

УДК 617.7-06:616.379-008.64]-085.37-036

Маркер активації нейтрофілів CD15+ як прогностичний фактор ушкодження поверхні ока у пацієнтів з цукровим діабетом II типу

Т. М. Жмудь¹, канд. мед. наук; Г. І. Дрожжина², д-р мед. наук, професор;
Л. М. Величко², д-р мед. наук,

¹ Вінницький національний медичний університет

Вінниця (Україна)

² ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України»;

Одеса (Україна)

Ключові слова:

рогівка, поверхня ока, маркер активації нейтрофілів CD15+, цукровий діабет II типу, прогноз

Мета дослідження: оцінити прогностичну цінність маркера активації нейтрофілів CD15+ як прогностичного фактора пошкодження поверхні ока у пацієнтів із ЦД 2 типу

Матеріал і методи. Дане дослідження проводилося з січня 2021 року по січень 2022 року в умовах Вінницької обласної клінічної лікарні імені М.І. Пирогова. Під спостереженням було шістдесят пацієнтів із ЦД 2 типу (120 очей), віком 62,1±5,24 років.

Результати. Вперше оцінено прогностичну роль відносного рівня маркера активації нейтрофілів CD15+ в пошкодження поверхні ока при цукровому діабеті 2 типу. Встановлено достатньо високий показник чутливості біомаркера CD 15+ (88,3%), що дозволяє використовувати його як метод скринінгу наявності ушкодження очної поверхні в пацієнтів з ЦД 2 типу. Відносний рівень експресії маркера нейтрофілів CD15+ в крові у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу >27% підвищує ризик виникнення пошкодження очної поверхні у 10,52 рази (95% CI 4,34 – 25,50; $p < 0,0001$) та може застосовуватись зі скринінговою метою з чутливістю - 88,3% (95% CI = 77,8 - 94,2) та специфічністю - 63,3% (95% CI = 50,7 - 74,4).

Актуальність. Через складну патофізіологію точний механізм пошкодження поверхні ока у хворих на цукровий діабет (ЦД) залишається неясним. [1]. Відомо, що хронічна гіперглікемія сприяє дефектній регенерації рани у зовнішніх шарах рогівки, аномаліям нервових волокон суббазальних сплетень, а також втраті функції ендотеліального насоса рогівки. [1]. Патологічні зміни спостерігаються при ЦД у функціонуванні мейбомієвих залоз (МЗ). Порушення функції МЗ призводить до підвищення в'язкості секрету; стазу секрету у вивідних протоках та поступової втрати МЗ, що веде до якісної та кількісної зміни ліпідного шару слізної плівки. Порушення ліпідного шару викликає надмірне випаровування та підвищує осмолярність сльози. [2]. Усі ці фактори сприяють структурним змінам в повіках, слізному апараті та рогівці.

Очна поверхня є особливим середовищем з огляду на свої імунні властивості. Крім звичайної бар'єрної функції, вона включає захист від власних імунних клітин та потенційного пошкодження внаслідок їх надмірної активації у відповідь на інфекційні, механічні чи хімічні агенти. Нейтрофільні гранулоцити (CD45, CD15) є типовими представниками вродженого клітинного імунітету переважно за рахунок фагоцитарних властивостей та безпосередньої міграції до вогнища запального процесу й інфільтрації прилеглих тканин. [3]. Відомо, що CD15+ є маркером нейтрофілів, який сприяє адгезії клітин до епітелію та відіграє значну роль у запуску та підтримці внутрішньої запальної

реакції. [3]. Вуглеводневий епітоп CD15+ експресується переважно зрілими нейтрофілами людини, а також моноцитами та промієлоцитами. [4]. Цей поверхневий глікан бере участь у міжклітинній взаємодії, фагоцитозі, стимуляції дегрануляції та оксидативного вибуху (oxidativeburst). [4, 5].

В літературі є дослідження щодо CD15+ при різних захворюваннях організму. Наприклад, деякі роботи вказують, що концентрація CD15+ зростає при різних видах злоякісних солідних пухлин з ураженням легень, яєчників, щитоподібної залози, колоректального сегменту шлунково-кишкового тракту та ін., що зумовило його переважне застосування в якості маркера безрецидивного перебігу та наслідків лікування. [6].

Нещодавнє дослідження O'Rourke M. et al. (2018) виявило, що наявність запального процесу (гострого увеїту) вірогідно підвищує концентрацію дендритних клітин (CD11c+ HLA-DR+), нейтрофілів (CD15+ CD11c+) та Т-клітин (CD4+, CD8+) у мікросередовищі водянистої вологи на відміну від практично здорових представників контрольної групи, таким чином посилюючи топічну імунну відповідь. [7].

Mun Y. et al. (2021) висувають гіпотезу щодо ролі старіючих нейтрофілів у розвитку хвороби сухого ока (ХСО) у людей літнього віку шляхом індукції хронічного запалення судин слізних залоз та очної поверхні.

[8]. Також вони залучені в систему набутого імунітету завдяки взаємодії з Т та В-клітинами. [9, 10, 11, 12].

Враховуючи спектр активності та джерела експресії CD15+, визначення відносного рівня експресії маркера активації нейтрофілів у пацієнтів з ЦД 2 типу може бути одним з прогностичних факторів важкості імунно-запального процесу на поверхні ока. [8, 9].

Мета дослідження: оцінити прогностичну цінність маркера активації нейтрофілів CD15+ як фактора пошкодження поверхні ока у пацієнтів із ЦД 2 типу.

Матеріал та методи

Дане дослідження проводилося з січня 2021 року по січень 2022 року в умовах Вінницької обласної клінічної лікарні імені М. І. Пирогова. Під спостереженням було 60 пацієнтів із ЦД 2 типу (120 очей), середнім віком $62,1 \pm 5,24$ років. З метою оцінки прогностичних властивостей маркера активації нейтрофілів CD15+ було сформовано дві підгрупи: 1 – ушкодження очної поверхні, за даними імпресійної цитології кон'юнктиви, що відповідало 2 та 3 ступеням класифікації плоско клітинної метаплазії за Nelson (60 очей); 2 – ушкодження очної поверхні, за даними імпресійної цитології кон'юнктиви, що відповідало ступеням 0 та 1 за класифікацією Нельсон (60 очей). [13].

Всім пацієнтам було визначено відносний рівень експресії маркера активації нейтрофілів CD15+ у периферичній крові по методиці, описаній в нашій попередній роботі [14], та виконано імпресійну цитологію бульварної кон'юнктиви за нашою методикою [15, 16].

Дослідження було виконане відповідно до Гельсінкської декларації та затверджене місцевим інституційним комітетом з біоетики. Усі включені суб'єкти дали письмову інформовану згоду перед тим, як їх включили в дослідження. Дане дослідження є фрагментом НДР кафедри офтальмології ВНМУ ім. М. І. Пирогова «Комплексний підхід до ланок патогенезу, удосконалення діагностики, профілактики, лікування та реабілітації пацієнтів з патологією переднього сегменту ока», 0123U103539.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням пакета прикладних програм Statistica v.10.0 (StatSoft, USA) та епідемічного калькулятора – EpiTools [17]. Дані наводяться у вигляді середнього значення показника та його квадратичного відхилення ($M \pm SD$) та у відсотках (%). Методом бінарної логі-

тичної регресії оцінювалась наявність асоціації між відносним рівнем CD15+ та наявністю ушкодження очної поверхні. Для прогностичної оцінки застосували метод аналізу кривих операційних характеристик (ROC-analysis – Receiver Operating Characteristic curve analysis). З цією метою розраховувалась площа під ROC-кривою (AUC – Area under the curve), а також показники специфічності та чутливості. Модель вважалась адекватною при статистично значущій відмінності величини AU від 0,5. Значення $p \leq 0,05$ вважалось статистично значимим. Максимальне значення індексу Юдена (чутливість + специфічність – 1) використовувалось для визначення оптимальної точки відсічення показника відносного рівня експресії CD15+ [17]. Шляхом розрахунку величини відношення шансів (OR) з довірчим інтервалом (CI) при 95%-му рівні значущості визначали силу асоціації показника відносного рівня CD15+ на наявність пошкодження поверхні ока. Передбачуваний фактор ризику вважався значущим для розвитку останнього при значенні показника OR з поправкою на CI більше 1.

Результати

В результаті досліджень ми визначили, що середній показник CD15+ був вірогідно вищим в групі пацієнтів з ознаками плоско клітинної метаплазії за Nelson 2, 3, ніж в групі пацієнтів з ознаками плоскоклітинної метаплазії за Nelson 0, 1 ($p < 0,00001$). Таким чином зростання відносної кількості CD15+ клітин в цій підгрупі може свідчити про активацію нейтрофіл-опосередкованих процесів за наявності пошкодження очної поверхні (табл.1).

Графічна характеристика обох груп з урахуванням розмаху та частот відносного рівня CD15+ (%) представлена на рисунку 1.

При аналізі характеру ROC-кривої встановлено статистично значущий зв'язок ($p < 0,0001$), між відносним рівнем CD15+ та ушкодженням очної поверхні (AUC=0.84; 95% CI =0.773-0.908). Показник AUC – 0,84 вказує на адекватність розрахованої логістичної моделі та високу прогностичну здатність досліджуваного діагностичного тесту, що дозволяє використовувати відносний рівень CD15+, як біохімічний маркер ризику розвитку ушкодження очної поверхні в пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу, в той час як низькі показники довірчого інтервалу (CI) свідчать про висо-

Таблиця 1. Значення CD15* ($M \pm SD$) у пацієнтів з ЦД 2 типу в обох підгрупах дослідження в залежності від класифікації за Nelson

Характеристика	Підгрупа 1 (n=60)		Підгрупа 2 (n=60)		p
	Nelson 2	Nelson 3	Nelson 0	Nelson 1	
Ступінь за Nelson					н/з
n	45	15	0	60	н/з
CD15* (%)	36,7±9,0		23,4±8,9		$p < 0,00001^*$

Примітка: n – кількість очей; * p – рівень значущості різниці показників між підгрупами 1 та 2; $p < 0,05$ – рівень значущості різниці показників статистично значимий; н/з – незастосований.

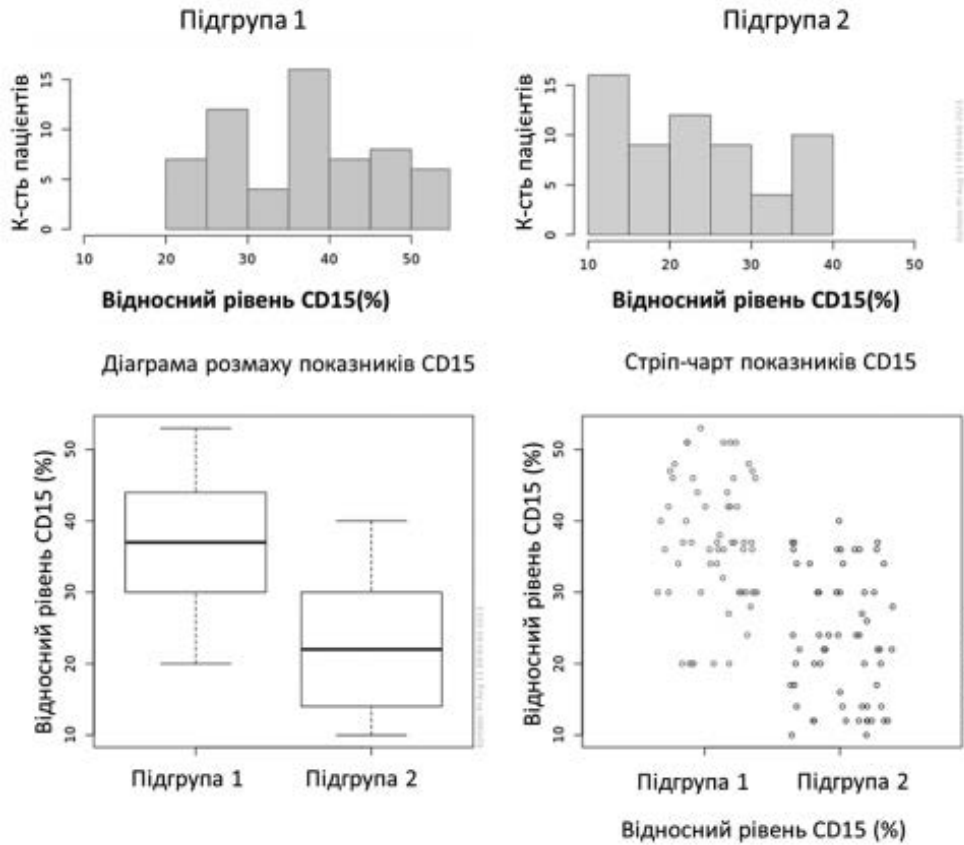


Рис. 1. Порівняльна характеристика підгруп 1 та 2 за результатами розподілу відносного рівня CD15+ (%).

ку точність отриманих результатів площі під кривою (рис. 2).

Зі скринінговою метою доцільним є використання показника відносного рівня CD15+ – 20% (чутливість – 99,9%) та 24% (чутливість – 90%), проте низький рівень специфічності (33,3% та 51,7%) обмежує його прогностичну здатність.

З метою підтвердження діагнозу, безумовно слід орієнтуватись на показник специфічності. Зокрема,

99,9% пацієнтів без ушкодження очної поверхні будуть мати показник CD15+ <42%. Більш збалансованим є показник специфічності 90% та чутливості 51,7% з точкою відсічення 37%.

Зважаючи на високу поширеність ушкодження поверхні ока при ІД 2 типу та дані нашого дослідження, оптимальна точка зрізу (cut-offvalue) визначена на рівні 27 % показника відносного рівня маркера активації нейтрофілів CD15+ (табл. 2).

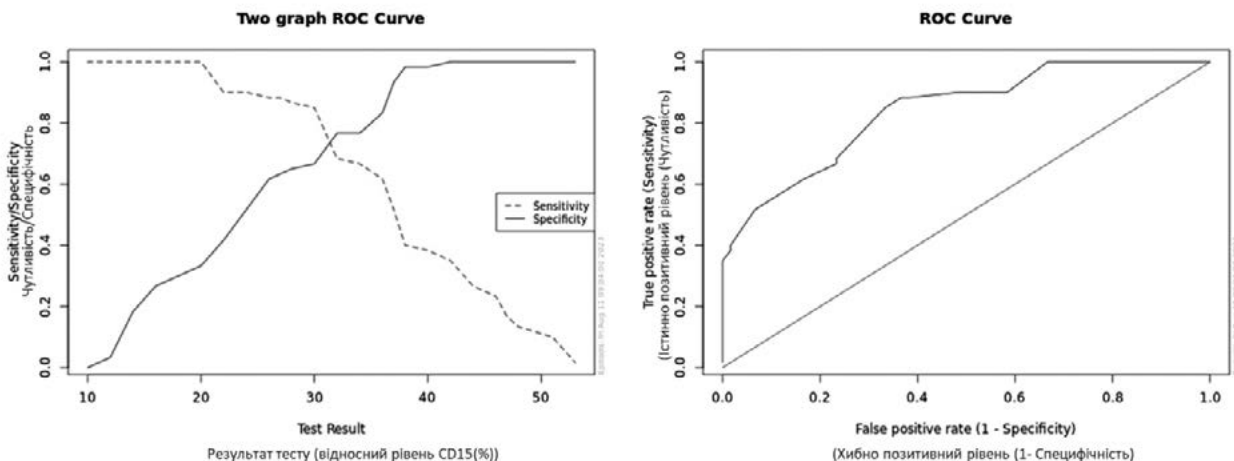


Рис. 2. А – двографікова ROC-крива залежностей чутливості та специфічності від показника відносного рівня CD15+. В – стандартна ROC-крива із зазначенням AUC.

Результати аналізу сили асоціації свідчать, що значення відносного рівня маркера активації нейтрофілів CD15+ >27% збільшує ризик виникнення пошкодження поверхні ока в 10,52 разів ($p < 0,0001$) (табл. 3).

Обговорення

Сьогодні приділяється велика увага ролі імунної системи в розвитку порушень очної поверхні та ХСО. [10, 18].

Середня тривалість життя нейтрофілів становить одну добу, проте в умовах запального процесу вона може значно зростати. [9]. Одним з механізмів регуляції тривалості життя гранулоцитів позитивних до CD15+, CD66b, CD63 та CD11b є аутофагія, а отже і запального процесу шляхом нетозу. Порушення аутофагії супроводжується накопиченням старіючих нейтрофілів з порушенням експресії поверхневих молекул та підвищенням кількості нейтрофільних позаклітинних пасток (neutrophil extracellular traps, NETs) [10].

Цікавим з цього погляду є дослідження кількості лейкоцитів у період відсутності сну при відкритих очах серед пацієнтів з ХСО в порівнянні з контролем, опубліковане Postnikoff S. et al. (2018). [19]. На момент прокидання загальна кількість лейкоцитів (CD45) в групі ХСО становила $1,5 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^6$, та $7,3 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^6$, проте ці відмінності не були вірогідними ($p=0,21$). Хоча співвідношення гранулоцитів до лімфоцитів було вищим в групі сухого ока ($p=0,05$). [19]. Останній результат свідчить на користь запального механізму розвитку ХСО та дозволяє висунути гіпотезу щодо підвищення рівня CD15-позитивних клітин в мікросередовищі поверхні ока.

В деяких роботах описується роль MMP-9 (матрична металопротеїназа 9) в діагностиці та підходах до лікування пацієнтів з ХСО. Так, Sambursky R, Davitt WF, Latkany R. et al. Дійшли висновку, що здатність точно виявляти підвищені рівні MMP-9 може призвести до ранньої діагностики, більш відповідного та кращого лікування захворювань поверхні ока. [20].

Наскільки нам відомо, наше дослідження перше, яке має на меті спрогнозувати ушкодження поверхні ока у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу шляхом оцінки відносного рівня експресії маркера активації нейтрофілів CD15+.

Нами було проведено попереднє дослідження щодо ролі маркера активності нейтрофілів в крові пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу. Ми виявили, що середня експресія CD15+ – маркера активації нейтрофілів у периферичній крові становила 46,7% для пацієнтів із ЦД2 разом із ХСО

Таблиця 2. Оптимальні показники чутливості та специфічності тесту прогностичної значимості рівня CD15*

Індекс Юдена	Чутливість	Специфічність
0,5166	88,3%	63,3%
	95% CI = 77,8 -94,2	95% CI = 50,7 -74,4

Примітка: CI – довірчий інтервал.

Таблиця 3. Асоціація ризику наявності пошкодження очної поверхні у пацієнтів з відносним рівнем CD15 > 27%.

Підгрупа 1 n=60		Підгрупа 2 n=60		OR	95% CI	Z score	p-value
ІН	51	ІН	39	10,52	4,34 – 25,50	5,211	p<0,0001
ХН	9	ХН	21				

Примітка: n – кількість очей; ІП – істинно позитивний; ХН – хибно негативний; ІН – істинно негативний; CI – довірчий інтервал; OR – величина відношення шансів; z-score – стандартизована оцінка; p-value – рівень значущості різниці показників між підгрупами 1 та 2.

та точковою кератопатією та 28,5% для пацієнтів із ЦД2 разом із ХСО та інтактною рогівкою ($p=0,0001$). [14].

Таким чином, в даному дослідженні ми розглядаємо поверхневий антиген CD15+ як потенційний маркер пошкодження поверхні ока у пацієнтів з ЦД 2 типу.

Дана робота має деякі обмеження, а саме, дослідження проведене на пацієнтах старше 60 років, хоча ЦД 2 типу та асоційовані зміни поверхні ока виявляються і в пацієнтів молодшого віку. Ще одним обмеженням є схильність пацієнтів літнього віку до субклінічного перебігу дегенеративних захворювань та виникненню новоутворень, що можуть збільшувати відносний рівень CD15+ в периферичній крові. З метою уникнення вказаних вірогідних впливів, ми плануємо визначати даний показник місцево в клітинах бульбарної кон'юнктиви в різних вікових групах пацієнтів з ЦД 2 типу.

Таким чином, в нашій роботі Вперше оцінено прогностичну роль відносного рівня маркера активації нейтрофілів CD15+ в ушкодженні поверхні ока при цукровому діабеті 2 типу. Достатньо високий показник чутливості біомаркера CD15+ (88,3 %) дозволяє використовувати його як параметр скринінгу наявності ушкодження очної поверхні в пацієнтів з ЦД 2 типу. Відносний рівень експресії маркера нейтрофілів CD15+ в крові у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу >27 % підвищує ризик пошкодження очної поверхні у 10,52 рази (95% CI 4,34 – 25,50; $p < 0,0001$) та може застосовуватись зі скринінговою метою з чутливістю – 88,3% (95% CI = 77,8-94,2) та специфічністю – 63,3% (95% CI = 50,7-74,4).

Автори висловлюють подяку Сучок С.О. за допомогу в статистичній обробці результатів дослідження.

Література

1. **Shih K, Lam KL, Tong L.** Asystematic review on the impact of diabetes mellitus on the ocular surface. *Nutr & Diabetes.* 2017; 7: e251.
2. **Lin X, Xu B, Zheng Y, Coursey TG, Zhao Y, Li J, et al.** Meibomian Gland Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients. *J Ophthalmol.* 2017;2017:3047867.
3. **Szlasa W, Wilk K, Knecht-Gurwin K, Gurwin A, Froń A, Sauer N, et al.** Prognostic and Therapeutic Role of CD15 and CD15s in Cancer. *Cancers.* 2022 Apr 28;14(9):2203.
4. **Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H, Kudo T, Okubo R, Kaneko M, et al.** CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV. *J Biol Chem* 2001; 276(19): 16100–16106.
5. **Gadhoom SZ, Sackstein R.** CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. *Nat Chem Biol.* 2008; 4(12), 751–757.
6. **Oh EJ, Bychkov A, Cho H, Kim TM, Bae JS, Lim DJ, Jung CK.** Prognostic Implications of CD10 and CD15 Expression in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancers,* 2020; 12(6): 1413.
7. **O'Rourke M, Fearon U, Sweeney CM, Basdeo SA, Fletcher JM, Murphy CC, Canavan M.** The pathogenic role of dendritic cells in non-infectious anterior uveitis. *Exp Eye Res.* 2018 Aug;173:121-128.
8. **Mun Y, Hwang JS, Shin YJ.** Role of Neutrophils on the Ocular Surface. *Int J Mol Sci* 2021; 22(19): 10386.
9. **Lahoz-Beneytez J, Elemans M, Zhang Y, et al.** Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood.* 2016;127(26):3431–3438.
10. **Stevenson W, Chauhan SK, Dana R.** Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Arch Ophthalmol.* 2012 Jan;130(1):90-100.
11. **Yu Y, Sun B.** Autophagy-mediated regulation of neutrophils and clinical applications. *Burns & trauma.* 2020; 8: tkz001.
12. **Gorbet M, Postnikoff C, Williams S.** The Noninflammatory Phenotype of Neutrophils From the Closed-Eye Environment: A Flow Cytometry Analysis of Receptor Expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015;56(8):4582-4591.
13. **Nelson JD, Wright JC.** Conjunctival Goblet Cell Densities in Ocular Surface Disease. *Arch Ophthalmol.* 1984;102(7):1049- 1051.
14. **Zhmud TM, et al.** Percentage expression of neutrophil activation marker in the peripheral blood of patients with dry eye disease plus type 2 diabetes. *Journal of Ophthalmol (Ukraine).* 2022; 1: 24-29.
15. **Zhmud T, Drozhzhyna G, Malachkova N.** Evaluation and comparison of subjective and objective anterior ocular surface damage in patients with type 2 diabetes mellitus and dry eye disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2023; 261, 447–452.
16. **Zhmud TM, Drozhzhyna GI, Demchuk AV.** Cytological features of the bulbar conjunctiva in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Ophthalmol (Ukraine).* 2021; 1.
17. **Sergeant ESG,** 2018. Epitools Epidemiological Calculators. Ausvet. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>.
18. **Rolando M, Barabino S, Giannaccare G, Aragona P.** Dealing with the Persistent Pathogenic Issues of Dry Eye Disease: The Importance of External and Internal Stimuli and Tissue Responses. *J. Clin. Med.* 2023, 12, 2205.
19. **Postnikoff CK, Huisingh C, McGwin G, Nichols KK.** Leukocyte Distribution in the Open Eye Tears of Normal and Dry Eye Subjects. *Curr Eye Res.* 2018 Oct;43(10):1253-1259.
20. **Sambursky R, Davitt WF, Laskany R, et al.** Sensitivity and Specificity of a Point-of-Care Matrix Metalloproteinase 9 Immunoassay for Diagnosing Inflammation Related to Dry Eye. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131(1):24–28.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Автор листування: Жмудь Тетяна Михайлівна – gtatyana@email.ua

Внесок кожного автора в роботу: Жмудь Т.М. – курація даних, дослідження, візуалізація, написання-початковий проект, написання – рецензування та редагування; Дрожжина Г.І. – концептуалізація, написання – рецензування та редагування; Величко Л.М. – концептуалізація, написання – рецензування та редагування. *Остаточна версія рукопису ухвалена всіма авторами, які, у свою чергу, несуть повну відповідальність за подання її остаточної версії до друку.*

Відмови від відповідальності: висловлені у поданій статті думки є власними думками авторів, а не офіційними позиціями установи.

Джерела підтримки: відсутні.

Конфлікт інтересів: Автори засвідчують про відсутність конфліктів інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Абревіатури: ЦД – цукровий діабет, ХСО – хвороба сухого ока, ММР-9 – матрична металопротеїназа 9, МЗ – мейбомієві залози.

Надійшла 17.10.2023