

Рівень лактоферину в сльозі хворих із рецидивуючим стромальним герпетичним кератитом і терапевтичний ефект очних крапель «Лакто» в комплексному лікуванні

Г. І. Дрожжина, д-р мед. наук; Н. І. Храменко, канд. мед. наук; К. В. Середа, канд. мед. наук;
Л. Ю. Рязанова, аспірант; Л. М. Величко, д-р мед. наук

ДУ «Інститут очних
хвороб і тканинної
терапії ім. В.П. Філатова
НАМН України»;
Одеса (Україна)

Актуальність. Стромальний герпетичний кератит (СГК) є імуномодульованим захворюванням, що виникає в результаті реактивації вірусу простого герпесу (ВПГ 1 та 2 типу). СГК – найчастіша форма ураження рогівки (20–50% випадків) у разі рецидиву ГК, яка призводить до значного зниження зору. Відомо, що зміни в біосполуках сльози можуть відображати стан поверхні ока й виявляти патологію, тому можуть бути також діагностичними маркерами. Серед таких сполук – лактоферин (ЛФ), який має антибактеріальну, протигрибкову, протівірусну, протипаразитарну, протизапальну, імуномодулювальну, антиоксидантну й інші властивості.

Мета дослідження: визначити концентрацію лактоферину в сльозі пацієнтів із рецидивуючим стромальним герпетичним кератитом на стадії загострення, його вплив на функціональні показники стану поверхні ока й терапевтичний ефект очних крапель «Лакто» в комплексному лікуванні захворювання.

Матеріал та методи. Обстежено 17 хворих із рецидивуючим СГК в період рецидиву: 17 очей – із СГК, 17 – парні очі цих пацієнтів. Усім пацієнтам проведено офтальмологічне дослідження, яке включало біомікроскопію бульбарної кон'юнктиви та рогівки з флуоресцеїновим тестом, визначення чутливості рогівки й основної сльозопродукції (тест Ширмера-II), а також мікробіологічне дослідження кон'юнктиви. Концентрацію ЛФ у сльозі визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням тест-системи (виробник – Elabscience Biotechnology Inc., Китай). Результати оцінювали фотометрично на мікропланшетному імуноферментному аналізаторі «StatFax 2100» (виробник – «AwarenessTechnologyINC», США) за довжини хвилі 450 нм. Інстиляцію крапель «Лакто» призначали 2 рази на добу протягом 30 днів. Концентрацію ЛФ у сльозі визначали до призначення крапель «Лакто» й на 30 добу їх застосування.

Результати. У сльозі очей хворих на рецидивуючий СГК концентрація ЛФ дорівнювала в середньому $1,21 \pm 0,52$ (мг/мл) без суттєвих розбіжностей показника для хворого та парного ока. Але в разі СГК номінальний показник концентрації ЛФ нижче за норму зустрічався частіше порівняно з парним оком ($\chi^2=4,24$, $p=0,04$). Курс протизапального лікування із застосуванням крапель «Лакто» підвищив концентрацію ЛФ у сльозі ока із СГК на 47% до $1,78 \pm 0,7$ (мг/мл). На оці із СГК чутливість рогівки (ЧР) знижена у 12,4 раза частіше, ніж на парному оці (відношення шансів $OR=12,4$ при 95% CI (2,0–76,8)), що відображає нейросенсорні порушення хворого ока. За значення ЛФ у сльозі нижче за норму порушення ЧР частіше відзначається при СГК, ніж на парному оці. Рівень основної сльозопродукції мав нижчі її значення (7–8 мм) за низьких концентрацій ЛФ у сльозі порівняно зі сльозопродукцією за пробою Ширмера-II (13–16 мм) з вищими концентраціями ЛФ у сльозі: встановлено прямий кореляційний зв'язок цих показників $r=0,45$ ($p<0,05$). У хворих на рецидивуючий СГК під час мікробіологічного дослідження кон'юнктивальної порожнини очей у 29,4% випадків виявлено зростання супутньої умовно-патогенної та грибової мікрофлори. Курс комплексного протизапального лікування із застосуванням крапель «Лакто» сприяв ліквідації цих культур.

Висновок. Визначено середні показники ЛФ у сльозі при СГК як на хворому, так і парному оці, певні взаємозв'язки функціональних показників стану поверхні як хворого, так і парного ока при СГК залежно від рівня експресії ЛФ у сльозі. Підтверджено сануючий ефект очних крапель «Лакто» у хворих із рецидивуючим СГК за наявності супутньої мікрофлори в кон'юнктивальній порожнині, що підтверджується відсутністю зростання культур після курсу комплексного протизапального лікування.

Ключові слова:

рогівка, герпетичний кератит,
сльозопродукція, чутливість
рогівки, лактоферин,
імуноферментний аналіз,
мікрофлора кон'юнктиви ока

Вступ. Стромальний герпетичний кератит (СГК) є імуномодульованим захворюванням, що виникає в результаті реактивації вірусу простого герпесу (ВПГ 1 та 2 типу). Важливими ланками патогенезу СГК вважають залучення клітинного імунітету до антигенів рогівки, які активує герпетична інфекція, і побічні ефекти прозапальних цитокінів, що секретують інфіковані клітини рогівки. Суттєву роль може відігравати тип запальної реакції в стромі рогівки [1]. Стромальний герпетичний кератит може бути не некротизуючим (інтерстиціальним або дископодібним) і некротизуючим. Клінічні ознаки не некротизуючого СГК включають набряк стромі рогівки округлої або овальної форми, дрібні преципітати на ендотелії, які локалізуються в зоні набряку стромі і стають видні в разі його зменшення, та іридоцикліт. Ці зміни викликає реактивація ВПГ проникненням його в рогівку й імунно-опосередкована реакція тканин рогівки на вірусний антиген. Потужна імунна відповідь на вірусні білки призводить до інфільтрації лейкоцитів, пошкодження стромі рогівки й ендотелію, які в сукупності сприяють набряку рогівки та її помутнінню. СГК – найчастіша форма ураження рогівки (20–50% випадків) у разі рецидиву герпетичного кератиту (ГК), яка призводить до значного зниження зору [2, 3].

Існують природні антимікробні білки й пептиди, що продемонстрували здатність інгібувати вірусну інфекцію та блокувати проникнення вірусу в клітину-хазяїна або впливати на пізні стадії вірусного зростання, у тому числі білок лактоферин (ЛФ), який має антибактеріальну, протигрибкову, протівірусну, протипаразитарну, протизапальну, імуномодулювальну, антиоксидантну, протипухлинну та інші властивості. ЛФ є залізов'язувальним глікопротеїном з молекулярною масою 80 кДа, що містить близько 690 амінокислотних залишків. Через свою здатність зв'язувати Fe^{3+} іони ЛФ класифікується як хелатор заліза, член сімейства трансферинів. ЛФ міститься в багатьох секретах слизових оболонок і виконує низку функцій, включаючи імунну стимуляцію та протівірусну активність щодо не тільки вірусів ВПГ-1 і ВПГ-2, а й ротавірусу, респіраторно-синцитіального вірусу, цитомегаловірусу, вірусу паратифу, вірусу папіломи людини, аденовірусу, вірусу гепатиту С та ВІЛ. Також повідомляється про протівірусну активність N-кінцевого похідного від пепсину фрагмента ЛФ – лактоферицину (Lfcin). Передбачається, що механізм дії ЛФ і Lfcin проти ВПГ частково включає їх взаємодію з глікозаміноглікановим гепарансульфатом клітинної поверхні, тим самим блокуючи проникнення вірусу в клітину. ЛФ запобігає проникненню вірусу в клітину-хазяїна шляхом блокування клітинних рецепторів, або прямого зв'язування з вірусними частинками. Деякі автори відзначають протівірусний ефект ЛФ у ранній фазі інфекції [4–7].

Завдяки унікальному поєднанню протимікробної та протизапальної дії ЛФ у слюзі відіграє важливу роль у підтриманні здорової поверхні ока. ЛФ пригнічує про-

никнення вірусних частинок в епітеліальні клітини. Надлишок ЛФ у слізній плівці, як вважають, обмежує опортуністичне ЛФ-опосередковане зв'язування аденовірусу та клітини-хазяїна, що відбувається в інших тканинах [8]. ЛФ відіграє важливу роль у захисті від інфекції в разі ВПГ кератиту [9]. ЛФ пригнічує зростання бактерій у кон'юнктивальному мішку й запобігає утворенню скупчень ВПГ-1 [10]. Відомо, що ЛФ інгібує ВПГ, перешкоджаючи зв'язуванню вірусу з клітинами-мішенями, але також призводячи до порушення внутрішньоклітинного перенесення віріонів ВПГ [8, 11].

Останні десятиліття ацикловір став золотим стандартом лікування ВПГ-інфекцій. Однак тривале протівірусне лікування, оскільки воно потрібне переважно пацієнтам з ослабленим імунітетом, призводило до виникнення резистентності до ацикловіру й інших протівірусних препаратів. Таким чином, існує очевидна потреба в розробленні нових протівірусних препаратів, які поєднують високу біодоступність і добру переносимість із низьким рівнем побічних ефектів [12].

У цьому контексті увагу дослідників привернуло лактоферин. Крім добре відомого антибактеріального ефекту, зростає інтерес до його потенційного застосування для лікування вірусних інфекцій як місцево, так і системно [13]. Ранні експериментальні дослідження показали, що місцеве введення 1% лактоферину пригнічує інфікування ВПГ-1 типу в рогівці миші [10]. Запропоновані контактні лінзи з ЛФ-навантаженням для лікування патологій поверхні ока [14]. Визначено, що пероральне введення лактоферину збільшує вироблення цитокінів Th1, включаючи IFN-gamma, IL-12 та IL-18, які можуть посилювати захист хазяїна від інфекції ВПГ [15]. У нових перспективних дослідженнях в експерименті показано, що наночастинки срібла та золота, модифіковані лактоферином (LF-Ag/AuNP), можуть стати новими мікробіцидами при ВПГ-2 [16]. Сьогодні дослідники виявляють інтерес до застосування препаратів лактоферину також під час вірусного кон'юнктивіту, який є клінічним проявом COVID-19 [17–19].

Таким чином, біоактивні сполуки, які є фізіологічними складниками тканин людини, можуть впливати як на морфологію, так і на функцію компонентів системи очної поверхні та брати участь у кількох метаболічних і клітинних шляхах, спрямованих на збереження гомеостатичного балансу. У зв'язку з цим ЛФ відповідає потребі розроблення нових методів лікування інфекцій на поверхні ока. У цій галузі ЛФ можна застосовувати або як окремий терапевтичний засіб, або в поєднанні з іншими видами лікування для досягнення максимальної ефективності [17]. Зміни в протеомах слюзи можуть відображати стан поверхні ока, тому можуть бути також діагностичними маркерами її патологічних змін [20]. Пріоритетом дослідження було вивчення рівня ЛФ у слюзі при рецидивуючому СГК та взаємозв'язку цього показника з рівнем функціону-

вання деяких систем поверхні ока, а також визначення терапевтичного впливу місцевого застосування препарату, що містить ЛФ.

Мета дослідження: визначити концентрацію лактоферину в слюзі пацієнтів із рецидивуючим стромальним герпетичним кератитом на стадії загострення, його вплив на функціональні показники стану поверхні ока й терапевтичний ефект очних крапель «Лакто» в комплексному лікуванні захворювання.

Матеріал та методи

Дослідження проводили на базі відділу патології рогівки та лабораторії імунології ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України» в період із січня по грудень 2021 року. Дослідження проводили за участі людей, схвалено комітетом з біоетики інституту. У роботі передбачено заходи щодо забезпечення безпеки та здоров'я пацієнтів, дотримання їхніх прав, людської гідності й моральних норм відповідно до принципів Гельсінкської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини та відповідних законів України. Письмова інформована згода отримана від кожного учасника після докладного пояснення характеру дослідження.

Обстежено 17 хворих із рецидивуючим некро-тизуючим СГК в період рецидиву: 17 очей були з герметичним стромальним кератитом, 17 – парні очі цих пацієнтів. Вік хворих – $48,7 \pm 16,0$ років. Діагноз СГК виставляли на підставі вивчення анамнезу, аналізу симптомів і клінічних ознак захворювання, визначених під час клінічного дослідження пацієнта. Усі пацієнти мали в анамнезі не менше двох рецидивів СГК. У ході дослідження всім пацієнтам проведено загальне офтальмологічне дослідження, яке включало біомікроскопію бульбарної кон'юнктиви та рогівки з флуоресцеїновим тестом, а також визначення чутливості рогівки й основної слюзопродукції (тест Ширмера-II).

Основну слюзопродукцію оцінювали за тестом Ширмера-II (модифікація Джонес із попередньою анестезією та видаленням умісту кон'юнктивальної порожнини перед дослідженням): зволоження фільтрувального паперу ≥ 10 мм за 5 хвилин – норма.

Чутливість рогівки (ЧР) оцінювали за допомогою ватного ґнітика, кінцем якого обережно торкалися центру рогівки, а потім у 4 точках на периферії. За нормальної чутливості хворий відчуває різке подразнення та намагається заплющити очі. Якщо цього не відбувається, то використовують більш товсті частини ґнітика, у такому випадку оцінюють зниження чутливості рогівки. Якщо в разі дотику корнеальний рефлекс не виникає, то чутливість рогівки вважають відсутньою. Оцінювання виконували за шкалою балів від 0 (відсутня чутливість) до 2 (норма) у кожній точці. Максимальна кількість балів – 10. За загальної суми балів 10 – чутливість рогівки в нормі, від 9 до 1 – свідчать про зниження чутливості й/або її відсутність в одній із зон рогівки, 0 – повна відсутність чутливості.

Показник ксерозу кон'юнктиви й рогівки – флуоресцеїновий тест (за методикою О. Р. Bijsterveld, 1969; у балах 9-бальної шкали): під час фарбування розчином флуоресцеїну розраховували за допомогою традиційного візуального аналізу в трьох зонах: темпоральної бульбарної кон'юнктиви, рогівки й назальної бульбарної кон'юнктиви. Оцінювання виконували за 3-бальною системою, після чого бали в кожній анатомічній зоні підсумовували. Максимальна сума балів – 9. За загальної суми балів до 3,5 стан епітелію рогівки й кон'юнктиви оцінювали як нормальний, більше ніж 3,5 – патологічне фарбування.

Для визначення супутньої мікрофлори кон'юнктиви до та після лікування проводили стандартне мікробіологічне дослідження.

Критерії виключення хворих із дослідження такі: наявність хірургічних втручань на очах за останні 6 місяців, наявність системних аутоімунних захворювань, наявність захворювань очей, які потребують постійного використання очних крапель, наявність дефектів епітелію, ерозій або виразок рогівки.

Хворі із СКГ отримували місцево в око з кератитом розчин антисептика мірамистину 4 рази на добу, розчин рекомбінантного інтерферону альфа-2b 4–5 разів на добу, 0,1% розчин дексаметазону 3–4 рази на добу, слюзозамінник із гіалуроновою кислотою без консервантів 5 разів на добу; мідріатики 1–2 рази на добу, системно валацикловір по 500 мг 2 рази на добу, нестероїдні протизапальні засоби внутрішньо-язово. Інстиляцію очних крапель «Лакто» (НОВАКС® ФАРМА) призначали 2 рази на добу в обидва ока протягом 30 днів.

Концентрацію лактоферину в слюзі визначали до призначення крапель «Лакто» й на 30 добу його застосування. Імунологічні дослідження з визначення рівня лактоферину проведено в слізній рідині в усіх хворих на СГК. Слізну рідину збирали вранці до виконання лікувальних і діагностичних процедур за допомогою стерильної пластикової насадки, яка закріплюється на піпетковому дозаторі. Відібрану слізну рідину зберігали при температурі -20°C до проведення імунологічних досліджень.

Концентрацію лактоферину визначали методом твердофазного імуоферментного аналізу з використанням тест-системи та відповідної інструкції щодо застосування набору реагентів для кількісного визначення лактоферину людини (виробник – Elabscience Biotechnology Inc., Китай). Результати оцінювали фотометрично на мікропланшетному імуоферментному аналізаторі «StatFax 2100» (виробник – «Awareness Technology INC», США) за довжини хвилі 450 нм.

Статистичний аналіз. Накопичення, коригування, візуалізація та систематизація одержаних результатів, статистичний аналіз проводили в електронних таблицях із використанням програми STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc). Номінальні дані описували із зазначенням абсолютних значень і відсоткових часток. Кількіс-

ні показники оцінювали відповідно до нормального розподілу за критерієм W (Shapiro-Wilk's test). У разі нормального розподілу дані об'єднували у варіаційні ряди, у яких розраховували середні арифметичні величини (M) і стандартні відхилення (SD), що в статистці позначається як $M \pm SD$, меж 95% довірчого інтервалу (95% ДІ). Під час порівняння середніх величин нормально розподілених сукупностей розраховували t-критерій Стьюдента. Сукупності кількісних показників, розподіл яких відрізнявся від нормального, описували за допомогою значень медіани (Median), нижнього (25%) і верхнього (75%) квантилів (Q_{low} – Q_{up}). Для їх порівняння використовували U-критерій Манна-Уїтні.

Частотний аналіз проводили шляхом порівняння номінальних даних за критерієм χ^2 Пірсона за таблицею спряження. Як кількісну міру ефекту під час порівняння відносних показників застосовували показник відношення шансів (OR), що визначається як відношення ймовірності настання події в групі, підданої впливу фактора ризику, до ймовірності настання події в контрольній групі. Показник відношення шансів розраховували виходячи з отриманих таблиць спряження. З метою проєктування отриманих значень OR на генеральну сукупність ми розраховували межі 95% довірчого інтервалу (95% ДІ).

Результати

Досліджено концентрацію лактоферину в сльозі як ока із СГК, так і парного ока. Гістограма розподілу концентрації лактоферину в сльозі обох очей зображена на рисунку 1. Середня величина показника рівнялася $1,21 \pm 0,52$ мг/мл.

У сльозі хворого ока цей показник дорівнював $1,16 \pm 0,47$ мг/мл 95% ДІ (0,91–1,4), на парному оці була тенденція до вищого показника – $1,30 \pm 0,47$ мг/мл 95% ДІ (0,89–1,7).

За даними метааналізу (Ponzini E et al., 2020) [21] сучасної літератури, у здорових людей концентрація лактоферину в сльозі становить у середньому 1,42 мг/мл [8, 21–23]. Таким чином, якщо враховувати міжнародні дані середнього показника, то в разі СГК є зни-

ження концентрації лактоферину на 18,3% на хворому оці й на 8,4% на парному оці. Під час аналізу частотних характеристик виявлено, що концентрація ЛФ менше ніж 1,42 (мг/мл) на оці із СГК була на 12 очах, а на парних – на 6 очах ($\chi^2=4,24$, $p=0,039$). Отже, частіше нижче за норму зустрічалися показники концентрації ЛФ на оці із СГК.

Після лікування із застосуванням очних крапель «Лакто» концентрація ЛФ у сльозі ока зі СГК підвищилася до $1,78 \pm 0,7$ мг/мл за 95% ДІ (0,61–2,9 мг/мл), що було значно вищим за вихідний показник на 53,4% ($p=0,01$). Після лікування хворого ока на парному оці концентрація ЛФ у сльозі становила $1,34 \pm 0,2$ мг/мл ($p=0,4$), що було на 32,8% нижче ($p=0,01$), ніж на оці із СГК (табл. 1).

Аналіз чутливості рогівки (ЧР) виявив, що загалом по групі найчастіше зустрічається висока ЧР (10 балів) на парному оці порівняно із СГК: 72,7% супротив 17,6% випадків відповідно ($\chi^2=8,5$, $p=0,004$) (табл. 2). Під час аналізу особливостей ЧР щодо вихідної концентрації ЛФ у сльозі з'ясували, що на очах із СГК рідше зустрічається висока чутливість рогівки (ЧР) (10 балів) ($\chi^2=5,4$, $p=0,02$) за концентрації ЛФ нижче за 1,21 мг/мл, ніж за такої самої концентрації ЛФ на парному оці (табл. 2). За більш високої концентрації ЛФ у сльозі значущих закономірностей між очима не виявлено.

Під час вивчення розподілу ЧР стосовно світової норми ЛФ=1,42 мг/мл пропорції цього показника ЧР залишаються без змін (табл. 2). За нижчої концентрації ЛФ залишається незмінною нижча ЧР ока зі СГК порівняно з парним оком ($\chi^2=8,65$, $p=0,003$). Таким чином, за нижчої концентрації ЛФ відзначається більш значне порушення ЧР на хворому оці порівняно з парним оком.

Загалом по групі порушення ЧР ока із СГК, що відповідатиме градації 1–9 балів, зустрічається в середньому у 12,4 раза частіше, ніж на парному оці, що відповідає відношенню шансів OR=12,4 за 95% ДІ (2,0–76,8). Це відображає нейросенсорні порушення ока із СГК.

Під час визначення частотного розподілу кількості очей по всій когорті досліджених хворих за показником флуоресцеїнового тесту щодо концентрації ЛФ у сльозі вище та нижче за її середні й нормальні значення достовірних відмінностей не виявлено (табл. 3). Це може бути пов'язано з тим, що в дослідження не брали хворих із дефектами епітелію та ерозіями рогівки, а в процесі лікування ускладнень не спостерігали.

Аналіз рівня основної сльозопродукції за пробою Ширмера-П свідчив про нижчі її значення (7–8 мм) за низьких концентрацій ЛФ у сльозі (табл. 4) порівняно з вищими концентраціями ЛФ, за яких основна сльозопродукція дорівнювала (13–16 мм) щодо її середніх і нормальних значень ($p<0,05$). Встановлено прямий кореляційний зв'язок цих показників $r=0,45$ ($p<0,05$). Таким чином, у разі зниження концентрації ЛФ у сльозі

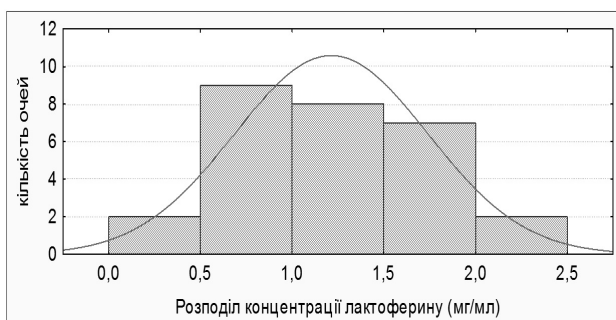


Рис. 1. Розподіл концентрації лактоферину в сльозі хворого й парного ока у хворих на стромальний герпетичний кератит

Таблиця 1. Концентрація лактоферину (мг/мл) у сльозі хворих зі стромальним герпетичним кератитом до та після лікування

Група	Око, n – кількість	Статистичні показники	Концентрація лактоферину (мг/мл)	
			до лікування	після лікування
Стромальний герпетичний кератит	Хворе око, n=17	M±SD	1,16±0,47	1,78±0,7*
		(95%ДІ)	(0,91–1,4)	(0,61–2,9)
	Парне око n=17	M±SD	1,30±0,47	1,34±0,2
		(95%ДІ)	(0,89–1,7)	(0,9–1,74)

Примітка: M – середнє арифметичне; SD – стандартне квадратичне відхилення; 95% ДІ – 95% довірчий інтервал; p* – рівень значущості відмінностей показників <0,05.

Таблиця 2. Частотний розподіл показника чутливості рогівки (бали) в групі хворих на стромальний герпетичний кератит щодо середніх значень концентрації лактоферину в сльозі цієї групи та його міжнародної норми (1,42 мг/мл)

Показники	Око	Лактоферин нижче за 1,21 мг/мл / 1,42 мг/мл			Лактоферин вище за 1,2 мг/мл / 1,41 мг/мл		
		кількість очей			кількість очей		
		0 балів	1–9 балів	10 балів	0 балів	1–9 балів	10 балів
Чутливість рогівки	Хворе око	0/0	7/10	2/2	0/0	7/4	1/1
	Парне око	0/0	1/1	5/6	0/0	2/2	3/2

Таблиця 3. Частотний розподіл кількості очей зі стромальним герпетичним кератитом (СГК) за показником флуоресцеїнового тесту (бали) щодо концентрації лактоферину (ЛФ) у сльозі (середня по групі/світова норма)

Показники	Лактоферин нижче за 1,21мг/мл/1,42 мг/мл		Лактоферин вище за 1,2мг/мл/1,41мг/мл	
	<3,5	>3,5	<3,5	>3,5
Фарбування флуоресцеїном (бали)				
Кількість очей із СГК	9/10	1/1	6/5	1/1

Таблиця 4. Показники основної сльозопродукції (проби Ширмера-II (мм) на хворому оці в пацієнтів на стромальний герпетичний кератит (СГК) щодо нормальних значень лактоферину (ЛФ) у сльозі (Median (Q_{low}-Q_{up}))

Показник	Статистичні показники	Лактоферин				p
		нижче за 1,21 мг/мл	нижче за 1,42 мг/мл	вище за 1,2 мг/мл	вище за 1,41 мг/мл	
		1	2	3	4	
Проба Ширмера-II (мм)	Медіана	7	8	13	16	p ₁₋₃ =0,03 p ₂₋₄ =0,04
	Q _{low} -Q _{up}	(4,5–15)	(6–10)	(11–17)	(12–20)	

Примітка: Q_{low}-Q_{up} – нижній і верхній кватилі; p – рівень значущості відмінностей.

зі спостерігається нижчий рівень сльозопродукції за пробою Ширмера-II ока із СГК.

За результатами мікробіологічного дослідження кон'юнктивальної порожнини зростання мікрофлори було відсутнє на 24 очах. На 8 очах виявлено зростання *Staphylococcus epidermidis*×10³, на 2 очах – *Candida albicans* (табл. 6), що становило 29,4% усіх випадків. Частота випадків зростання мікрофлори не мала від-

мінностей між хворим і парним оком. За відсутності мікрофлори фонові концентрації ЛФ у сльозі були 1,29±0,5 мг/мл, за наявності умовно-патогенної флори концентрація ЛФ була нижчою – 0,92±0,5 мг/мл, що нижче на 28,6%, ніж без мікрофлори (p=0,046). Після проведення комплексного лікування із застосуванням препарату «Лакто» в кон'юнктивальній порожнині

Таблиця 5. Результати мікробіологічного дослідження кон'юнктиви хворих на стромальний герпетичний кератит (СГК)

Око	Зростання немає	Staphylococcus epidermidis	Candida albicans
	n	n	n
Око із СГК	11	4	2
Парне око	13	4	-
Усього	24	8	2

Примітка: n – кількість очей.

мікробіологічні посіви не визначали жодних культур (табл. 5).

Таким чином, визначено особливості концентрації ЛФ у сльозі як маркера певних станів переднього відрізка ока, а також вплив очних крапель ЛАКТО в комплексі терапії рецидивуючого СГК. Варто зазначити, що надалі потрібні додаткові спостереження впливу ЛФ на термін тривалості ремісії та ступінь тяжкості можливого рецидиву СГК.

Обговорення

ЛФ належить до розряду білків – природних протеїнів завдяки своїй багатовекторній активності, серед якої – біоцидна дія та модулювання вірусного інфекційного процесу. Сьогодні відома протигерпетична активність ЛФ, яка основана на зв'язуванні ЛФ із глікозаміногліканами клітинної поверхні – вірусними рецепторами на клітинах-мішенях, що запобігає прикріпленню й проникненню вірусу, зумовлюючи відстрочення інвазії вірусу в клітину. Пероральне введення лактоферину збільшує вироблення цитокінів Th1, включаючи IFN-gamma, IL-12 та IL-18, які можуть посилювати захист хазяїна від інфекції ВПГ [11, 17, 24]. ЛФ виявляє чудові захисні властивості щодо пошкоджень рогівки. У низці робіт показано позитивний вплив ЛФ на епітелій рогівки на моделях опіку й опромінення [25]. Загалом відомості про концентрацію ЛФ у сльозі при очних захворюваннях численні. Ці відомості стосуються в основному хвороби сухого ока (ХСО), діабетичного ураження та є поодинокі роботи про запальні захворювання очей. Зроблено висновки, що низькі концентрації лактоферину можуть відігравати певну роль у складниках запалення поверхні ока, пов'язаних із цими захворюваннями [21, 26]. Проте роботи, присвячені ролі ЛФ у патогенезі СГК, поодинокі. Деякі автори визначили, що концентрація лактоферину в сльозі була однаковою в пацієнтів із ВПГ-кератитом і в здорових, не було впливу різних генотипів лактоферину [9]. Для дослідження ми обрали рецидивуючий не некротизуючий СГК як найбільш розповсюджену форму рецидивуючого ГК, яка призводить до суттєвого зниження зору. Тривалий перебіг СГК в разі неадекватного лікування може призвести

до персистуючої бульозної кератопатії, декомпенсації ендотелію та помутніння рогівки.

Ми визначали концентрацію лактоферину в сльозі хворих і парних очей у пацієнтів із рецидивуючим СГК. У роботі враховували показник середнього значення норми, за даними світового метааналізу [21], і середній показник по нашій вибірці. Варто зазначити відсутність характеристик середньої норми, представленої світовим метааналізом, як стандартне відхилення або довірчий інтервал, що ускладнює його застосування для статистичної обробки. Відсутність контрольної групи в нашому дослідженні пов'язана з тим, що його проводили в період пандемії COVID-19, ми не мали можливості зібрати сльозу здорових індивідумів і порівняти рівень ЛФ у сльозі з хворими на СГК.

У роботі ми визначили зниження середньої концентрації ЛФ на 18% у сльозі ока із СГК порівняно з нормою, представленою світовим метааналізом. У разі частотного розподілу показники концентрації ЛФ частіше нижче за норму зустрічалися на оці із СГК порівняно з парним оком.

Застосування очних крапель, що містять ЛФ, зумовило значне підвищення рівня експресії ЛФ на 53,4% у сльозі ока із СГК, проте мало змінило експресію ЛФ на парному оці. Ми виявили, що по всій групі СГК чутливість рогівки (ЧР) частіше знижена у 12,4 раза, ніж на парному оці. Відношення шансів було OR=12,4 при 95% CI (2,0–76,8), що відображає нейросенсорні порушення хворого ока. Але більш значні порушення ЧР парного ока виявлені за низьких значень експресії ЛФ у сльозі. Таких відомостей про СГК в літературі не знайдено.

У роботі не виявлено змін показника флуоресцеїнового тесту щодо концентрації ЛФ у сльозі, оскільки в дослідження не брали хворих із дефектами епітелію та ерозіями рогівки, а в процесі лікування ускладнень не спостерігали. Але ми зазначили, що в разі зниження концентрації ЛФ у сльозі спостерігається більш низький рівень основної сльозопродукції ока із СГК. Це відповідає даним літератури, де концентрація лактоферину корелює зі значенням тесту Ширмера й часом розриву слізної плівки, має зворотній кореляційний зв'язок із показниками флуоресцеїнового тесту в разі хвороби сухого ока (ХСО) [28].

Досить багато робіт присвячено терапевтичному ефекту ЛФ в разі хвороби сухого ока, але для СГК таких даних у літературі немає. Повідомлялося про його ефективність у поліпшенні параметрів очної поверхні, таких як час розриву СП й тест Ширмера, у пацієнтів із хворобою сухого ока [28, 29]. Після курсу комплексного лікування із застосуванням очних крапель «Лакто» ми виявили тенденцію до покращення показників основної сльозопродукції на оці із СГК, що обґрунтовує доцільність вивчення більш тривалого місцевого застосування препаратів, що містять ЛФ.

У клінічній практиці офтальмолога часто зустрічається поєднана інфекція, коли вірусне ураження

переднього відрізка ока супроводжується бактеріальною або грибковою флорою, що ускладнює процес лікування. Під час мікробіологічних досліджень очей із СГК ми виявили супутню умовно-патогенну та грибкову флору в 35,2% випадків. За наявності умовно-патогенної флори концентрація ЛФ у сльозі була нижчою на 28,6%, ніж на очах без цієї флори. Застосування крапель «Лакто» в комплексному лікуванні дало змогу повністю санувати кон'юнктивальний мішок від цієї мікрофлори. Відомо, що ЛФ пригнічують зростання бактерій та утворення біоплівки незалежно від адгезії бактерій до клітин і проникнення в них, підвищують активність різних антимікробних препаратів щодо зважених бактеріальних культур, у тому числі *Staphylococcus epidermidis* [30]. ЛФ пригнічує зростання бактерій у кон'юнктивальному мішку й запобігає утворенню скупчень ВПГ-1 [10]. У попередній роботі ми вказували власні дані позитивного ефекту крапель із ЛФ при хронічному бактеріальному кон'юнктивіті [31].

Таким чином, ми визначили середні показники ЛФ у сльозі при СГК як на хворому, так і парному очах, установили певні взаємозв'язки функціональних показників поверхні як хворого, так і парного очей при СГК залежно від рівня експресії ЛФ у сльозі. Відзначили позитивний вплив крапель, що містять лактоферин, у комплексному протизапальному та противірусному лікуванні СГК.

Висновки

1. Встановлено, що середній рівень концентрації лактоферину в сльозі хворих на рецидивуючий СГК дорівнював $1,21 \pm 0,52$ мг/мл без суттєвих розбіжностей показника для хворого й парного очей, при цьому номінальний показник концентрації ЛФ нижче за норму зустрічався частіше на хворому оці порівняно з парним оком ($\chi^2=4,24$, $p=0,04$).

2. Виявлено, що чутливість рогівки (ЧР) знижена на оці із СГК у 12,4 раза частіше, ніж на парному оці (відношення шансів $OR=12,4$ при 95% ДІ (2,0–76,8)), що відображає нейросенсорні порушення хворого ока й пов'язане з нижчою за норму концентрацією ЛФ у сльозі хворого на СГК ока.

3. Відмічено, що вища за норму концентрація ЛФ у сльозі супроводжується вищими показниками рівня основної сльозопродукції й навпаки (13–16 мм і 7–8 мм відповідно): встановлено прямий кореляційний зв'язок $r=0,45$ ($p<0,05$).

4. Застосування крапель із лактоферином підвищує його концентрацію в сльозі хворого на СГК ока на 47% до $1,78 \pm 0,7$ мг/мл і призводить до сануючого ефекту в кон'юнктивальній порожнині у хворих із рецидивуючим СГК за наявності супутньої мікрофлори, що підтверджується відсутністю зростання культур після курсу комплексного протизапального лікування.

Література

1. Harmhorn K, Dana R, Chodosh S. Delayed type of hypersensitivity in the pathogenesis of recurrent herpes simplex keratitis. *Semioptalmol.* 2011;16(4-5): 246-250.
2. Dujaili LJ, Clerkin PP, Clement C, McFerrin HE, Bhat-tacharjee PS, et al. Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated. *Future Microbiology.* 2011;6(8):877–907. doi: 10.2217/fmb.11.73
3. Wilhelmus KR. Diagnosis and management of herpes simplex stromal keratitis. *Cornea.* 1987; 6(4):286-91
4. Jenssen H, Sandvik K, Andersen JH, Hancock RE, Gutte-berg TJ. Inhibition of HSV cell-to-cell spread by lactoferrin and lactoferricin. *Antiviral Res.* 2008 Sep;79(3):192-8.
5. van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* 2001 Dec;52(3):225-39.
6. Singh J, Sharma M, Jain N, Aftab I, Vikram Net al. Lactoferrin and its nano-formulations in rare eye diseases. *Indian J Ophthalmol.* 2022 Jul;70(7):2328-2334.
7. Wakabayashi H, Oda H, Yamauchi K, Abe F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. *J Infect Chemother.* 2014 Nov;20(11):666-71.
8. Flanagan JL, Willcox MD. Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie.* 2009 Jan;91(1):35-43.
9. Keijser S, Jager MJ, Dogterom-Ballering HC, Schoonderwoerd DT, de Keizer RJ, et al. Lactoferrin Glu561Asp polymorphism is associated with susceptibility to herpes simplex keratitis. *Exp Eye Res.* 2008 Jan;86(1):105-9.
10. Fujihara T, Hayashi K. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection to mouse cornea. *Arch Virol.* 1995;140(8):1469-72.
11. Marr AK, Jenssen H, Moniri MR, Hancock RE, Panté N. Bovine lactoferrin and lactoferricin interfere with intracellular trafficking of Herpes simplex virus-1. *Biochimie.* 2009 Jan;91(1):160-4.
12. Zinser E, Krawczyk A, Mühl-Zürbes P, Aufderhorst U, Draßner C, et al. A new promising candidate to overcome drug resistant herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* 2018 Jan;149:202-210.
13. Vagge A, Senni C, Bernabei F, Pellegrini M, Scoria V, et al. Therapeutic Effects of Lactoferrin in Ocular Diseases: From Dry Eye Disease to Infections. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 12;21(18):6668. doi: 10.3390/ijms21186668.
14. Pastori V, Tavazzi S, Lecchi M. Lactoferrin-loaded contactlenses: eye protection against oxidative stress. *Cornea.* 2015 Jun;34(6):693-7.
15. Wakabayashi H, Kurokawa M, Shin K, Teraguchi S, Tamura Y, et al. Oral lactoferrin prevents body weight loss and increases cytokine responses during herpes simplex virus type 1 infection of mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004 Mar;68(3):537-44.
16. Krzyzowska M, Chodkowski M, Janicka M, Dmowska D, Tomaszewska E, Radoszek-Soliwoda K, et al. Lactoferrin-Functionalized Noble Metal Nanoparticles as New Antivirals for HSV-2 Infection. *Microorganisms.* 2022 Jan 5;10(1):110.
17. Singh J, Sharma M, Jain N, Aftab I, Vikram N, Singh TP, et al. Lactoferrin and its nano-formulations in rare eye diseases. *Indian J Ophthalmol.* 2022 Jul;70(7):2328-2334.

18. Marques de Carvalho C.A., Matos A.D.R., Caetano. B.C., Pedro de Sousa Junior I., Pereira da Costa Campos S., et al. In vitro inhibition of SARS-CoV-2 infection by bovine lactoferrin. *BioRxiv*. 2020
19. Alpogan O., Karakucuk S. Lactoferrin: The Natural Protector of the Eye against Coronavirus-19. *OculImmunolInflamm*. 2021 May 19;29(4):751-752.
20. Versura P., Bavelloni A., Grillini M., Fresina M., Campos EC. Diagnostic performance of a tear protein panel in early dry eye. *Mol Vis*. 2013 Jun 6;19:1247-57.
21. Ponzini E., Scotti L., Grandori R., Tavazzi S., Zamboni A. Lactoferrin Concentration in Human Tears and Ocular Diseases: A Meta-Analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020 Oct 1;61(12):9.
22. McDermott A. M. Antimicrobial compounds in tears. *ExpEyeRes*. 2013;117:53-61.
23. Weinberg E. D. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. *J. Pharm. Pharmacol*. 2001; 53: 1303-1310.
24. Välimaa H., Tenovuo J., Waris M., Hukkanen V. Human lactoferrin but not lysozyme neutralizes HSV-1 and inhibits HSV-1 replication and cell-to-cell spread. *Virology*. 2009 May 12;6:53.
25. Fujihara T., Nagano T., Endo K., Nakamura M., Nakata K. Lactoferrin protects against UV-B irradiation-induced corneal epithelial damage in rats. *Cornea*. 2000 Mar;19(2):207-11.
26. Kiratli H., Irkeç M., Orhan M. Tear lactoferrin levels in chronic meibomitis associated with acne rosacea. *Eur J Ophthalmol*. 2000 Jan-Mar;10(1):11-4.
27. Keijser S., Jager MJ., Dogterom-Ballering HC., Schoonderwoerd DT., de Keizer RJ., Kroese CJ, et al. Lactoferrin Glu-561Asp polymorphism is associated with susceptibility to herpes simplex keratitis. *Exp Eye Res*. 2008 Jan;86(1):105-9.
28. Sonobe H., Ogawa Y., Yamada K., Shimizu E., Uchino Y., Kamoi M, et al. A novel and innovative paper-based analytical device for assessing tear lactoferrin of dry eye patients. *OculSurf*. 2019 Jan;17(1):160-166.
29. Devendra J., Singh S. Effect of Oral Lactoferrin on Cataract Surgery Induced Dry Eye: A Randomised Controlled Trial. *J. Clin. Diagn. Res*. 2015;9:NC06-NC09.
30. Leitch EC., Willcox MD. Lactoferrin increases the susceptibility of *S. epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. *CurrEyeRes*. 1999 Jul;19(1):12-9.
31. Дрожжина Г.І., Рязанова Л.Ю., Храменко Н.І. Величко Л.М. Рівень лактоферину в сльозі хворих на хронічний кон'юнктивит та вплив очних крапель «Лакто» в комплексному лікуванні цієї патології. *Офтальм. журн*. 2023; 1: 39-46.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Автор листування: Дрожжина Галина Іванівна – serp2002@ukr.net

Внесок кожного автора в роботу: Дрожжина Г.І. – розроблення концепції статті, написання статті, редагування; Храменко Н.І. – статистична обробка результатів, написання статті; Рязанова Л.Ю. – забір сльозної рідини у хворих на герпетичний кератит; Середа К.В. – клінічне обстеження хворих на рецидивуючий герпетичний стромальний кератит; Величко Л.М. – визначення рівня лактоферину в сльозі і трактування результатів. 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: за підтримки компанії NOVAX® PHARMA (НОВАКС® ФАРМА) (закупівля реактивів для дослідження).

Учасники дослідження: дослідження проводили за участі людей, схвалено місцевим комітетом з біоетики. У всіх пацієнтів, які брали участь у дослідженні, отримано форми інформованої згоди. Дослідження проведено згідно з Гельсінською декларацією.

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: ЛФ – лактоферин; ГК – герпетичний кератит; SGK – стромальний герпетичний кератит; ВПГ – вірус простого герпесу; ВІЛ – вірус імунodefіциту; ДІ – довірчий інтервал; OR – відношення шансів; ЧР – чутливість розгівки.

Надійшла 05.09.2023