lek. dent. Irena Daniszewska

temat pracy: *„Parametry stresu oksydacyjnego w tkance gruczołów ślinowych w przebiegu eksperymentalnej cukrzycy typu 1”*

Streszczenie

W warunkach fizjologicznych, w żywym organizmie istnieje stan równowagi pomiędzy wytwarzaniem a neutralizacją RFT, dlatego też nie obserwuje się ani nasilonej oksydacyjnej modyfikacji składników komórkowych ani wzmożonej odpowiedzi antyoksydacyjnej. W przebiegu cukrzycy dochodzi do zaburzeń równowagi redox w kierunku reakcji utleniania. Obserwuje się istotny wzrost stężeń licznych produktów oksydacyjnej modyfikacji składników komórek w wielu narządach i surowicy, zarówno u pacjentów, jak i w badaniach doświadczalnych. Niewiele natomiast jest wiadomo na temat stresu oksydacyjnego i oksydacyjnych uszkodzeń w gruczołach ślinowych w przebiegu cukrzycy. Do oceny obecności czy też nasilenia stresu oksydacyjnego w gruczołach ślinowych szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną stosowane były zmiany aktywności bariery antyoksydacyjnej w postaci zredukowanego poziomu endogennych, nieenzymatycznych antyoksydantów czy też wzmocnionej/osłabionej aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Są to błędne praktyki, gdyż najbardziej wiarygodnym markerem stresu oksydacyjnego jest wzrost stężeń oksydacyjnie zmodyfikowanych biomolekół. Wyróżnia się wiele markerów oceniających intensywność stresu oksydacyjnego, jak również stopień wywoływanych przez niego uszkodzeń oksydacyjnych. Do powszechnie stosowanych metod w przypadku peroksydacji lipidów zalicza się oznaczanie stężenia 8-izoprostanów (8-isoP), stężenie adduktów utlenionych lipoprotein niskiej gęstości/malonylodialdehydu (oxyLDL/MDA), adduktów 4-hydroksynonenalu z białkami, w przypadku białek- oznaczanie stężenia grup karbonylowych (PC), w przypadku DNA- stężenia 8-hydroksy-D-guanozyny (8-OHdG). W celu zobrazowania intensywności stresu oksydacyjnego oraz oceny stopnia zaburzeń równowagi oksydo-redukcyjnej zalecanym parametrem jest indeks stresu oksydacyjnego (OSI).

Celem pracy była

1. Ocena występowania i nasilenia oksydacyjnych uszkodzeń gruczołów ślinowych szczurów, mierzonego stężeniem grup karbonylowych, 8-izoprostanów, adduktów 4HNE z białkami, oxyLDL/MDA, 8-OHdG, OSI w dwóch okresach cukrzycy indukowanej streptozotocyną.
2. Porównanie oksydacyjnych uszkodzeń i zaburzenia równowagi redox mierzonych stężeniem grup karbonylowych, 8-izoprostanów, adduktów 4HNE z białkami, oxyLDL/MDA, 8-OHdG, OSI pomiędzy gruczołem przyusznym a podżuchwowym w dwóch okresach eksperymentalnej cukrzycy.
3. Ocena funkcji wydzielniczej gruczołów ślinowych szczurów w dwóch okresach cukrzycy indukowanej streptozotocyną.

Celem pracy było również uzyskanie odpowiedzi na pytania:

4. Czy istnieje związek pomiędzy badanymi parametrami stresu oksydacyjnego mierzonymi w surowicy krwi a mierzonymi w gruczołach ślinowych szczurów w dwóch okresach cukrzycy indukowanej streptozotocyną?
5. Czy istnieje związek pomiędzy badanymi parametrami stresu oksydacyjnego w gruczołach ślinowych szczurów a funkcją wydzielniczą gruczołów ślinowych w dwóch okresach eksperymentalnej cukrzycy?
6. Czy istnieje związek pomiędzy hiperglikemią a oksydacyjnym uszkodzeniem gruczołów ślinowych w dwóch okresach eksperymentalnej cukrzycy?

Badania przeprowadzono na (około 6 tygodniowych) samcach szczurów rasy Wistar o początkowej masie ciała 180-210 g. Przez cały czas trwania eksperymentu zwierzęta przebywały w standaryzowanych warunkach. Okres adaptacji do nowych warunków środowiskowych trwał 7 dni. Zwierzęta podzielono losowo na dwie grupy główne: kontrolną (16 sztuk) i badaną (16 sztuk), w których wyodrębniono po dwie podgrupy (8 szczurów w każdej podgrupie) w zależności od czasu trwania cukrzycy (tj. 7 i 14 dni). Cukrzycę indukowano poprzez dootrzewnową, jednorazową iniekcją streptozotocyny w buforze cytrynianowym o pH 4,5 w dawce 50 mg/kg masy ciała. W grupie kontrolnej wykonano jednorazową dootrzewnową iniekcję buforu cytrynianowego, pH 4,5 o objętości równej 0,5 mL. Po upływie 48 godzin od iniekcji streptozotocyny, we krwi pobranej z żyły ogonowej oznaczono u wszystkich szczurów stężenie glukozy we krwi żylnej. W grupie badanej stwierdzono glikemię >250 mg/mL, co pozwoliło potwierdzić cukrzycę. Szczury obu grup uśmiercono po 7 i 14 dniach po indukcji cukrzycy w grupie badanej. Każdorazowo do badań pobierano: ślinę stymulowaną i niestymulowaną, krew z aorty brzusznej, obie ślinianki podżuchwowe i przyuszne. W surowicy krwi szczurów z indukowaną cukrzycą i szczurów w grupie

kontrolnej, oznaczano stężenie insuliny, glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych oraz pH. Ślinianki poddano homogenizacji, sonifikacji i wirowaniu. Do dalszych badań zachowano płyn nadosadowy.

W płynach nadosadowych i surowicy krwi oznaczono: metodą Ellisa: stężenie adduktów 4-HNE z białkami, 8-isoP, oxy-LDL/MDA, 8-OHdG; metodami kolorymetrycznymi: całkowite stężenie białka i PC, wartości TAS, TOS, wyliczono OSI.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu Statistica 10.0 (Stat Soft). Do porównania zmiennych zależnych zastosowano test Kruskal-Wallis ANOVA. Oceny współczynnika korelacji dokonano za pomocą testu Spearmana. W celu oceny dwóch grup do porównania zmiennych ilościowych bez normalności rozkładu wykorzystano nieparametryczny test U Manna-Whitneya. Za poziom istotności przyjęto $p<0.05$

Wyniki

Mediana niestymulowanego wydzielania śliny była istotnie zmniejszona w grupie szczurów z cukrzycą indukowaną STZ w porównaniu do grupy kontrolnej w drugim tygodniu eksperymentu (p=0,034). Mediana stymulowanego wydzielania śliny była istotnie zmniejszona w grupie szczurów z cukrzycą indukowaną STZ w porównaniu do grupy kontrolnej zarówno w pierwszym, jak i w drugim tygodniu eksperymentu (odpowiednio p=0,03 i p=0,011).

Przez cały okres trwania, tj. w pierwszym i drugim tygodniu, eksperymentu obserwowano istotny wzrost stężenia PC (odpowiednio p=0,046 i p=0,049), adduktów 4-HNE z białkami (odpowiednio p=0,00001 i p=0,00001), oxyLDL/MDA (odpowiednio p=0,009 i p=0,0006), 8-isoP (odpowiednio p=0,01 i p=0,007), a także istotnie wyższe wartości TOS (odpowiednio p=0,0001 i p=0,0002) i OSI (odpowiednio p=0,003 i p=0,001) w surowicy krwi szczurów z cukrzycą indukowaną STZ w porównaniu do szczurów kontrolnych. W drugim tygodniu trwania eksperymentu w surowicy krwi szczurów z cukrzycą indukowaną STZ zaobserwowano istotny spadek wartości TAS (p=0,003) i istotny wzrost stężenia 8-OHdG (p=0,009) *vs.* grupa kontrolna.

Zarówno w pierwszym, jak i drugim tygodniu eksperymentu mediana wartości TAS (odpowiednio p=0,002 i p=0,0001) była istotnie niższa, a mediany wartości TOS (odpowiednio p=0,006 i p=0,0001) i OSI (odpowiednio p=0,0001 i p=0,00001) oraz stężeń adduktów 4-HNE z białkami (odpowiednio p=0,001 i p=0,0001) i PC (odpowiednio p=0,03 i p=0,01) były istotnie wyższe w homogenatach ślinianek przyusznych szczurów z cukrzycą indukowaną STZ w porównaniu do grupy kontrolnej. W drugim tygodniu eksperymentu mediany stężeń oxyLDL/MDA (p=0,03), 8-isoP (p=0,004), jak również 8-OHdG (p=0,001) były istotnie wyższe w homogenatach ślinianek przyusznych szczurów z cukrzycą indukowaną STZ w porównaniu do grupy kontrolnej.

Mediana wartości TAS była istotnie wyższa (p=0,04) w pierwszym tygodniu oraz istotnie niższa (p=0,04) w drugim tygodniu w homogenatach ślinianek podżuchwowych szczurów z

cukrzycą indukowaną STZ w porównaniu do ślinianek kontrolnych. Zarówno w pierwszym, jak i drugim tygodniu eksperymentu mediana wartości mediany wartości TOS (odpowiednio p=0,03 i p=0,02) i OSI (odpowiednio p=0,03 i p=0,002) były istotnie wyższe w homogenatach ślinianek podżuchwowych szczurów z cukrzycą indukowaną STZ w porównaniu do grupy kontrolnej. W drugim tygodniu eksperymentu mediany stężeń oxyLDL/MDA (p=0,02) i adduktów 4-HNE z białkami (p=0,002) były istotnie wyższe w homogenatach ślinianek podżuchwowych szczurów z cukrzycą indukowaną STZ w porównaniu do grupy kontrolnej.

W 1 tygodniu eksperymentu mediana wartości TAS (p=0,039), w drugim tygodniu mediana stężenia 8-OHdG (p=0,001), natomiast w pierwszym, jak i w drugim tygodniu eksperymentu mediany wartości TOS (odpowiednio p=0,0002 i p=0,002), OSI (odpowiednio p=0,0001 i p=0,0001) oraz mediany stężeń PC (odpowiednio p=0,02 i p=0,04), adduktów 4-HNE z białkami (odpowiednio p=0,032 i p=0,001), oxyLDL/MDA (odpowiednio p=0,03 i p=0,03) oraz 8-isoP (odpowiednio p=0,04 i p=0,039) w homogenatach ślinianek przyusznych szczurów z cukrzycą indukowaną STZ **były istotnie wyższe** w porównaniu do wartości uzyskanych w homogenatach ślinianek podżuchwowych tej grupy szczurów.

Zarówno w pierwszym, jak i drugim tygodniu eksperymentu mediana wartości TAS (odpowiednio p=0,001 i p=0,001) i TOS (odpowiednio p=0,0001 i p=0,001) w homogenatach ślinianek przyusznych szczurów kontrolnych były istotnie wyższe w porównaniu do wartości uzyskanych w homogenatach ślinianek podżuchwowych tej grupy szczurów

Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

1. W obu gruczołach ślinowych zjawisko stresu oksydacyjnego nasila się wraz z czasem trwania eksperymentalnej cukrzycy.
2. Większe zaburzenia równowagi redox i większą różnorodność oksydacyjnych modyfikacji obserwuje się w gruczole przyusznym *vs*. podżuchwowy bez względu na czas trwania choroby.
3. Redukcja wydzielania śliny stymulowanej nasila się wraz z czasem trwania eksperymentalnej cukrzycy. Wydzielanie niestymulowane ulega zmniejszeniu w zaawansowanym stadium cukrzycy streptozotocynowej. Bez względu na etap cukrzycy indukowanej streptozotocyną, dochodzi do zaburzeń funkcjonowania obu typu ślinianek, czego wyrazem jest istotne obniżenie całkowitej zawartości białka.
4. Brak zależności pomiędzy markerami stresu oksydacyjnego w surowicy i gruczołach ślinowych sugeruje, że nasilenie oksydacyjnych modyfikacji ich składników komórkowych jest wynikiem patologicznych procesów toczących się w gruczołach ślinowych, niezależnie od ogólnoustrojowego stresu oksydacyjnego.

5. Odnotowana ujemna korelacja pomiędzy stężeniem adduktów 4-HNE z białkami w gruczole przyusznym a wydzielaniem stymulowanym może być przyczyną zmniejszonej sekrecji tego rodzaju śliny w przebiegu cukrzycy streptozotocynowej.

6. Hiperglikemia wydaje się mieć związek z oksydacyjnm uszkodzeniem obu rodzaju ślinianek w zaawansowanym okresie choroby, nie wpływając na równowagę redox w okresie wcześniejszym.