zależność pomiędzy funkcją wydzielniczą gruczołów ślinowych a aktywnością specyficzną badanych egzoglikozydaz lizosomalnych?

Badania były przeprowadzone na dojrzałych płciowo samcach szczura szczepu Wistar. Zwierzęta zostały podzielone na dwie grupy główne: kontrolną (16 sztuk) i badaną (16 sztuk). Następnie dokonano podziału każdej z grup głównych na dwie podgrupy (8 szczurów w każdej podgrupie) w zależności od liczby tygodni liczonych od momentu indukcji cukrzycy w grupie badanej do momentu uśmiercenia szczurów (2 i 4 tygodnie). Cukrzycę indukowano poprzez dootrzewnową, pojedynczą iniekcję streptozotocyny (w buforze cytrynianowym pH 4,5; 50mg/kg masy ciała). W grupie kontrolnej wykonano dootrzewnową iniekcję buforu cytrynianowego pH 4,5 (około 0,5mL). 48 godzin po podaniu streptozotocyny, u wszystkich szczurów z grupy badanej potwierdzono cukrzycę (stężenie glukozy we krwi pobranej z żyły ogonowej >250 mg/mL). Szczury obu grup uśmiercano 2 i 4 tygodnie po indukcji cukrzycy w grupie badanej. Każdorazowo do badań pobierano ślinianki podżuchowe, przyuszne

i krew z aorty brzusznej. W surowicy krwi szczurów z indukowaną cukrzycą i szczurów z grupy kontrolnej każdorazowo oznaczono stężenie glukozy i insuliny. Ślinianki poddano homogenizacji, sonifikacji i wirowaniu. Do badań zachowano płyn nadosadowy.

W płynie nadosadowym oznaczono w próbach potrójnych: całkowitą zawartość białka metodą cynchoninową oraz aktywność specyficzną: N-acetylo- β -D-heksozoaminidazy (HEX), jej izoenzymów A i B (HEX A i HEX B), β -galaktozydazy (GAL), α -mannozydazy (MAN), α -fukozydazy (FUC), β -glukuronidazy (GLU) i amylazy ślinowej (AS).

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu Statistica10.0 (StatSoft). Porównując zmienne zależne zastosowano test ANOVA- rang Kruskala- Wallisa . Do porównania zmiennych ilościowych bez normalności rozkładu wykorzystano nieparametryczny test U Manna- Whitneya w celu oceny dwóch grup. Wyznaczono również współczynnik korelacji nieparametrycznej Spearmana. Za poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

W homogenatach ślinianek przyuszných w 2 tygodniu eksperymentu w grupie szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną:

- mediany aktywności specyficznej GAL, MAN, FUC i GLU były istotnie wyższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów w śliniankach przyuszných grupy referencyjnej (odpowiednio $p=0,0046$, $p=0,0046$, $p=0,002$, $p=0,0046$)
- mediana aktywności specyficznej GLU była istotnie wyższa w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymu w homogenatach ślinianek podżuchwowych szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną ($p=0,029$).

W homogenatach ślinianek przyuszných w 4 tygodniu eksperymentu w grupie szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną:

- mediany aktywności specyficznej HEX, HEX A, HEX B, GAL, MAN, FUC i GLU były istotnie wyższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów w śliniankach przyuszných szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną w 2 tygodniu eksperymentu (odpowiednio $p=0,029$, $p=0,0047$, $p=0,029$, $p=0,0047$, $p=0,0047$, $p=0,028$, $p=0,0047$)
- mediany aktywności specyficznej HEX A, GAL, MAN, FUC i GLU były istotnie wyższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów w śliniankach przyuszných grupy referencyjnej (odpowiednio $p=0,0046$, $p=0,0046$, $p=0,0046$, $p=0,001$, $p=0,0046$)
- mediany aktywności specyficznej HEX, HEX A, GAL były istotnie wyższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów homogenatach ślinianek podżuchwowych szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną (odpowiednio $p=0,029$, $p=0,0048$, $p=0,0047$).

W homogenatach ślinianek podżuchwowych w 2 tygodniu eksperymentu w grupie szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną:

- mediany aktywności specyficznej HEX i HEX A były istotnie wyższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów w śliniankach podżuchwowych grupy referencyjnej (odpowiednio $p=0,0048$, $p=0,0048$)
- mediany aktywności specyficznej HEX i HEX A były istotnie wyższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów w homogenatach ślinianek przyuszných szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną (odpowiednio $p=0,0046$, $p=0,029$).

W homogenatach ślinianek podżuchwowych w 4 tygodniu eksperymentu w grupie szczurów cukrzycą indukowaną streptozotocyną:

- mediany aktywności specyficznej HEX B, MAN i GLU były istotnie wyższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów w homogenatach ślinianek podżuchwowych szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną w 2 tygodniu eksperymentu (odpowiednio $p=0,029$, $p=0,0046$, $p=0,0009$)
- mediany aktywności specyficznej HEX i HEX A były istotnie niższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów w homogenatach ślinianek podżuchwowych szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną w 2 tygodniu eksperymentu (odpowiednio $p=0,029$, $p=0,0047$)
- mediany aktywności specyficznej HEX A i GAL były istotnie niższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów w śliniankach podżuchwowych grupy referencyjnej (odpowiednio $p=0,029$, $p=0,029$)
- mediana aktywności specyficznej GLU była istotnie wyższa w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymu w śliniankach podżuchwowych grupy referencyjnej ($p=0,0049$)

W homogenatach ślinianek przyuszných w 2 tygodniu eksperymentu w grupie szczurów referencyjnych:

- mediany aktywności specyficznej HEX i HEX A były istotnie wyższe w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymów w śliniankach podżuchwowych grupy referencyjnej (odpowiednio $p=0,029$, $p=0,029$).

W homogenatach ślinianek przyuszných w 4 tygodniu eksperymentu w grupie szczurów referencyjnych:

- mediana aktywności specyficznej GAL była istotnie wyższa w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymu w homogenatach ślinianek przyuszných grupy referencyjnej w 2 tygodniu eksperymentu ($p=0,0046$)
- mediana aktywności specyficznej HEX A była istotnie niższa w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymu w homogenatach ślinianek przyuszných grupy referencyjnej w 2 tygodniu eksperymentu ($p=0,028$).

W homogenatach ślinianek podżuchwowych w 2 tygodniu eksperymentu w grupie szczurów referencyjnych:

- mediana aktywności specyficznej MAN była istotnie wyższa w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymu w śliniankach przyusznym grupy referencyjnej ($p=0,0048$).

W homogenatach ślinianek podżuchwowych w 4 tygodniu eksperymentu w grupie szczurów referencyjnych:

- mediana aktywności specyficznej GAL była istotnie wyższa w porównaniu do mediany aktywności specyficznej w/w enzymu w śliniankach podżuchwowych grupy referencyjnej w 2 tygodniu eksperymentu ($p=0,0048$).

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Cukrzyca indukowana streptozotocyną powoduje istotne zmiany aktywności większości badanych egzoglikozydaz lizosomalnych w gruczołach ślinowych szczurów.
2. Wiek szczura nie wpływa na aktywność specyficzną większości badanych egzoglikozydaz lizosomalnych w referencyjnych gruczołach ślinowych.
3. Aktywność specyficzna większości badanych egzoglikozydaz lizosomalnych w diabetycznych gruczołach ślinowych zmienia się istotnie wraz z czasem trwania choroby.
4. Aktywność specyficzna egzoglikozydaz lizosomalnych nie zależy od rodzaju badanego gruczołu ślinowego, zarówno w zdrowiu, jak i w przebiegu cukrzycy indukowanej streptozotocyną.
5. Cukrzyca indukowana streptozotocyną prowadzi do zaburzeń funkcjonowania ślinianek przyusznym, czego wyrazem jest istotne obniżenie aktywności specyficznej amylazy ślinowej i całkowitej zawartości białka.
6. Wzrost aktywności HEX B może prowadzić do upośledzenia funkcji wydzielniczej ślinianki przyusznej.