

STRESZCZENIE

Cukrzyca typu 1 jest schorzeniem metabolicznym, prowadzącym do zniszczenia komórek β trzustki produkujących insulinę. Rozpoznanie cukrzycy typu 1 bazuje głównie na ocenie gospodarki węglowodanowej (glikemia na czczo, test obciążeniowy) i przeciwciał skierowanych do różnych antygenów związanych z komórkami β trzustki. Nadal poszukuje się innych parametrów pozwalających również na ocenę dynamiki funkcjonowania trzustki, rokowania i postępu choroby. Coraz częściej wskazuje się użyteczność diagnostyczną egzoglikozydaz lizosomalnych w licznych schorzeniach. Enzymy te katalizują reakcje rozpadu wiązań glikozydowych w łańcuchach cukrowych. Tworzą ciągi reakcji, w których produkt jednej reakcji stanowi substrat kolejnej reakcji. Zmiany aktywności egzoglikozydaz lizosomalnych informują o katabolizmie, stopniu przebudowy komórek i istoty międzykomórkowej. Ich znaczenie w rozwoju uszkodzeń trzustki w przebiegu cukrzycy nie było dotychczas opisywane.

Celem głównym pracy było określenie aktywności N-acetylo- β -heksozaminidazy (HEX) oraz jej izoenzymów A i B, β -galaktozydazy (GAL), β -glukuronidazy (GLU), α -mannozydazy (MAN), α -fukozydazy (FUC) w trzustkach szczurów z eksperymentalnie wyindukowaną cukrzycą typu 1. Ponadto, zbadano wpływ myriocinu, inhibitora ścieżki *de novo* syntezy ceramidów, prekursorów substratów egzoglikozydaz, na aktywność wybranych egzoglikozydaz lizosomalnych w trzustkach szczurów zdrowych i z cukrzycą typu 1.

Badania zostały przeprowadzone na szczurach, stada outbredowego Wistar. Cukrzycę wyindukowano jednorazowym, dootrzewnowym podaniem streptozotocyny (STZ). Myriocin podawano dootrzewnowo przez 7 dni. Po 2 lub 4 tygodniach trwania eksperymentu szczury uśmiercono, pobrano trzustki i krew żylną do badań biochemicznych. Na przeprowadzenie eksperymentu uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 106/2015.

W krwi żyłnej oznaczono stężenia glukozy a w homogenatach trzustki oceniono aktywność specyficzną egzoglikozydaz lizosomalnych: HEX i jej izoenzymów A i B, GLU, GAL, MAN oraz FUC metodą kolorymetryczną, zbadano stężenie białka całkowitego za pomocą komercyjnego zestawu diagnostycznego BCATM Protein Assay Kit.

Wykazano w trzustkach szczurów grupy kontrolnej utrzymywanej przez 4 tygodnie zmniejszenie aktywności specyficznej HEX, HEX A, ale wzrost aktywności specyficznej MAN i GLU w porównaniu do grupy kontrolnej 2 tygodniowej. Po dwóch tygodniach od podania STZ odnotowano znaczącą hiperglikemię i zaobserwowano zmniejszenie stężenia białka

całkowitego oraz aktywności specyficznej HEX B trzustkach. Wydłużenie czasu trwania eksperymentu spowodowało nasilenie hiperglikemii, ale zmniejszenie stężenia białka całkowitego i aktywności specyficznej HEX, HEX A i HEX B oraz FUC i GLU, ale zwiększenie GAL w trzustkach szczurów z cukrzycą trwającą 4 tygodnie. Myriocin zastosowany szczurom bez cukrzycy znacząco zwiększył w trzustkach szczurów aktywność specyficzną HEX i HEX A oraz GAL ale zmniejszył stężenie białka całkowitego i aktywność specyficzną HEX B i GLU. W trzustkach szczurów grup cukrzycowych po podaniu myriocinu odnotowano znamienne obniżenie stężenia białka całkowitego. W trzustkach szczurów po dwóch tygodniach od podania STZ i po tygodniu podawania myriocinu odnotowano wzrost aktywności specyficznej HEX wobec grupy kontrolnej 2 tygodniowej oraz HEX B i GLU w porównaniu do grupy cukrzycy 2 tygodniowej. Myriocin podany szczurom z 4 tygodniową cukrzycą spowodował nasilenie aktywności specyficznej HEX, HEX A, MAN i FUC, gdy wartości porównano z grupą kontrolną 4 tygodniową lub 4 tygodniową cukrzycą, ale zmniejszył aktywność specyficzną HEX B, GLU i GAL wobec grupy kontrolnej 4 tygodniowej.

Uzyskane wyniki pozwoliły sformułować następujące wnioski:

1. Różna aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych od najefektywniejszej HEX i GLU do najmniej efektywnej HEX B w trzustkach zdrowych szczurów sugeruje zakres katabolizmu egzoglikozydaz w tym narządzie.
2. Aktywność specyficzna HEX i jej izoenzymów oraz GLU, GAL, MAN oraz FUC w trzustce szczurów zależy od czasu trwania cukrzycy.
3. Myriocin zmienia aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych w odmienny sposób w trzustkach zdrowych i uszkodzonych streptozotocyną oraz istnieje zależność jego działania w badanym zakresie od czasu trwania hiperglikemii.
4. Myriocin nasilając aktywność egzoglikozydaz lizosomalnych nie ogranicza degradacji trzustki w przebiegu cukrzycy typu 1.

ABSTRACT

Type 1 diabetes is a metabolic disease that leads to the destruction of insulin-producing pancreatic β cells. Diagnosis of type 1 diabetes is mainly based on the assessment of carbohydrate metabolism (fasting glucose, stress test) and antibodies directed to various antigens associated with pancreatic β cells. Other parameters are still being sought to assess the dynamic of pancreas functioning, prognosis and disease progression. The diagnostic usefulness of lysosomal exoglycosidases in many diseases is increasingly recommended. These enzymes catalyze the reactions of glycosidic bonds breakdown in sugar chains. They form reaction sequences in which the product of one reaction is the substrate of the next one. Changes in the activity of lysosomal exoglycosidases inform about catabolism, degree of cell remodeling and the intercellular being. Their importance in the development of pancreatic damage in the course of diabetes has not been described yet. The main aim of the study was to determine the activity of N-acetyl- β -hexosaminidase (HEX), its isoenzymes A and B, β -galactosidase (GAL), β -glucuronidase (GLU), α -mannosidase (MAN), and α -fucosidase (FUC) in rats pancreas with experimentally induced type 1 diabetes. In addition, the effect of myriocin, *de novo* pathway inhibitor of ceramide synthesis, precursors of exoglycosidase substrates, on the activity of selected lysosomal exoglycosidases in the pancreas of healthy and type 1 diabetic rats was examined. The studies were conducted on male Wistar rats. Diabetes was induced by a single intraperitoneal administration of streptozotocin (STZ). Myriocin was administered intraperitoneally for 7 days. After 2 or 4 weeks of experiment duration, rats were sacrificed, pancreas and venous blood were taken for biochemical testing. The experiment was approved by the Local Ethics Committee for Animal Experiments No. 106/2015. Glucose levels were determined in venous blood. In pancreatic homogenates specific activity of lysosomal exoglycosidases: HEX and its isoenzymes A and B, GLU, GAL, MAN, and FUC were assessed by colorimetric method. Total protein concentration was tested using the BCATM Protein Assay Kit commercial diagnostic kit. In the pancreas of rats from control group maintained for 4 weeks reduction of the specific activity of HEX, HEX A, but an increase in the specific activity of MAN and GLU was shown, compared to the 2 week control group. Two weeks after administration of STZ, significant hyperglycemia was noted and a decrease in total protein concentration and specific HEX B pancreatic activity was observed. Increase in duration of the experiment resulted in an increase hyperglycemia, but a decrease in total protein and specific activity of HEX, HEX A and HEX B as well as FUC and GLU, but an increase in GAL in the pancreas of diabetic rats after 4 weeks of experiment.

Myriocin used in non-diabetic rats significantly increased the specific activity of HEX, HEX A and GAL in the pancreas but decreased the total protein concentration and the specific activity of HEX B and GLU. In the pancreas of diabetic rats after administration of myriocin, a significant decrease in total protein concentration was noted. Two weeks after the administration of STZ and one week after the administration of myriocin, an increase in HEX specific activity was observed vs. the 2 week control group, and HEX B and GLU compared to the 2 week diabetes group. Myriocin administered to 4 week diabetes rats caused an increase in the specific activity of HEX, HEX A, MAN and FUC when the values were compared with 4 week control group or 4 weeks of diabetes, but reduced the specific activity of HEX B, GLU and GAL with respect to the 4 week control group.

The results obtained have led to the following conclusions:

1. Different lysosomal exoglycosidase activity with the most effective HEX and GLU to the least effective HEX B in pancreas of healthy rats suggests catabolic range of exoglycosidases in this organ.
2. Specific activity of HEX and its isoenzymes as well as GLU, GAL, MAN and FUC in the pancreas of rats depends on the duration of diabetes.
3. Myriocin changes the activity of lysosomal exoglycosidases in a different way in healthy pancreas and those damaged by streptozotocin, and there is a relationship between its action and the duration of hyperglycemia in the tested range.
4. Myriocin by increasing the activity of lysosomal exoglycosidases, does not limit degradation of pancreas in type 1 diabetes.