

(58)

Poziom wybranych białek antybakteryjnych we łzach u dzieci z cukrzycą typu 1.

Level of selected antibacterial tear proteins in children with diabetes type 1

Agnieszka Moll¹, Krystyna Wyka², Wojciech Młynarski², Anna Niwald¹

¹ Z Kliniki Okulistyki Dziecięcej Katedry Pediatrii Zabiegowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Samodzielny Publiczny Zespół Opieki Zdrowotnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego Nr 4 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: dr hab. n. med. Anna Niwald

² Z Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii I Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Samodzielny Publiczny Zespół Opieki Zdrowotnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego Nr 4 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Wojciech Młynarski

Streszczenie:	<p>Wstęp: w przebiegu cukrzycy ma miejsce osłabienie odporności przeciwbakteryjnej, efektem tego może być zwiększona częstość występowania zakażeń ogólnych i miejscowych.</p> <p>Cel: celem pracy jest ocena miejscowej nieswoistej odporności przeciwbakteryjnej w worku spojówkowym na podstawie określenia stężenia laktoferyny i lizozymu we łzach u dzieci z cukrzycą typu 1.</p> <p>Material i metody: badaniami objęto dzieci w wieku od 10. do 18. roku życia. Do grupy 1. włączono dzieci bez cukrzycy, do grupy 2. – pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1., do grupy 3. – dzieci z długotrwałą cukrzycą, którą leczono przez co najmniej 10 lat. Od wszystkich pacjentów pobierano łzy z dolnego załamka worka spojówkowego do kapilar szklanych w celu określenia poziomów stężeń laktoferyny i lizozymu. Oznaczenia wykonywano metodą ELISA.</p> <p>Wyniki: stężenia laktoferyny u pacjentów we wszystkich grupach nie różniły się istotnie statystycznie. Stężenia lizozymu były znacząco obniżone u pacjentów z długotrwałą cukrzycą (grupa 3.) w porównaniu ze stężeniami u pacjentów w grupie bez cukrzycy (grupa 1.) ($p = 0,02$). Wykazano umiarkowanie silną korelację stężenia laktoferyny i lizozymu u wszystkich analizowanych pacjentów ($r = 0,34$; $p = 0,02$).</p> <p>Wniosek: długotrwała cukrzyca u dzieci zmienia zawartość we łzach wybranych białek, które są jednym z elementów odporności przeciwbakteryjnej.</p>
Słowa kluczowe:	cukrzyca typu 1., łzy, białka przeciwbakteryjne, laktoferyna, lizozym, test ELISA.
Summary:	<p>Purpose: Antibacterial immunity in diabetes is impaired, which increases the risk of general and local infections. The aim of the study was to evaluate non-specific local antibacterial immunity based on lactoferrin and lysozyme concentration in tears in children with diabetes type 1.</p> <p>Material and methods: Children at the age of 10-18 years old were studied. Group 1. consisted of children without diabetes, group 2. included patients with new onset of diabetes and group 3. consisted of children with decade-long diabetes. Among all patients tears were collected from inferior conjunctival fornix with hematocrit glass capillaries in purpose to measure lactoferrin and lysozyme concentration. ELISA method was used in laboratory testing.</p> <p>Results: Level of lactoferrin did not differ significantly among all groups. Concentration of lysozyme was statistically lower in group with decade-long diabetes (group 3.) compared to patients without diabetes. Mild correlation between lactoferrin and lysozyme levels was seen in individual patients in whole group of probands together.</p> <p>Conclusions: Diabetes type 1 in children is associated with significant changes in concentration of tear proteins, which contribute to antibacterial immunity.</p>
Key words:	Diabetes type 1, tears, antibacterial proteins, lactoferrin, lysozyme, ELISA test.

Wstęp

Cukrzyca jest jedną z chorób, w przebiegu których obserwuje się podwyższone ryzyko rozwoju zakażeń różnych narządów i układów. Dotyczy to także narządu wzroku (1). Zwiększona częstość ujawniania się stanów zapalnych u pacjentów z cukrzycą wynika między innymi z osłabienia odporności przeciwbakteryjnej (2). Jednym z czynników, które odgrywają znaczącą rolę w ochronie przed patogenami bakteryjnymi, jest liczna grupa białek znajdujących się w większości płynów tkankowych oraz w ziarnistościach granulocytów, monocytów i makrofa-

gów. Spośród białek antybakteryjnych zawartych we łzach najważniejsze znaczenie mają laktoferyna, lizozym i rozpuszczalne IgA (3).

Laktoferyna odgrywa znaczącą rolę w systemie obrony przeciwbakteryjnej aparatu ochronnego oka, stanowiąc około 25% masy wszystkich białek obecnych we łzach. Jest elementem odporności nieswoistej, wrodzonej. Wykazuje działanie antybakteryjne poprzez wiązanie wolnych jonów żelaza, których obecność jest niezbędna, aby zapewnić wzrost komórek bakteryjnych (4). Dodatkowo laktoferyna ma zdolność do bezpośred-

niej interakcji z powierzchnią bakterii, zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych (5).

Drugim ważnym elementem wrodzonej odporności nieswoistej we łzach jest lizozym. Jest to białko wykazujące działanie przeciwbakteryjne poprzez hydrolizę wiązań peptydoglikanów ściany komórkowej bakterii. Na jego działanie wrażliwe są przede wszystkim bakterie Gram-dodatnie (6).

Cel

Celem pracy jest ocena poziomu miejscowej ochrony przeciwbakteryjnej w worku spojówkowym na podstawie określenia stężeń laktoferyny i lizozymu we łzach u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1.

Materiał i metody

Badaniami objęto dzieci w wieku od 10 do 18 lat, pacjentów poradni okulistyki i diabetologicznej SP ZOZ Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 4 UM w Łodzi. Analizę stężenia wybranych białek we łzach przeprowadzono w obrębie trzech grup. Badana grupa 1. liczyła 20 dzieci bez cukrzycy, grupa 2. – 20 pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1., grupa 3. – 20 dzieci leczonych z powodu cukrzycy przez co najmniej 10 lat.

U analizowanych pacjentów przeprowadzono pełną ocenę okulistyczną narządu wzroku, kwalifikując do dalszych badań dzieci bez stanu zapalnego w zakresie aparatu ochronnego i gałki ocznej. W celu oznaczenia stężeń laktoferyny i lizozymu pobierano łzy z dolnego załamka worka spojówkowego do jednorazowych, nieheparynizowanych, szklanych kapilar hematokrytowych firmy Medlab, miały one pojemność 75 μ l. Niezbędną do oznaczeń, minimalną objętość łez (300 μ l) uzyskiwano w wyniku pobudzenia łzawienia metodą delikatnego mechanicznego podrażnienia śluzówki jamy nosa. Łzy pobierano do kapilar w sposób nieinwazyjny, bezpośrednio z menisku łzowego, bez kontaktu ze spojówką. Uzyskany materiał zamrażano do momentu przeprowadzenia oznaczeń laboratoryjnych. Badania stężeń laktoferyny i lizozymu we łzach wykonywano metodą ELISA z zastosowaniem

swoistych przeciwciał monoklonalnych, w sposób standardowy, z użyciem odczynników firmy ImmunoDiagnostik, Germany i USCN Life Science. Dodatkowo oznaczano całkowitą ilość białka we łzach w badanych próbkach – w tym celu wykorzystano zestaw firmy Sigma, USA. Oznaczenia przeprowadzono w Pracowni Immunopatologii i Genetyki Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii I Katedry Pediatrii UM w Łodzi. Analizie statystycznej poddano względne stężenia laktoferyny i lizozymu, odnosząc je do stężenia całkowitego białka, które oceniano indywidualnie w każdej z pobranych próbek.

Analiza statystyczna

Poziomy lizozym i laktoferyny przedstawiono jako mediany i kwartyle ze względu na anormalny rozkład parametrów w poszczególnych grupach. Do porównań wykorzystano nieparametryczną analizę wariancji Kruskala-Wallisa. Porównania post-hoc przeprowadzono za pomocą testu U Manna-Whitneya z poprawką Bonferroniego. Analizę korelacji wykonano z zastosowaniem testu rang Spearmana. Za poziom istotności przyjmowano wartość $p < 0,05$.

Wyniki

Względne stężenia lizozymu i laktoferyny we łzach, w odniesieniu do stężenia całkowitego białka w próbce, przedstawiono w tabelach I i II.

Stężenia laktoferyny u pacjentów we wszystkich grupach nie różniły się istotnie statystycznie. Znamiennej różnicy w stężeniu tego białka nie wykazała również przeprowadzona analiza wariancji ($H = 3,44$; $p = 0,18$). Dane przedstawiono na rycinie 1.

Stężenia lizozymu miały najwyższą wartość u pacjentów w grupie bez cukrzycy (grupa 1.), a najniższą – u pacjentów z długotrwałą cukrzycą (grupa 3.). Grupy te różniły się statystycznie istotnie ($p = 0,02$). Różnice u pacjentów w pozostałych grupach były nieznamienne. Ponadto przeprowadzona analiza wariancji wykazała istotne różnice stężeń lizozymu u pacjentów we wszystkich badanych grupach ($H = 8,36$; $p = 0,02$). Dane przedstawiono na rycinie 2.

Laktoferyna/białko/ Lactoferrin/protein	N Liczebność grupy/ Amount of patients	Mediana/ Median	Q25 Pierwszy kwartył/ First quartile	Q75 Trzeci kwartył/ Third quartile
Grupa 1.	14,00	3,27	0,28	10,9
Grupa 2.	17,00	8,53	5,03	10,18
Grupa 3.	16,00	5,86	4,33	7,33

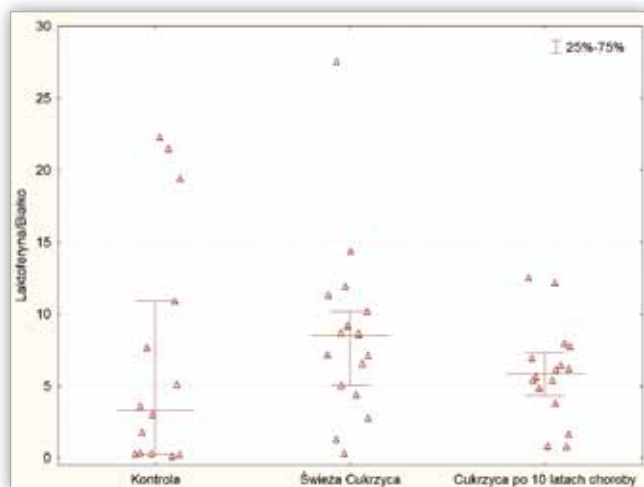
Tab. I. Stężenia laktoferyny we łzach pacjentów w porównywanych grupach.

Tab. I. Lactoferrin concentrations in tears of compared groups.

Lizozym/białko/ Lysozyme/protein	N Liczebność grupy/ Amount of patients	Mediana/ Median	Q25 Pierwszy kwartył/ First quartile	Q75 Trzeci kwartył/ Third quartile
Grupa 1.	14,00	0,16	0,15	0,18
Grupa 2.	17,00	0,13	0,12	0,16
Grupa 3.	16,00	0,12	0,09	0,14

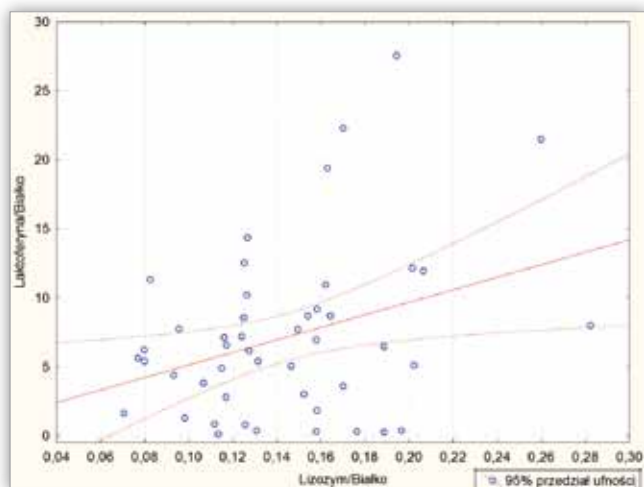
Tab. II. Stężenia lizozymu we łzach pacjentów w porównywanych grupach.

Tab. II. Lysozyme concentrations in tears of compared groups.



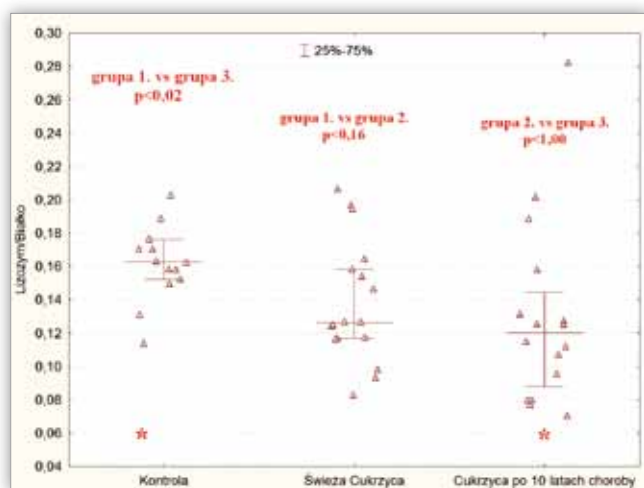
Ryc. 1. Rozkład stężeń laktoferyny we łzach pacjentów w badanych grupach.

Fig. 1. The distribution of lactoferrin concentrations in tears of compared groups.



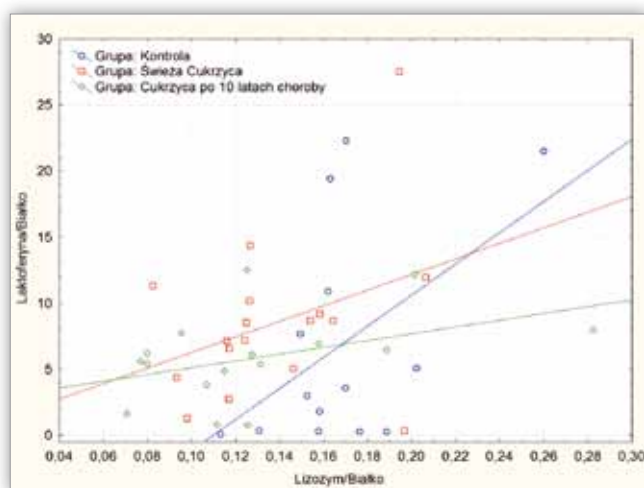
Ryc. 4. Korelacja stężeń lizozymu i laktoferyny we łzach badanych pacjentów, bez względu na przynależność do wyodrębnionych grup.

Fig. 4. Lactoferrin – lysozyme correlation in tears of all tested patients.



Ryc. 2. Rozkład stężeń lizozymu we łzach pacjentów w badanych grupach.

Fig. 2. The distribution of lysozyme concentrations in tears of compared groups.



Ryc. 3. Korelacja stężeń laktoferyny i lizozymu we łzach pacjentów w wyodrębnionych grupach.

Fig. 3. Lactoferrin – lysozyme correlation in tears of compared groups.

Analiza korelacji stężeń laktoferyny i lizozymu u pacjentów w poszczególnych grupach nie wykazała istotności statystycznej. Współczynniki korelacji parametrów wynosiły odpowiednio: $r = 0,35$, $p = 0,23$ w grupie 1., $r = 0,35$, $p = 0,17$ w grupie 2., $r = 0,43$, $p = 0,09$ w grupie 3. Brak znamienności może wynikać ze zbyt małej liczebności badanych grup. Należy zaznaczyć, że pomimo to siła i kierunek korelacji stężeń badanych białek u pacjentów w poszczególnych grupach były zachowane w odniesieniu do całości grupy.

Dodatkowo przeprowadzona ocena korelacji stężeń laktoferyny i lizozymu u poszczególnych pacjentów, bez względu na przynależność do grup, wykazała umiarkowanie silny stopień zależności wartości stężeń tych białek ($r = 0,34$; $p = 0,02$). Dane przedstawiono na rycinach 3, 4.

Dyskusja

Rola białek obecnych we łzach w przebiegu miejscowych i ogólnych stanów chorobowych nie jest w pełni wyjaśniona i pozostaje w kręgu zainteresowań wielu autorów. Dotychczas przeprowadzone badania dotyczące stężeń białek we łzach – najistotniejszych z punktu widzenia odpowiedzi przeciwbakteryjnej, to jest laktoferyny i lizozymu – wykazały fluktuacje ich poziomów u pacjentów w różnych grupach wiekowych. Jednocześnie nie obserwowano różnic zależnych od płci (7,8). McGill i wsp. stwierdzili, że stężenia laktoferyny i lizozymu we łzach obniżają się wraz z wiekiem (9). Badania Saari i wsp. wykazały początkowy wzrost wartości stężenia lizozymu, od momentu urodzenia do 40. roku życia, a następnie powolne obniżanie się (7). Bardzo podobny rozkład stężeń lizozymu we łzach obserwowali inni autorzy (8).

Według dostępnego piśmiennictwa dane nt. norm określających zawartość poszczególnych białek we łzach różnią się w sposób istotny (8-11). W związku z powyższym bardziej miarodajne jest przedstawianie względnych wartości stężeń w odniesieniu do białka całkowitego we łzach (12). Takie założenia przyjęto też w przeprowadzanej przez nas analizie.

Pozyskując materiał do naszych badań, pod uwagę wzięto dwa istotne czynniki, które mogą zmieniać naturalny skład łez, to jest sposób ich pobrania i rodzaj stymulacji łzawienia. Zasto-

sowano metody, które ograniczyły wpływ tych czynników na stężenia białek zawartych we łzach.

Uzyskiwanie łez sposobem wykorzystującym paski Schirmera powoduje gromadzenie się w próbkach większej ilości białek niż ma to miejsce podczas stosowania szklanych kapilar (13). Różnice w ilości i jakości białek we łzach pobranych obiema metodami wynikają prawdopodobnie z bardziej traumatycznego charakteru pierwszej z nich. Paski Schirmera, pozostające przez kilka minut w mechanicznym kontakcie z nabłonkiem spojówek powiekowej i gałkowej, działają drażniaco na aparat ochronny oka. Potwierdzają to obserwacje Greena-Churcha i wsp., którzy we łzach zbieranych metodą pasków Schirmera zidentyfikowali 84 białka, dla porównania – w badaniach przeprowadzonych metodą z użyciem kapilar określono 43 białka. W materiale zebranych pierwszym sposobem autorzy ci wykazali większe zawartości różnych rodzajów białek, w tym metabolicznych, strukturalnych, transportowych i białek odpowiedzi immunologicznej oraz dodatkowo stwierdzili obecność białek o właściwościach antyoksydacyjnych (13). Biorąc pod uwagę powyżej przytoczone obserwacje, zastosowaliśmy metodę pobierania łez z wykorzystaniem szklanych kapilar, pozwoliło to na uniknięcie mechanicznego podrażnienia spojówek i uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników.

W przeprowadzonych przez nas badaniach zmniejszono wpływ stymulacji na zawartość białek we łzach, stosując pobudzenie łzawienia ograniczone jedynie do mechanicznego podrażnienia śluzówki nosa. Wykorzystano działanie odruchu nosowo-łzowego, w którym zwiększone łzawienie następuje w wyniku pobudzenia włókien czuciowych nerwu trójdzielnego w śluzówce jamy nosa i włókien wydzielniczych nerwu twarzowego w gruczole łzowym. Fullard i wsp. stosując podobny rodzaj stymulacji łzawienia, zaobserwowali, że pobudzenie odruchu nosowo-łzowego nie wpływało znacząco na poziom białek produkowanych przez gruczoł łzowy, w tym analizowanych przez nas laktoferyny i lizozymu. Zmieniał się natomiast skład białek pochodzenia osoczowego, takich jak albuminy, transferyna i przeciwciała klasy IgG (14). Zawartość białek we łzach u pacjentów leczonych z powodu chorób, które powodowały uogólnione obniżenie odporności, stanowi ciekawe zagadnienie z punktu widzenia roli, jaką mogą one odgrywać w miejscowej, nieswoistej ochronie przeciwzakaźnej. Obecnie wiadomo, że u chorych na cukrzycę zwiększona podatność na zakażenia bakteryjne, wirusowe i grzybicze wynika między innymi ze zmniejszonej zdolności neutrofilów do fagocytozy i osłabienia ich zdolności bójczych (15). Powyżej opisane zmiany nasilają się w przebiegu cukrzycy źle wyrównanej, w warunkach zwiększonej ketoaktywności i hiperglikemii (16-18). Przedmiotem badań wciąż pozostaje ocena roli, jaką pełnią białka zawarte we łzach w procesach zapalnych przebiegających u chorych na cukrzycę. W dostępnym piśmiennictwie nieliczne są doniesienia dotyczące tego tematu. Brak jest publikacji określających, jaka jest zawartość białek antybakteryjnych we łzach u dzieci z cukrzycą typu 1. Badania przeprowadzone przez Jensena i wsp. nie wykazały istotnych różnic w poziomach laktoferyny we łzach u dorosłych pacjentów z cukrzycą i u osób zdrowych. Autorzy nie obserwowali także korelacji, jaka zachodzi między stężeniami laktoferyny we łzach a długością trwania cukrzycy. Łzy pobierano, stosując metodę podobną do tej, którą wykorzystaliśmy w naszych badaniach – z użyciem szklanych kapilar i z zastoso-

waniem testu ELISA (19). Tak jak w badaniach Jensena i wsp. przeprowadzone przez nas oznaczenia nie wykazały istotnych różnic statystycznych w stężeniach laktoferyny, chociaż jej poziom w momencie rozpoznania cukrzycy był w naszych badaniach nieznacznie podwyższony.

Wykonana przez nas analiza dotycząca lizozymu wykazała istotne obniżenie jego stężenia we łzach u dzieci leczonych na cukrzycę przez co najmniej 10 lat, według porównania z poziomem stężenia u dziećmi bez cukrzycy. Są to wyniki odmienne od wyników publikowanych w doniesieniach innych autorów. Stolwijk i wsp. w badaniach z udziałem dorosłych pacjentów z retinopatią cukrzycową stwierdzili, że stężenia lizozymu we łzach ich pacjentów są podwyższone w porównaniu ze stężeniami u osób bez cukrzycy. Stężenie lizozymu autorzy ci określali metodą techniki wysokowydajnej chromatografii cieczowej (HPLC) (20). Z kolei Grus i wsp. nie obserwowali różnic w ilościach laktoferyny i lizozymu we łzach u dorosłych pacjentów zdrowych i u chorych na cukrzycę. Autorzy ci stwierdzili natomiast obecność nowych białek o masie cząsteczkowej 30-50 kDa, które występowały tylko we łzach osób chorujących na cukrzycę. Do oznaczenia poziomu białek zastosowali odmienną od naszej metodę elektroforezy żelowej, tzn. pobierali do szklanych kapilar (21).

Stwierdzona przez nas, obniżona zawartość białek ochronnych we łzach u pacjentów chorujących przewlekłe na cukrzycę może nieść ze sobą podwyższone ryzyko wystąpienia infekcji aparatu ochronnego i przedniego odcinka gałki ocznej. Badania Kruse i wsp. wykazały zwiększoną częstość ujawniania się ostrego bakteryjnego zapalenia spojówek u osób z cukrzycą (1). Jedyne jednak dostępne doniesienie na temat stężenia lizozymu we łzach w przypadkach nawracających stanów zapalnych aparatu ochronnego i gałki ocznej dotyczy osób bez cukrzycy (7). W badaniach Saario i wsp. wykazano zmniejszoną zawartość lizozymu we łzach u pacjentów z herpetycznym zapaleniem rogówki. Autorzy ci nie wykazali natomiast takiej analogii w przebiegu innych stanów zakaźnych, takich jak zapalenia brzegów powiek, spojówek czy rogówki (7).

Oslabienie miejscowej odpowiedzi przeciwzakaźnej u dzieci z cukrzycą typu 1. jest zagadnieniem złożonym, zależnym od patofizjologicznych procesów leżących u podstaw cukrzycy, jak również zaburzeń będących jej następstwem. Mogą one wpływać zarówno na odporność humoralną, jak i komórkową, powodując zmniejszenie stężenia niektórych cytokin prozapalnych i składników układu dopełniacza, osłabiając zdolność do chemotaksji i fagocytozy komórek stanu zapalnego (22). Rola, jaką odgrywają tzn. w rozwoju reakcji immunologicznej w odpowiedzi na czynniki zakaźne w cukrzycy, wciąż jest niejasna, aby ją określić, potrzeba dalszych prospektywnych badań, które poszerzyłyby wiedzę na temat miejscowej ochrony przeciwzapałnej w tej chorobie.

Wniosek

Długotrwała cukrzyca u dzieci zmienia zawartość we łzach wybranych białek, które są jednym z elementów odporności przeciwbakteryjnej.

Praca finansowana przez UM w Łodzi z pracy własnej
Nr 502-11-754.

Piśmiennictwo:

1. Kruse A, Thomsen RW, Hundborg AA: *Diabetes and risk of acute infectious conjunctivitis—a population-based case-control study*. Diabet Med 2006, 23(4), 393-397.
2. Shah BR, Hux JE: *Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes*. Diabetes Care 2003, 26, 510-513.
3. Fung K, Morris C, Duncan M: *Mass spectrometric techniques applied to the analysis of human tears. A focus on the peptide and protein constituents*. Adv Exp Med Biol 2002, 506, 601-605.
4. Flanagan JL, Willcox MDP: *Role of lactoferrin in the tear film*. Biochemie 2009, 91, 35-43.
5. Orsi N: *The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives*. BioMetals 2004, 17, 189-196.
6. Kijlstra A: *The role of lactoferrin in the nonspecific immune response on the ocular surface*. Reg Immunol 1990-1991, 3(4), 193-197.
7. Saari KM, Aine E, Posz A, Klockars M: *Lysozyme content of tears in normal subjects and in patients with external eye infections*. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 1983, 21, 86-88.
8. Sen DK, Sarin GS: *Biological variations of lysozyme concentration in the tear fluids of healthy persons*. Br J Ophthalmol 1986, 70, 246-248.
9. McGill JI, Liakos GM, Goulding N, Seal DV: *Normal tear protein profiles and age-related changes*. Br J Ophthalmol 1984, 68, 316-320.
10. Mackie IA, Seal DV: *Diagnostic implications of tear protein profiles*. Br J Ophthalmol 1984, 68, 321-324.
11. Kijlstra A, Jeurissen SHM, Koning KM: *Lactoferrin levels in normal human tears*. Br J Ophthalmol 1983, 67(3), 199-202.
12. Gachon AM, Richard J, Dastugue B: *Human tears: Normal protein pattern and individual protein determination in adults*. Curr Eye Res 1982, 5, 301-308.
13. Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, Zhang L, Nichols JJ: *Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches*. Mol Vis 2008, 14, 456-470.
14. Fullard RJ, Snyder C: *Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects*. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990, 31, 1119-1126.
15. Bilgic S, Aktas E, Salman F, Ersahin G, Erten G, Yilmaz MT, Deniz G: *Intracytoplasmic cytokine levels and neutrophil functions in early clinical stage of type 1 diabetes*. Diabetes Res Clin Pract 2008, 79, 31-36.
16. Bagdade JD, Root RK, Daulger RJ: *Impaired leucocyte function in patients with poorly controlled diabetes*. Diabetes 1974, 23(1), 9-15.
17. Nolan CN, Beaty HN, Bagdade JD: *Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes*. Diabetes 1978, 27 (9), 889-894.
18. Wilson RM, Reeves WG: *Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes*. Clin Exp Immunol 1986, 63, 478-484.
19. Jensen OL, Gluud BS, Birgens HS: *The concentration of lactoferrin in tears of normals and of diabetics*. Acta Ophthalmol 1986, 64, 83-87.
20. Stolwijk TR, Kuizenga A, van Haeringen NJ, Kijlstra A, Oosterhuis JA, van Best JA: *Analysis of tear fluid proteins in insulin-dependent diabetes mellitus*. Acta Ophthalmol 1994, 72(3), 357-362.
21. Grus FH, Sabuncuo P, Dick HB, Augustin AJ, Pfeiffer N: *Changes in the tear proteins of diabetic patients*. BMC Ophthalmology 2002, 31, 2-4.
22. Geerlings SE, Hoepelman AI: *Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM)*. FEMS Immunol Med Microbiol 1999, 26(3-4), 259-265.

The study was originally received 14.02.2011 (1278)/
Praca wpłynęła do Redakcji 14.02.2011 (1278)/
Accepted for publication 31.10.2011/
Zakwalifikowano do druku 31.10.2011 r.

Reprint requests to/ Adres do korespondencji:

dr n. med. Agnieszka Moll
Klinika Okulistyki Dziecięcej Katedry
Pediatrii Zabiegowej UM w Łodzi
SP ZOZ Uniwersytecki Szpital Kliniczny Nr 4
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.
ul. Sporna 36/50
91-738 Łódź
e-mail: agnieszkamoll@wp.pl