

УДК 617.713-002-022.7-078:57.083.3:616.379-008.64

DOI: <https://doi.org/10.22141/2309-8147.9.2.2021.241501>Заволока О.В.¹, Бездітко П.А.¹, Абрамова Л.П.², Векшин В.О.²¹ Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна² Центральна науково-дослідна лабораторія, Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна

Імунологічні аспекти бактеріальних кератитів у хворих на цукровий діабет

Резюме. *Мета роботи:* провести аналіз цитокінового балансу слізної рідини у хворих на бактеріальний кератит і цукровий діабет (ЦД) при першому зверненні до лікаря та виявити імунологічні аспекти захворювання. *Матеріали та методи.* Був проведений аналіз концентрації про- та протизапальних цитокінів у слізній рідині 17 хворих на ЦД 1-го типу й бактеріальні кератити та 15 хворих на бактеріальні кератити без ЦД при першому зверненні до офтальмолога. Для порівняння використовували дані 14 здорових осіб. Крім стандартних, методи офтальмологічного дослідження включали бактеріологічне дослідження, флуоресцеїновий тест, оптичну когерентну томографію переднього відрізка ока, безконтактне дослідження чутливості рогівки. Рівень ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-10 у слізній рідині хворого та контрлатерального ока визначали за допомогою кількісного колориметричного імуноферментного аналізу з використанням наборів ІФА. *Результати.* У хворих на ЦД і бактеріальний кератит концентрація ІЛ-1 β й ІЛ-6 у слізній рідині хворого ока перевищувала таку у здорових осіб ($p < 0,05$) та вірогідно не відрізнялась від показників хворих на бактеріальний кератит без ЦД ($p > 0,05$). У слізній рідині контрлатерального ока хворих на ЦД та бактеріальний кератит рівень ІЛ-1 β й ІЛ-6 перевищував відповідні показники хворих на бактеріальний кератит без ЦД та здорових осіб ($p < 0,05$). Концентрація ІЛ-10 у слізній рідині контрлатерального ока у хворих на ЦД і бактеріальний кератит перевищувала таку у здорових осіб ($p < 0,05$) та вірогідно не відрізнялась від показників хворих на бактеріальний кератит без ЦД ($p > 0,05$). *Висновки.* У хворих на ЦД і бактеріальний кератит відзначаються імунологічні особливості захворювання.

Ключові слова: цукровий діабет; бактеріальний кератит; цитокіни; інтерлейкіни

Вступ

Бактеріальні кератити зустрічаються у хворих на цукровий діабет (ЦД) частіше, ніж у загальній популяції, та мають більш тяжкий перебіг [1–3]. Ключову роль у розвитку та регуляції запальної реакції відіграють цитокіни — група медіаторів міжклітинної взаємодії білкової природи, що є основним неспецифічним гуморальним фактором імунітету. За біологічною дією цитокіни умовно розподіляються на прозапальні та протизапальні [4]. При бактеріальному кератиті відзначається підвищення експресії прозапальних цитокінів (інтерлейкіну 1 β

(ІЛ-1 β) й інтерлейкіну 6 (ІЛ-6)) у слізній рідині хворого ока [5, 6] та протизапальних (інтерлейкін 10 (ІЛ-10)) — у слізній рідині контрлатерального ока [5].

У хворих на ЦД доведена наявність хронічного системного запалення низької інтенсивності, що призводить до підвищення концентрації прозапальних факторів у плазмі крові та біологічних рідинах за відсутності імуностимулятора [7] та зміни відповіді організму при запальних захворюваннях [8–12]. Проте до сьогодні не виявлені імунологічні аспекти бактеріальних кератитів у хворих на ЦД.

© «Архів офтальмології України» / «Archive Of Ukrainian Ophthalmology» («Arhiv oftalmologii Ukraini»), 2021

© Видавець Заславський О.Ю. / Publisher Zaslavsky O.Yu., 2021

Для кореспонденції: Заволока Олеся Володимирівна, кандидат медичних наук, доцент кафедри офтальмології, Харківський національний медичний університет, пр. Науки, 4, м. Харків, 61022, Україна; e-mail: olesya_zavoloka@yahoo.com

For correspondence: O.V. Zavoloka, PhD, Associate Professor at the Department of ophthalmology, Kharkiv National Medical University, Nauky ave., 4, Kharkiv, 61022, Ukraine; e-mail: olesya_zavoloka@yahoo.com

Full list of authors information is available at the end of the article.

Мета роботи: провести аналіз цитокинового балансу слізної рідини у хворих на бактеріальний кератит та ЦД при першому зверненні до лікаря та виявити імунологічні аспекти захворювання.

Матеріали та методи

Імунологічні особливості бактеріальних кератитів у хворих на ЦД визначались за допомогою аналізу концентрації про- та протизапальних цитокинів у слізній рідині 17 хворих на ЦД 1-го типу й бактеріальні кератити та 15 хворих на бактеріальні кератити без ЦД до проведення лікування, при першому зверненні до офтальмолога. Для порівняння використовували дані 14 здорових осіб відповідного віку. Діагноз бактеріального кератиту був встановлений на основі характерної клінічної картини та підтверджений бактеріологічно. Критерії виключення: глаукома, аномалії рефракції середнього та високого ступеня, оперативні втручання на оці в анамнезі.

Дослідження виконувалось відповідно до Гельсінської декларації, дозвіл на його проведення отримали на засіданні комісії з питань етики та біоетики Харківського національного медичного університету від 5 грудня 2018 року (протокол № 11).

Вік хворих основної групи коливався від 19 до 46 років і в середньому становив $32,2 \pm 7,6$ року; тривалість ЦД до 5 років відзначалась у 11,8 % хворих, від 5 до 10 років — у 52,9 %, понад 10 років — у 35,3 % хворих. Вік хворих групи контролю коливався від 18 до 44 років і в середньому становив $32,5 \pm 8,7$ року, вік здорових осіб коливався від 18 до 42 років і в середньому становив $29,3 \pm 9,0$ року. Вік у всіх досліджуваних групах вірогідно не відрізнявся ($p > 0,05$).

Крім стандартних, методи офтальмологічного дослідження включали бактеріологічне дослідження, флюоресцеїновий тест, оптичну когерентну томографію переднього відрізка ока на апараті TOPCON 3D OCT-2000, безконтактне дослідження чутливості рогівки (за допомогою розробленого нами приладу та методики [13]). Забір слізної рідини здійснювався до закапування будь-яких очних крапель, згідно з описаною раніше методикою [5]. За допомогою мікропіпетки 60 мкл стерильного сольового розчину закапували в нижнє склепіння кон'юнктивального мішка. Далі досліджуваних просили не моргаючи подивитися вліво, вправо, вгору і вниз чотири рази, щоб змішати вміст

слізної рідини. Потім розведену стерильним фізіологічним розчином слізну рідину збирали з нижнього склепіння за допомогою мікропіпетки, переносили в пробірку Еппендорфа та зберігали при температурі -20°C .

Визначали рівень ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-10 у слізній рідині хворого та контрлатерального ока за допомогою кількісного колориметричного імуноферментного аналізу з використанням наборів ІФА фірми ANOGEN (Онтаріо, Канада) відповідно до інструкції з використання.

Результати та обговорення

У хворих на ЦД і бактеріальний кератит при першому зверненні до лікаря концентрація ІЛ-1 β й ІЛ-6 у слізній рідині хворого ока перевищувала таку у здорових осіб групи порівняння ($p < 0,05$) та вірогідно не відрізнялась від показників хворих на бактеріальний кератит без ЦД ($p > 0,05$) (табл. 1). Концентрація ІЛ-10 у слізній рідині хворого ока у хворих на ЦД та бактеріальний кератит вірогідно не відрізнялась від показників хворих на бактеріальний кератит без ЦД та здорових осіб групи порівняння ($p > 0,05$).

У слізній рідині контрлатерального ока хворих на ЦД і бактеріальний кератит рівень ІЛ-1 β й ІЛ-6 перевищував відповідні показники хворих на бактеріальний кератит без ЦД та здорових осіб групи порівняння при першому зверненні до лікаря ($p < 0,05$) (табл. 2). Концентрація ІЛ-10 у слізній рідині контрлатерального ока у хворих на ЦД і бактеріальний кератит перевищувала таку у здорових осіб групи порівняння ($p < 0,05$) та вірогідно не відрізнялась від показників хворих на бактеріальний кератит без ЦД ($p > 0,05$).

Таким чином, у хворих на бактеріальний кератит, як із ЦД, так і без нього, при першому зверненні до лікаря була підвищена концентрація прозапальних цитокинів (ІЛ-1 β й ІЛ-6) у слізній рідині хворого ока та протизапальних цитокинів (ІЛ-10) у слізній рідині контрлатерального ока. Отримані нами відомості узгоджуються з даними Т. Yamaguchi зі співавт. [5] та А. Konstantopoulos зі співавт. [6], які відзначили високий рівень експресії ІЛ-1 β й ІЛ-6 у слізній рідині хворого ока та ІЛ-10 — контрлатерального ока при бактеріальному кератиті.

Згідно з проведеним нами дослідженням, концентрація ІЛ-1 β , ІЛ-6 у слізній рідині хворого ока та ІЛ-10 у слізній рідині контрлатерального ока у хворих на ЦД і бактеріальний кератит вірогідно не відрізнялась від

Таблиця 1. Концентрація цитокинів (пг/мл) у слізній рідині хворого на бактеріальний кератит ока на першому візиті залежно від наявності цукрового діабету

Група	ІЛ-1 β			ІЛ-6			ІЛ-10		
	М \pm m	Діапазон	Медіана	М \pm m	Діапазон	Медіана	М \pm m	Діапазон	Медіана
Хворі на ЦД, n = 17	122,9 \pm 61,2*	25–250	125	1539,8 \pm 377,4*	730–2000	1654	47,0 \pm 57,7	0–173	25
Хворі без ЦД, n = 15	106,3 \pm 58,5*	20–243	95	1395,5 \pm 394,6*	620–1913	1390	46,1 \pm 59,2	0–175	20
Здорові особи, n = 14	13,1 \pm 7,3	0–30	14,5	160,8 \pm 54,0	0–256	169	20,1 \pm 26,4	0–99	12

Примітка: * — оцінка статистичної значущості відмінностей між показником здорових осіб та іншими групами, $p < 0,05$.

Таблиця 2. Концентрація цитокінів (пг/мл) у слізній рідині контрлатерального ока у хворих на бактеріальний кератит на першому візиті залежно від наявності цукрового діабету

Група	ІЛ-1 β			ІЛ-6			ІЛ-10		
	М \pm m	Діапазон	Медіана	М \pm m	Діапазон	Медіана	М \pm m	Діапазон	Медіана
Хворі на ЦД, n = 17	43,4 \pm 19,5* ^{**}	8–81	43	378,0 \pm 201,7* ^{**}	61–805	356	120,8 \pm 65,4*	28–248	113
Хворі без ЦД, n = 15	20,1 \pm 18,4	0–61	16	171,2 \pm 102,5	0–316	187	95,1 \pm 62,5*	11–224	77
Здорові особи, n = 14	13,1 \pm 7,3	0–30	14,5	160,8 \pm 54,0	0–256	169	20,1 \pm 26,4	0–99	12

Примітки: * — оцінка статистичної значущості відмінностей між показником здорових осіб та іншими групами, $p < 0,05$; ** — оцінка статистичної значущості відмінностей між групами хворих на ЦД та хворих без ЦД, $p < 0,05$.

показників хворих на бактеріальний кератит без ЦД. Це узгоджується з даними S. Yende зі співавт. [11] та M.E. Stegenga зі співавт. [12], які не виявили залежності цитокінового балансу в пацієнтів з запальними захворюваннями від наявності ЦД. Проте відрізняються відомості I. Vonyek-Silva зі співавт. [8] та P. Mehta зі співавт. [9], які діагностували підвищення рівня запальних цитокінів у хворих на ЦД при запальних захворюваннях порівняно з хворими без ЦД, та S.E. Geerlings зі співавт. [10], які, навпаки, виявили їх зменшення.

Згідно з результатами нашого дослідження, концентрація прозапальних цитокінів ІЛ-1 β й ІЛ-6 у слізній рідині контрлатерального ока у хворих на ЦД та бактеріальний кератит перевищувала відповідні показники хворих на бактеріальний кератит без ЦД та здорових осіб групи порівняння при першому зверненні до лікаря. Це може бути пов'язано з загальним підвищенням рівня прозапальних факторів у плазмі крові та біологічних рідинах у стані спокою за відсутності імуностимулятора у хворих на ЦД, на що вказували попередні дослідження [7].

Висновки

У хворих на ЦД та бактеріальний кератит відзначаються імунологічні особливості захворювання, а саме зміна цитокінового балансу слізної рідини хворого та контрлатерального ока за рахунок підвищення концентрації прозапальних цитокінів ІЛ-1 β й ІЛ-6 та збільшення рівня протизапального цитокіну ІЛ-10 у слізній рідині контрлатерального ока.

У хворих на бактеріальний кератит, як із ЦД, так і без нього, при першому зверненні до лікаря відзначається підвищення концентрації прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β й ІЛ-6) у слізній рідині хворого ока та протизапальних цитокінів (ІЛ-10) у слізній рідині контрлатерального ока.

Концентрація ІЛ-1 β й ІЛ-6 у слізній рідині контрлатерального ока у хворих на ЦД та бактеріальний кератит перевищує відповідні показники хворих на бактеріальний кератит без ЦД та здорових осіб групи порівняння при першому зверненні до лікаря.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів і власної фінансової зацікавленості при підготовці даної статті.

Список літератури

- Chang Y.S., Tai M.C., Ho C.H., Chu C.C., Wang J.J., Tseng S.H., Jan R.L. Risk of Corneal Ulcer in Patients with Diabetes Mellitus: A Retrospective Large-Scale Cohort Study. *Sci Rep.* 2020 Apr 30. 10(1). 7388. doi: 10.1038/s41598-020-64489-0.
- Wang B., Yang S., Zhai H.L., Zhang Y.Y., Cui C.X., Wang J.Y., Xie L.X. A comparative study of risk factors for corneal infection in diabetic and non-diabetic patients. *Int. J. Ophthalmol.* 2018 Jan 18. 11(1). 43–47. doi: 10.18240/ijo.2018.01.08.
- Badawi A.E., Moemen D., El-Tantawy N.L. Epidemiological, clinical and laboratory findings of infectious keratitis at Mansoura Ophthalmic Center, Egypt. *Int. J. Ophthalmol.* 2017 Jan 18. 10(1). 61–67. doi: 10.18240/ijo.2017.01.10.
- Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W.L. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2003 Sep. 4(3). 291–9. doi: 10.1023/a:1025160614313.
- Yamaguchi T., Calvacanti B.M., Cruzat A., Qazi Y., Ishikawa S., Osuka A., Lederer J., Hamrah P. Correlation between human tear cytokine levels and cellular corneal changes in patients with bacterial keratitis by in vivo confocal microscopy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014. 55(11). 7457–66. http://doi: 10.1167/iovs.14-15411
- Konstantopoulos A., Cendra M.D.M., Tsatsos M., Elabary M., Christodoulides M., Hossain P. Morphological and cytokine profiles as key parameters to distinguish between Gram-negative and Gram-positive bacterial keratitis. *Sci Rep.* 2020 Nov 18. 10(1). 20092. doi: 10.1038/s41598-020-77088-w. Erratum in: *Sci Rep.* 2021 Feb 26. 11(1). 5168.
- Yao Y., Li R., Du J., Long L., Li X., Luo N. Interleukin-6 and Diabetic Retinopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr. Eye Res.* 2019. 44(5). 564–74. http://doi: 10.1080/02713683.2019.1570274
- Bonyek-Silva I., Nunes S., Santos R.L., Lima F.R., Lago A., Silva J., Carvalho L.P., Arruda S.M., Serezani H.C., Carvalho E.M., Brodskyn C.I., Tavares N.M. Unbalanced production of LTB₄/PGE₂ driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. *Emerg. Microbes Infect.* 2020. 9(1). 1275–86. http://doi: 10.1080/22221751.2020.1773744
- Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J.; HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020. 395(10229). 1033–34. http://doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0
- Geerlings S.E., Brouwer E.C., Van Kessel K.C., Gaastra W., Stolk R.P., Hoepelman A.I. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* 2000. 30. 995–1001.

11. Yende S., van der Poll T., Lee M., Huang D.T., Newman A.B., Kong L., Kellum J.A., Harris T.B., Bauer D., Satterfield S., Angus D.C. The influence of pre-existing diabetes mellitus on the host immune response and outcome of pneumonia: analysis of two multicentre cohort studies. *Thorax*. 2010. 65. 870-877.

12. Stegenga M.E., Vincent J.-L., Vail G.M., Xie J., Haney D.J., Williams M.D., Bernard G.R., van der Poll T. Diabetes does not alter mortality or hemostatic and inflammatory responses in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med*. 2010. 38. 539-545.

13. Заволока О.В., Бездітко П.А., Луханін О.О. Ефективність нового пристрою для безконтактної діагностики чутливості рогівки при визначенні її нейротрофічного стану у хворих на цукровий діабет I типу та бактеріальний кератит. *Офтальмол. журн.* 2019. 6. 29-33. <http://doi.org/10.31288/ofthalmolzh201962933>

Отримано/Received 02.04.2021

Рецензовано/Revised 15.04.2021

Прийнято до друку/Accepted 21.04.2021 ■

Information about authors

O.V. Zavaloka, PhD, Associate Professor at the Department of ophthalmology, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine; e-mail: olesya_zavaloka@yahoo.com

P.A. Bezditko, MD, PhD, Professor, Head of the Department of ophthalmology, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine; e-mail: pabpoul12@gmail.com

L.P. Abramova, PhD in biol., Head of the Sector (Biochemical) of the Central Research Laboratory, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine; e-mail: abramovabulita@gmail.com

V.O. Vekshyn, PhD in techn., Senior Researcher of the Central Research Laboratory, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine; e-mail: myposta2014@gmail.com

Conflicts of interests. Authors declare the absence of any conflicts of interests and their own financial interest that might be construed to influence the results or interpretation of their manuscript.

O.V. Zavaloka¹, P.A. Bezditko¹, L.P. Abramova², V.O. Vekshyn²

¹ Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

² Central Research Laboratory, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Immunological aspects of bacterial keratitis in patients with diabetes mellitus

Abstract. Background. The purpose was to analyze the cytokine balance of lacrimal fluid in patients with bacterial keratitis and diabetes mellitus (DM) at the first visit and to identify the immunological aspects of the disease. **Materials and methods.** The analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine concentration in the lacrimal fluid was performed in 17 patients with type 1 DM and bacterial keratitis and 15 nondiabetic patients with bacterial keratitis at the first visit. Data from 14 healthy individuals were used for comparison. In addition to standard ones, ophthalmic examination methods included bacteriological examination, fluorescein test, anterior segment optical coherence tomography, non-contact corneal aesthesiometry. The levels of interleukin (IL) 1 β , IL-6 and IL-10 in the lacrimal fluid of the sick and the contralateral eye were determined by a quantitative colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay using ELISA kits. **Results.** In DM patients with bacterial

keratitis, the concentration of IL-1 β and IL-6 in the lacrimal fluid of the sick eye exceeded that in healthy individuals ($p < 0.05$) and did not differ significantly from nondiabetic patients with bacterial keratitis ($p > 0.05$). In the lacrimal fluid of the contralateral eye of DM patients with bacterial keratitis, the level of IL-1 β and IL-6 exceeded the corresponding indicators of nondiabetic patients with bacterial keratitis and healthy individuals ($p < 0.05$). The concentration of IL-10 in the lacrimal fluid of the contralateral eye in DM patients with bacterial keratitis exceeded that in healthy individuals ($p < 0.05$) and did not significantly differ from those in nondiabetic patients with bacterial keratitis ($p > 0.05$). **Conclusions.** DM patients with bacterial keratitis have immunological features of the disease.

Keywords: diabetes mellitus; bacterial keratitis; cytokines; interleukins