

СУРФАКТАНТНИЙ ПРОТЕЇН А1 (SP-A1) – МОЛЕКУЛЯРНИЙ БІОМАРКЕР УШКОДЖЕННЯ ЛЕГЕНЬ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

©Л. М. Заяць, Ю. В. Федорченко

Івано-Франківський національний медичний університет

РЕЗЮМЕ. Цукровий діабет посідає одне з перших місць у структурі ендокринних захворювань і вражає багато органів, у тому числі й легені. Важливою ланкою в патогенезі захворювань органів дихання є стан сурфактанту легень і зокрема сурфактантного протеїну А1 (SP-A1). У науковій літературі недостатньо даних щодо використання сироваткового SP-A1 як потенційного біомаркера ушкодження легень.

Мета – оцінити інформативність вмісту сурфактантного протеїну А1 в сироватці крові в якості прогностичного біомаркера ушкодження легень при експериментальному цукровому діабеті.

Матеріал і методи. Модель цукрового діабету відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення білим щурам стрептозотоцину фірми «Sigma» (США), розведеного в 0,1 М цитратному буфері з рН 4,5, з розрахунку 60 мг/кг маси тіла. Контрольній групі тварин внутрішньоочеревинно вводили еквівалентну дозу 0,1 М цитратного буферного розчину з рН 4,5. У сироватці крові визначали вміст SP-A1 за методом імуноферментного аналізу з використанням наборів Rat ELISA Kits (США) через 14, 28, 42 і 70 діб після ін'єкції стрептозотоцину.

Результати. Проведені біохімічні дослідження сироватки крові показали, що у тварин з цукровим діабетом спостерігається підвищення рівня SP-A1 на всіх етапах експерименту. Зокрема, вміст SP-A1 у сироватці крові зріс через 14 діб на 7,9 %, через 28 діб на 49,0 %, через 42 доби на 69,5 % і через 70 діб на 91,6 %, порівняно з показниками контрольної групи тварин.

Висновки. Експериментальний цукровий діабет протягом усього періоду дослідження супроводжується підвищенням у сироватці крові вмісту сурфактантного протеїну А1 і може розглядатись в якості молекулярного біомаркера легеневого ушкодження при даній патології.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: експериментальний цукровий діабет; сурфактантний протеїн А1; біомаркер.

Вступ. На сьогодні цукровий діабет посідає одне з перших місць у структурі ендокринних захворювань. Гостроту проблеми визначає не лише значне поширення, але й швидкий розвиток ускладнень, які спричиняють інвалідизацію, погіршують якість життя хворих та скорочують його тривалість [1, 2, 3, 4]. Встановлено, що діабет – це захворювання, яке вражає багато органів, таких як нирки, печінку, очі та серцево-судинну систему. На сьогодні з'являється все більше доказів того, що легені також є одним із органів-мішеней при ЦД [5–7].

В експериментальних і клінічних дослідженнях доведено, що важливою ланкою в патогенезі багатьох захворювань органів дихання є стан сурфактанту легень (СЛ), який являє собою білково-ліпідно-вуглеводний комплекс. На частку ліпідів припадає 80–90 %, протеїнів – 10–20 % і близько 2 % – на вуглеводи. Всі сурфактантні протеїни представлені білками: SP-A1 (Surfactant Protein A1 ~ 5,3 %), SP-D (~0,6 %), SP-B (~0,7 %) і SP-C (~0,4 %) [8, 9]. Серед білкових компонентів сурфактанту SP-A1 є основним протеїном СЛ, який має виражені імуномодулювальні властивості. SP-A1 покращує опсонічний і неопсонічний фагоцитоз, сприяє активній абсорбції фосfolіпідів на межі розділу повітря – рідина. Поряд з цим, SP-A1 стимулює хемотаксис макрофагів, впливає на проліферацію клітин імунної відповіді і на продукцію цитокінів, підвищує продукцію реактив-

них оксидантів [10–12]. Недавні клінічні дослідження показали, що SP-A1, як сироватковий біомаркер, може використовуватися для діагностики захворювання легень, а також для терапевтичних результатів застосування антифіброзних препаратів [13, 14].

Мета – оцінити інформативність вмісту SP-A1 у сироватці крові в якості прогностичного біомаркера ушкодження легень при експериментальному цукровому діабеті.

Матеріал і методи дослідження. Експерименти виконані на 88 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 170–210 г, яких утримували на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води. Тварини були поділені на три групи: 1 – інтактна (n=10); 2 – контрольна (n=40); 3 – експериментальна (n=38) з моделлю цукрового діабету, який відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину фірми «Sigma» (США), розведеного в 0,1 М цитратному буфері з рН 4,5, з розрахунку 60 мг/кг маси тіла. Контрольній групі тварин внутрішньоочеревинно вводили еквівалентну дозу 0,1 М цитратного буферного розчину з рН 4,5.

Утримання тварин та дослідження проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006),

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Усі дослідження здійснювались під тіопенталнатрієвим знеболюванням із розрахунку 60 мг/кг ваги. Забір крові для біохімічного дослідження проводили через 14, 28, 42 і 70 діб після ін'єкції стрептозотоцину. Вміст SP-A1 у сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням наборів Rat ELISA Kits (Elabscience, США) згідно з інструкцією фірми-виробника.

При проведенні статистичної обробки отриманих результатів була використана програма STATISTICA 10. За допомогою можливостей описової статистики усі отримані в дослідженні кількісні дані спочатку перевірили на тип їх розподілу за тестом Шапіро – Уїлка. Оскільки абсолютна більшість цих даних відповідала нормальному закону

Гауса, для описання центральної тенденції обрано середнє арифметичне \pm стандартна похибка ($M \pm m$), а для оцінки достовірності відмінностей отриманих результатів у групах порівняння (дослідна і контрольна) та перевірки нульової гіпотези – параметричний t-тест (критерій Стьюдента). Для оцінки достовірності змін даних у динаміці (14, 28, 42, 70 діб) всередині кожної з груп порівняння застосували непараметричний метод для трьох і більше груп порівняння – дисперсійний аналіз Фрідмана та коефіцієнт конкордантності Кендала (Friedman ANOVA and Kenall Coef. of Concordance).

Результати й обговорення. Проведені дослідження показали, що у тварин із ЦД спостерігається підвищення у сироватці крові рівня SP-A1 у порівнянні з аналогічними показниками контрольної групи тварин на всіх етапах експерименту (табл. 1, рис. 1).

Таблиця 1. Вміст SP-A1 (пг/мл) у сироватці крові білих щурів при експериментальному цукровому діабеті

Група	14 діб		28 діб		42 діб		70 діб		P ₂
	M	±m	M	±m	M	±m	M	±m	
Дослід	94,2*	1,28	131,1*	1,11	147,1*	1,71	168,4*	1,21	<0,001
Контроль	87,3	0,98	88,0	0,76	86,8	0,88	87,9	0,84	>0,05
P ₁	<0,01		<0,001		<0,001		<0,001		x
Інтактні	88,4±0,73								

Примітки: 1. p₁ – достовірність різниці даних дослідної і контрольної груп;

2. p₂ – достовірність даних всередині групи в динаміці;

3. * – достовірність різниці даних у порівнянні з інтактною групою.

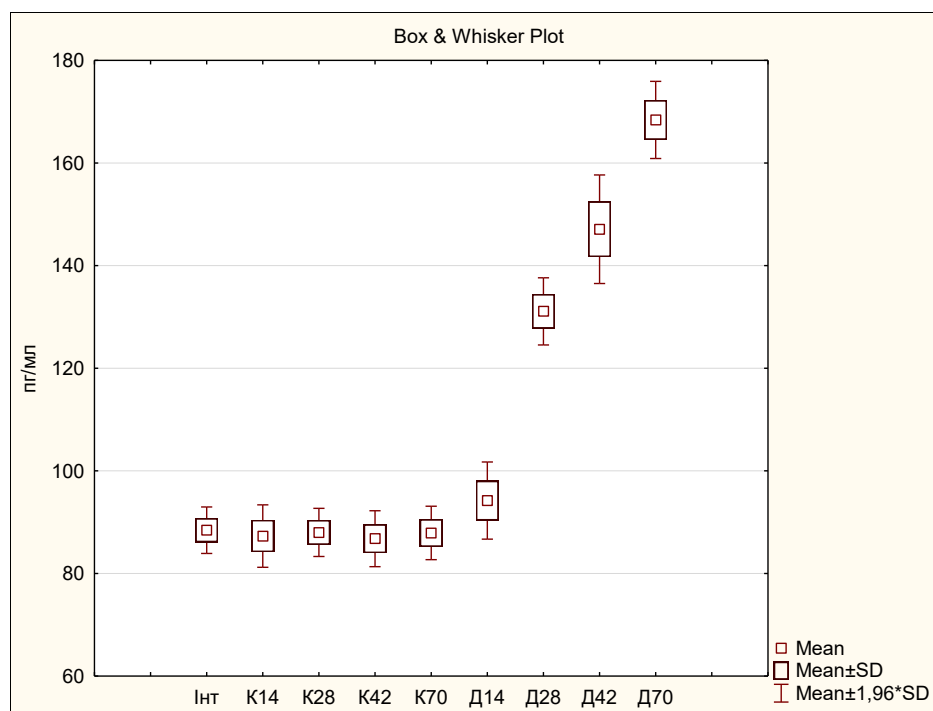


Рис. 1. Динаміка вмісту SP-A1 (пг/мл) у сироватці крові білих щурів при експериментальному цукровому діабеті. Примітка. Групи тварин: Інт – інтактна; К – контрольна; Д – дослідна. 14, 28, 42, 70 – дні експерименту.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

Зокрема було встановлено, що через 14 діб після моделювання ЦД, рівень SP-A1 у сироватці крові перевищував аналогічний показник контрольної групи тварин на 7,9 % ($p < 0,01$). Зі збільшенням терміну дослідження (28 діб) вміст SP-A1 у сироватці крові зріс на 49,0 % ($p < 0,001$). Через 42 доби експерименту відмічалось подальше збільшення SP-A1 у сироватці крові. При цьому було встановлено, що величина даного сурфактантного протеїну перевищувала аналогічний показник контрольної групи тварин на 69,5 % ($p < 0,001$). Максимальне підвищення SP-A1 у сироватці крові відмічається через 70 діб після початку експерименту. Було встановлено, що на даний період дослідження рівень SP-A1 у сироватці крові перевищував аналогічний показник контрольної групи тварин на 91,6 % ($p < 0,001$).

Як свідчать літературні дані [9, 12], синтез і секрецію гідрофільного SP-A1 здійснюють альвеоцити 2 типу. Тому, безумовно, найвища його концентрація знаходиться в альвеолах. Причиною підвищення вмісту SP-A1 у сироватці крові є запальний процес із ушкодженням складових компонентів аерогематичного бар'єру і підвищенням їх проник-

ності для сурфактантних протеїнів. В окремих дослідженнях було встановлено, що сироваткові рівні SP-A1 корелюють з індексом запалення, який представляє надійний показник альвеоліту [15].

Отримані нами дані свідчать про те, що SP-A1 може відображати ушкодження легеневого епітелію та, як наслідок, збільшення його проникності, і бути ідентифікований як потенційний молекулярний біомаркер ушкодження легень при даній патології. На зміни аналогічного характеру вказують і ряд інших дослідників, підтримуючи концепцію, що підвищені сироваткові рівні SP-A1 використовуються як біомаркери ушкодження легеневої тканини при різноманітних захворюваннях [12, 15].

Висновки. Експериментальний цукровий діабет протягом усього періоду дослідження супроводжується підвищенням у сироватці крові вмісту сурфактантного протеїну A1 і може розглядатись в якості молекулярного біомаркера легеневого ушкодження при даній патології.

Перспективи подальших досліджень. Планується вивчення ультраструктурної організації компонентів респіраторного відділу легень за умов впливу SP-A1.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ситник І. М. Застосування антиоксидантів за цукрового діабету I типу / І. М. Ситник, М. В. Хайтович // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – 6 (46). – С. 3–11.
2. Глоба Є. В. Моногенний діабет в Україні: гени, фенотип, лікування / Є. В. Глоба, Н. Б. Зелінська, І. Ю. Шевченко // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2017. – № 3 (59). – С. 41–49. DOI: 10.24026/1818-1384.3(59).2017.110893.
3. The Serum Level of KL-6 Is Associated with the Risk of Insulin Resistance and New-onset Diabetes Mellitus: The Tanno-Sobetsu Study / H. Akasaka, H. Ohnishi, Y. Narita [et al.] // Internal Medicine. – 2017. – No. 56. – P. 3009–3018. DOI: 10.2169/internalmedicine.8716-16.
4. Rajasurya V. Interstitial lung disease and diabetes / V. Rajasurya, K. Gunasekaran, S. Surani // World Journal of Diabetes. – 2020. – No. 11 (8). – P. 351–357. DOI: 10.4239/wjd.v11.i8.351.
5. Pulmonary function and sleep breathing: two new targets for type 2 diabetes care / A. Lecube, R. Simo, M. Pallayova [et al.] // Endocr. Rev. – 2017. – No. 38. – P. 550–573. DOI: 10.1210/er.2017-00173.
6. Potential Biochemical Mechanisms of Lung Injury in Diabetes / H. Zheng, J. Wu, Z. Jin, L.-J. Yan // Aging and Disease. – 2017. – No. 8 (1). – P. 7–16. DOI: 10.14336/AD.2016.0627.
7. Editorial: Diabetes and Obesity Effects on Lung Function / X.-F. Chen, L.-J. Yan, A. Lecube, X. Tang // Frontiers in Endocrinology. – 2020. – No. 11 (462). – P. 1–2. DOI: 10.3389/fendo.2020.00462.
8. Human surfactant protein SP-A1 and SP-A2 variants differentially affect the alveolar microenvironment, surfactant structure, regulation and function of the alveolar macrophage, and animal and human survival under various conditions / I. Floros, N. Thorenoor, N. Tsotakos, D. S. Phelps // Front. Immunol. – 2021. – No. 12. – P. 2889. DOI: 10.3389/fimmu.2021.681639.
9. Depicolzuane L. Surfactant Protein-A Function: Knowledge Gained From SP-A Knockout Mice / L. Depicolzuane, D. S. Phelps, J. Floros // Frontiers in Pediatrics. – 2022. – No. 9. – P. 799693. DOI: 10.3389/fped.2021.799693.
10. Innate immunity of surfactant protein A in experimental otitis media / O. Abdel-Razek, L. Ni, F. Yang, G. Wang // Innate Immun. – 2019. – No. 25. – P. 391–400. DOI: 10.1177/1753425919866006.
11. Sex-specific regulation of gene expression networks by surfactant protein A (SP-A) variants in alveolar macrophages in response to klebsiella pneumoniae / N. Thorenoor, Y. I. Kawasaki, C. K. Gandhi, J. Floros // Front. Immunol. – 2020. – No. 11. – P. 1290. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01290.
12. Serum SP-A and KL-6 levels can predict the improvement and deterioration of patients with interstitial pneumonia with autoimmune features / J. Wang, P. Zheng, Z. Huang [et al.] // BMC Pulmonary Medicine. – 2020. – No. 20. – P. 315. DOI: 10.1186/s12890-020-01336-y.
13. Chiba M. Significance of molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: a mini review / M. Chiba, M. Otsuka, H. Takahashi // Respir. Investig. – 2018. – No. 56. – P. 384–391. DOI: 10.1016/j.resinv.2018.06.001.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

14. King S. D. Recent progress on surfactant protein A: cellular function in lung and kidney disease development / S. D. King, S. Y. Chen // *Am. J. Physiol Cell Physiol.* – 2020. – No. 319. – P. 316–320. DOI: 10.1152/ajpcell.00195.2020.

15. Serum surfactant protein A as a surrogate biomarker of a negative heart sign among patients with interstitial lung disease / H. Sasaki, Y. Hara, M. Taguri [et al.] // *J. Med. Sci.* – 2020. – No. 82. – P. 499–508.

REFERENCES

1. Sytnyk, I.M., & Khaitovych, M.V. (2015). Zastosuvannya antyoksydantiv za tsukrovoho diabetu I typu [The use of antioxidants in type I diabetes mellitus]. *Farmakolohiia ta likarska toksykolohiia – Pharmacology and Drug Toxicology*, 6, 3-11 [in Ukrainian].

2. Hloba, Ye.V., Zelinska, N.B., & Shevchenko, I.Yu. (2017). Monohennyi diabet v Ukraini: heny, fenotyp, likuvannya [MoDy in Ukraine: genes, clinical phenotypes and treatment]. *Klinichna endokrynolohiia ta endokrynna khirurgiia – Clinical Endocrinology and Endocrine Surgery*, 3(59), 41-49 DOI: 10.24026/1818-1384.3(59).2017.110893 [in Ukrainian].

3. Akasaka, H., Ohnishi, H., Narita, Y., Kameda, M., Miki, T., & Takahashi, H. (2017). The Serum Level of KL-6 Is Associated with the Risk of Insulin Resistance and New-onset Diabetes Mellitus: The Tanno-Sobetsu Study. *Internal Medicine*, 56, 3009-3018. DOI: 10.2169/internalmedicine.8716-16.

4. Rajasurya, V., Gunasekaran, K., & Surani, S. (2020). Interstitial lung disease and diabetes. *World Journal of Diabetes*, 11(8), 351-357. DOI: 10.4239/wjd.v11.i8.351.

5. Lecube, A., Simo, R., Pallayova, M., Punjabi, N.M., Lopez-Cano, C., & Turino, C. (2017). Pulmonary function and sleep breathing: two new targets for type 2 diabetes care. *Endocr. Rev.*, 38, 550-573. DOI: 10.1210/cr.2017-00173.

6. Zheng, H., Wu, J., Jin, Z., & Yan, L.-J. (2017). Potential Biochemical Mechanisms of Lung Injury in Diabetes. *Aging and Disease*, 8(1), 7-16. DOI: 10.14336/AD.2016.0627.

7. Chen, X.-F., Yan, L.-J., Lecube, A., & Tang, X. (2020). Editorial: Diabetes and Obesity Effects on Lung Function. *Frontiers in Endocrinology*, 11(462), 1-2. DOI: 10.3389/fendo.2020.00462.

8. Floros, I., Thorenoor, N., Tsotakos, N., & Phelps, D.S. (2021). Human surfactant protein SP-A1 and SP-A2 variants differentially affect the alveolar microenvironment, surfac-

tant structure, regulation and function of the alveolar macrophage, and animal and human survival under various conditions. *Front. Immunol.*, 12, 2889. DOI: 10.3389/fimmu.2021.681639.

9. Depicolzuane, L., Phelps, D.S., & Floros, J. (2022). Surfactant Protein-A Function: Knowledge Gained From SP-A Knockout Mice. *Frontiers in Pediatrics*, 9, 799693. DOI: 10.3389/fped.2021.799693.

10. Abdel-Razek, O., Ni, L., Yang, F., & Wang, G. (2019). Innate immunity of surfactant protein A in experimental otitis media. *Innate Immun.*, 25, 391-400. DOI: 10.1177/1753425919866006.

11. Thorenoor, N., Kawasaki, Y.I., Gandhi, C.K., & Floros, J. (2020). Sex-specific regulation of gene expression networks by surfactant protein A (SP-A) variants in alveolar macrophages in response to klebsiella pneumoniae. *Front. Immunol.*, 11, 1290. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01290.

12. Wang, J., Zheng, P., Huang, Z., Huang, H., Xue, M., & Liao, C. (2020). Serum SP-A and KL-6 levels can predict the improvement and deterioration of patients with interstitial pneumonia with autoimmune features. *BMC Pulmonary Medicine*, 20, 315. DOI: 10.1186/s12890-020-01336-y.

13. Chiba, M., Otsuka, M., & Takahashi, H. (2018). Significance of molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: a mini review. *Respir. Investig.*, 56, 384-391. DOI: 10.1016/j.resinv.2018.06.001.

14. King, S.D., & Chen, S.Y. (2020). Recent progress on surfactant protein A: cellular function in lung and kidney disease development. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 319, 316-320. DOI: 10.1152/ajpcell.00195.2020.

15. Sasaki, H., Hara, Y., Taguri, M., Fujikura, Y., Murohashi, K., & Yagyu, H. (2020). Serum surfactant protein A as a surrogate biomarker of a negative heart sign among patients with interstitial lung disease. *J. Med. Sci.*, 82, 499-508.

SURFACTANT PROTEIN A1 AS A MOLECULAR BIOMARKER OF LUNG DAMAGE IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS.

©L. M. Zaiats, Y. V. Fedorchenko

Ivano-Frankivsk National Medical University

SUMMARY. Diabetes mellitus occupies one of the first places in the structure of endocrine diseases and affects many organs, including the lungs. Pulmonary surfactant, mostly surfactant protein A1, plays a leading role in the pathogenesis of respiratory diseases. There is insufficient data on the use of serum surfactant protein A1 as a potential biomarker of lung damage in the scientific literature.

The aim – to evaluate the informativeness of surfactant protein A1 content in blood serum as a prognostic biomarker of lung injury in experimental diabetes mellitus.

Material and Methods. A model of diabetes mellitus, which was reproduced by intraperitoneal injection of streptozotocin by "Sigma" company (USA), diluted in 0.1 M citrate buffer with a pH of 4.5, at a rate of 60 mg/kg body weight. The control group of animals received an intraperitoneal injection with an equivalent dose of 0.1 M citrate buffer solu-

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення
tion with a pH of 4.5. Serum levels of SP-A1 were determined by rat enzyme-linked immunosorbent assay Rat ELISA Kits (Elabscience, USA) according to the manufacturer's instructions 14, 28, 42 and 70 days after streptozotocin injection.

Results. Conducted biochemical analysis showed an increase in the levels of SP-A1 in blood serum in animals with diabetes mellitus at all stages of the experiment. In particular, serum SP-A1 levels increased by 7.9 % in 14 days, 49 % in 28 days, 69.5 % in 42 days and 91.6 % in 70 days compared to the control group of animals.

Conclusions. During the entire study period, experimental diabetes mellitus is accompanied by an increase in surfactant protein A1 levels in blood serum and can be considered as a molecular biomarker of lung damage in this pathology.

KEY WORDS: experimental diabetes mellitus; surfactant protein A1; biomarker.

Отримано 24.10.2022

Електронна адреса для листування: patfisiology@ifnmu.edu.ua