



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Боривоје Милан Савић

**УЛОГА ФОЛНЕ КИСЕЛИНЕ, ВИТАМИНА В12 И ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАЦИЈЕ  
*IL28B* ГЕНА У НАСТАНКУ РЕКУРЕТНОГ ХЕРПЕТИЧКОГ КЕРАТИТИСА**

Докторска дисертација

Коментори: др сци. мед. Нела Ђоновић, редовни професор

др Оливере Милошевић-Ђорђевић, редовни професор

Крагујевац, 2020. година

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>
Име и презиме: Савић Боривоје
Датум и место рођења: 06.05.1980. Кикинда
Садашње запослење: Клинички Центар Србије, Клиника за очне болести, Београд
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Улога фолне киселине, витамина В12 и генетичке варијације <i>IL28B</i> гена у настанку рекурентног херпетичног кератитиса
Број страница: 92
Број слика: 15 слика, 6 табела, 2 графикана
Број библиографских података: 127
Установа и место где је рад израђен: Клиника за очне болести Клиничког Центра Србије Београд, Научни Институт за ветеринарство Србије, Београд
Научна област (УДК): Медицина, Генетика
Коментори: др сци. мед. Неле Ђоновић, редовни професор, др Оливере Милошевић-Ђорђевић, редовни професор
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: <b>08.05.2019</b>
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: <b>IV-03-716/22 од 16.09.2019. године</b>
<b>Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:</b> <ol style="list-style-type: none"><li><b>1. Проф. др Сунчица Срећковић</b>, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, председник</li><li><b>2. Доц. др Татјана Шаренац-Вуловић</b>, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, члан</li><li><b>3. Проф. др Јевросима Стевановић</b>, ванредни професор Факултета ветеринарских наука Универзитета у Београду за ужу научну област Биологија-генетика, члан</li></ol>
<b>Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:</b> <ol style="list-style-type: none"><li><b>4. Проф. др Сунчица Срећковић</b>, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, председник</li><li><b>5. Доц. др Татјана Шаренац-Вуловић</b>, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, члан</li><li><b>6. Проф. др Јевросима Стевановић</b>, ванредни професор Факултета ветеринарских наука Универзитета у Београду за ужу научну област Биологија-генетика, члан</li></ol>
Датум одбране дисертације:

## Сажетак

**Увод.** У готово 90% одрасле популације присутна су антитела према типу 1 *Herpes simplex* (HSV-1) вируса. Интерферони типа III (IFN- $\lambda$ ) имају веома значајну антивирусну и антиинфламацијску активност, што је од посебног значаја код рекурентног херпетичног кератитиса. Епигенетска природа реактивације HSV-1, између осталог, може зависити од присуства и концентрација доказаних епигентских модулатора као што су витамин B12 и фолна киселина, који су укључени у процес метилације молекула ДНК.

**Циљеви.** Циљ студије је да се истражи могућа повезаност између *IL28B* генотипа домаћина и предиспозиције за рекурентни стромални херпетични кератитис. Такође, циљ овог истраживања је и анализа могуће повезаности између концентрација витамина B12 и фолне киселине у крви са развојем рекурентног херпетичног кератитиса.

**Методe.** Испитивање је спроведено на узорку од осамдесет пацијената старијих од 18 година, оба пола, који су у анамнези имали појаву рекурентног *herpesvirus hominis labialis* (HSL). Сви испитаници су тестирани на присуство IgG антитела специфичних за HSV-1, како би се код серопозитивних појединаца типизирао ген *IL28B* (rs12979860snp). Седамдесет и пет серопозитивних испитаника укључено је у студију. Двадесет и четири пацијената имала су рекурентни херпетични кератитис са последичним ожиљавањем рожњаче и значајним смањењем видне оштрине. Укупна ДНК изолована је из узорака крви испитаника. Испитаницима са рецидивирајућим херпетичним кератитисом, додатно је узето 2ml периферне венске крви за одређивање нивоа фолне киселине и витамина B12 у акутној фази рецидива херпетичне болести ока.

**Резултати.** У нашем истраживању показана је статистички значајна повезаност између појаве рекурентног HSV кератитиса и два једнонуклеотидна полиморфизма (SNP) за генотип *IL28B* (CCrs12979860 и CTrs12979860,  $p < 0.05$ ). Такође, према резултатима наше студије, сви пацијенти су имали ниже вредности витамина B12 и фолне киселине у серуму у акутној фази рецидивирајућег херпетичног кератитиса.

**Закључак.** Резултати наше студије показују да се клиничка манифестација рекурентне HSV-1 инфекције може повезати са полиморфизмом *IL28B* гена. Реактивација вируса HSV-1 може бити повезана са минималним недостатком витамина B12 и фолне киселине током латентне фазе болести, због епигенетске природе HSV-1 вируса.

**Кључне речи:** генске варијације *IL28B*, рекурентни херпетични кератитис, епигенетика, витамин B12 и фолна киселина.

## Abstract

**Introduction.** Herpes simplex (HSV-1) type 1 antibodies are present in almost 90% of the adult population. Type III interferons (IFN- $\lambda$ ) have very significant antiviral and anti-inflammatory activity, which is of particular importance in recurrent herpetic keratitis. The epigenetic nature of HSV-1 reactivation may depend, among other things, on the presence and concentrations of proven epigenetic modulators such as vitamin B12 and folic acid involved in the DNA methylation process.

**Objectives.** The aim of this study is to investigate the possible association between *IL28B* host genotype and the predisposition to recurrent stromal herpetic keratitis. Also, the aim of the study is to find out the possible relationship between vitamin B12 and folic acid concentrations in blood and recurrent herpetic keratitis.

**Methods.** The study was conducted on a sample of eighty patients over 18 years of age, of both genders with a history of recurrent *herpesvirus hominis labialis* (HSL). All subjects were tested for the presence of HSV-1-specific IgG in order to typify *IL28B* genes (rs12979860snp) in seropositives. Seventy-five of these patients were found to be seropositive for HSV-1 and were subsequently enrolled in the study. Twenty-four of the enrolled patients also had a history of recurrent herpetic keratitis (HSK) associated with severe corneal scarring and visual acuity deterioration. Total DNA was isolated using blood samples. Two milliliters of peripheral venous blood were additionally collected from subjects with recurrent herpetic keratitis, in the acute phase of the disease, in order to determine folic acid and vitamin B12 levels.

**The results.** A significant association was observed between recurrent HSK and two single-nucleotide polymorphisms (SNP) of the *IL28B* genotype (CCrs12979860 and CTrs12979860,  $p < 0.05$ ). Our results show that all patients in the acute phase of the recurrent herpetic keratitis had lower B12 and folic acid sera levels.

**Conclusion.** The results from our study indicate that the clinical manifestation of recurrent HSV-1 infection may be related to *IL28B* gene polymorphism. HSV-1 virus reactivation may be associated with minimal vitamin B12 and folic acid deficiency during the latent phase of the disease, due to the epigenetic nature of the HSV-1 virus.

**Keywords:** *IL28B* gene variations, recurrent herpetic keratitis, epigenetics, vitamin B12 and folic acid.

## Захвалница

Велика захвалност менторки проф. др Нели Ђоновић на помоћи и разумевању током целог процеса израде и писања докторске дисертације.

Велика захвалност менторки проф. др Оливери Милошевић Ђорђевић на свим идејама и корисним саветима, предлозима и подршци током израде докторске дисертације.

Захваљујем се изузетној професорки Јевросими Стевановић на неизмерној помоћи.

Велику захвалност дугујем професорици др Сунчици Срећковић и доценткињи др Татјани Шаренац-Вуловић.

Посебна захвалност професору Миленку Стојковићу који је имао слуха и вере у мене да ми омогући долазак у Клинику за очне болести Клиничког центра Србије.

Овај рад је настао уз највећу помоћ моје колегинице, врхунског офталмолога научног радника и моје поштоване пријатељице доценткиње др Светлане Станојловић, која је учествовала у свим детаљима писања моје докторске дисертације.

**ВЕЛИКО ХВАЛА!**

Рад посвећујем Марти, Тари и Јовани.

## САДРЖАЈ:

1. УВОД.....	10
1.1. Анатомија и функција рожњаче.....	10
1.2. Општи патолошки процеси у рожњачи.....	12
1.3. Херпетични кератитис.....	14
1.3.1. Патогенеза херпетичног кератитиса.....	14
1.3.2. Имуно-патологија херпетичног кератитиса.....	16
1.3.3. Улога <i>Th1</i> , <i>Th17</i> , и <i>CD8 T</i> -ћелија у настанку херпетичних кератитис лезија.....	18
1.3.4. Облици херпетичног кератитиса.....	21
1.3.5. Епидемиолошке карактеристике херпетичног кератитиса.....	24
1.4. Херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1).....	25
1.5. Механизми реактивације HSV-1 вируса.....	27
1.5.1. Вирусни утицај на имунски систем домаћина.....	28
1.5.2. Спољни фактори који су укључени у реактивацију HSV-1 вируса.....	29
1.5.3. Епигенетска регулација реактивације HSV-1 вируса.....	32
1.5.4. Фолна киселина.....	33
1.5.5. Витамин B12.....	34
1.6. Интерлеукин <i>IL28B</i> .....	35
1.6.1. Структура гена који кодира интерлеукин <i>IL28B</i> .....	38



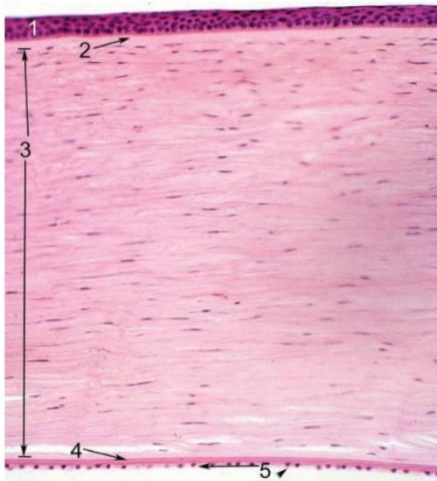
2. Циљеви, хипотезе и значај истраживања.....	40
2.1. Циљеви истраживања.....	40
2.2. Хипотезе истраживања.....	40
2.3. Значај истраживачког питања.....	41
3. Материјал и методе.....	42
3.1. Врста студије.....	42
3.2. Популација која се истражује.....	42
3.2.1. Величина узорка.....	44
3.3. Узорковање и методе анализе.....	44
3.3.1. Имушке анализе.....	44
3.3.2. Ниво фолне киселине и витамина В12.....	45
3.3.3. Генотипизација IL28B.....	45
3.4. Статистичка обрада података.....	47
4. Резултати.....	48
4.1. Одређивање IL28B rs12979860 генотипова и њихова дистрибуција.....	50
4.2. Фолна киселина, витамин В12 и број рецидива.....	55
5. Дискусија.....	59
6. Закључци.....	68
7. Попис ознака и скраћеница.....	69
8. Списак слика, табела и графикона.....	71
9. ЛИТЕРАТУРА.....	73

## 1. УВОД

### 1.1. Анатомија и функција рожњаче

Рожњача се налази у склопу предњег закривљеног дела спољашњег омотача ока. Представља први оптички медијум на који светлосни зраци падају приликом продора у дубље сегменте ока. Најважнија карактеристика рожњаче је провидност, а да би обављала своју функцију у потпуности мора бити глатка, сјајна и влажна (1). Рожњача је грађена од пет слојева, ако кренемо споља према унутра слојеви су:

1. Епител
2. Боуманова мембрана
3. Строма
4. Десцеметова мембрана
5. Ендотел (Слика 1)



**Слика 1.** Хистолошки пресек рожњаче

(извор, <http://www.missionforvisionusa.org/anatomy/2005/10/cornea-histology.html>)

Према подацима Светске здравствене организације (СЗО), процењује се да је око 289 милиона људи слепо и слабовидо (1,3). Поред катаракте која је водећи узрок слабовидости у свету, међу водећим глобалним узрочницима слабовидости су и болести рожњаче (1). Ткиво рожњаче је специфично по томе што је имунски привилеговано, нема крвних и лимфних судова (4). Епител рожњаче је дебљине око 50  $\mu\text{m}$  и састоји се од базалних ћелија које су цилиндрично постављене на танку базалну мембрану. Изнад њих су у слојевима постављене кубичасте ћелије, а на самој површини су плочасте ћелије без орожавања. Епител се обнавља од лимбуса (рубни део рожњаче где су матичне ћелије) према центру рожњаче, односно од базалног слоја према апикалном. Епител рожњаче је прожет мноштвом нервних завршетака, а могу се наћи и хистоцити, лимфоцити, меланоцити и антиген презентујуће Лангерхансове ћелије (5).

Боуманова мембрана је чврст ацелуларни слој који штити строму рожњаче. Састављен је од неправилно распоређених колагених влакана дебљине око 10 микрона. Боуманова мембрана нема способност регенерације (1).

Строма рожњаче чини највећи део рожњаче (око 90%) и састављена је од колагена (6, 7). Колаген је постављен у виду ламела, а између ламела су кератоцити, амијелинска нервна влакна и пукотине попуњене водом. У слојевима строме радијално са свих страна се гранају нервни завршетци, због тога је рожњача најосетљивији део површине тела (1). Та остевљивост омогућава заштиту од повреда, јер минимална провокација узрокује јак бол (8).

Десцеметова мембрана је хомогена базална мембрана, доста је тања од предње Боуманове мембране, а на крајевима саме рожњаче она прелази у сам почетак цилијарног мишића (8, 9).

Ендотел се у основи састоји од једног слоја пљоснатих шестоугаоних ћелија. Те ћелије се након рођења не деле и кроз цео живот се њихов број постепено смањује. Сваки губитак ендотелних ћелија се надокнађује увећањем преосталих ћелија (8).

Старењем долази до изражаја полимегатизам и плеоморфизам ендотелних ћелија. Улога ендотелних ћелија је важна јер онемогућава улазак воде у рожњачу због чега она задржава провидност током живота. Свако оштећење ендотела рожњаче доводи до едема рожњаче и могућег трајног замућења вида (8).

Рожњача се храни дифузијом из перикорнеалне артеријске мреже, јер нема крвних судова. Због различитих упалних процеса може доћи до урастања крвних судова који окружују рожњачу и њиховог продирања у дубље сегменте рожњаче што се назива *panus* (8).

## 1.2. Општи патолошки процеси у рожњачи

Низ патолошких процеса може пореметити структуру једног од укупно пет слојева рожњаче и довести до поремећаја функције рожњаче.

Рожњача може да буде замућена из следећих разлога:

### 1. Едем рожњаче

Едем рожњаче може бити стромални или епителни. Најчешће настаје услед декомпензације ендотелне пумпе. Стромални едем карактерише празан простор између стромалних ламела, а смањење провидности рожњаче настаје због поремећеног положаја ламела у строми. Епителни едем карактерише појава епителне буле. Најчешћи узроци оштећења ендотела су: херпетични дисциформни кератитис (*endotelitis*), Фукова ендотелна дистрофија (*Dystrophia endothelialis Fuchs*) и повреда ендотела рожњаче услед интраокуларних операција (1).

### 2. Ожиљак

Ожиљак и васкуларизација део су нормалног процеса зарастања у везивном ткиву. У већини ткива ти процеси имају корисну улогу, међутим ожиљавање рожњаче има за последицу сметње видне оштрине. Дели се на небукулозно, макулозно и леукоматозно

замућење. *Nubecula* је блед, једва видљив ожиљак. *Macula* је јасно ограничено замућење које је делимично провидно. *Leucota* је потпуно непровидан ожиљак на рожњачи (1, 10).

Појава крвних судова у рожњачи увек је знак патолошког процеса. Стромална васкуларизација се појављује у разним патолошким поремећајима у рожњачи. Локализоване површинске васкуларизације обично су удружене са специфичним лезијама рожњаче, док дубоке васкуларизације потичу од предњих цилијарних крвних судова и последице су хроничних инфламација (1, 10).

### 3. Запаљенски инфилтрат (инфективни и неинфективни)

Стромални инфилтрати састоје се од леукоцита и знак су активне упале. Упала и имунска реакција резултат су различитих повреда инфекција и системских болести везивног ткива, које могу довести до реверзибилних или ирреверзибилних промена на рожњачи (1).

### 4. Депозити

Постоје различити материјали који се могу таложити у рожњачи, а могу да буду ендогеног или егзогеног порекла. Депозити ендогеног порекла су резултат вишка материјала створеног током метаболичких болести (нпр. Вилсонова болест и депозити бакра у Десцеметовој мембрани), или током дистрофије и дегенерације рожњаче (нпр. вишак гликозаминогликана у строми и ендотелу у макуларној дистрофији) (1).

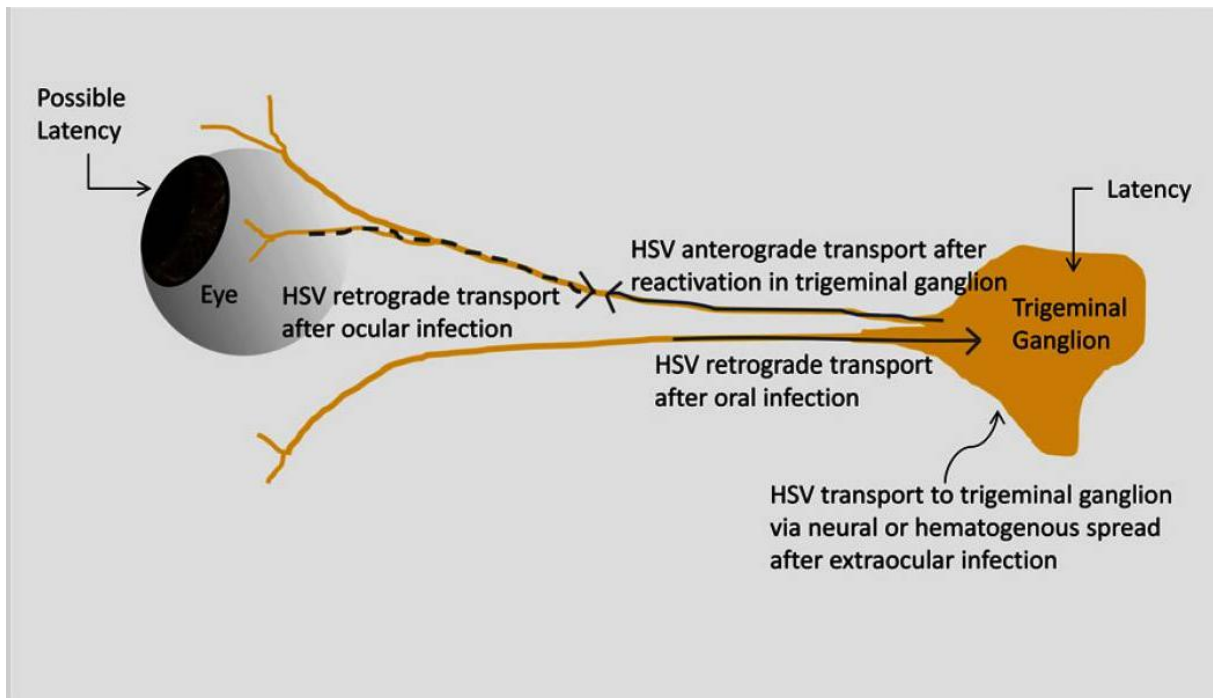
Депозити егзогеног порекла су у највећој мери резултат таложења лекова, и то више од 50 врста лекова (1).

### **1.3. Херпетични кератитис**

#### ***1.3.1. Патогенеза херпетичног кератитиса***

Главни пут ширења HSV-1 вируса је директним контактом, јер вирус улази у домаћина кроз слузницу. Очна инфекција се може појавити као примарна инфекција или као рецидивирајућа (1).

Након примарне инфекције вирус путује ретроградним аксонским транспортом дуж нерава до тригеминалног ганглиона, где остаје у латентој фази док се поново не активира (Слика 2). Кретање HSV-1 вируса дуж офталмичке гране петог кранијалног живца из фазе латенције у тригеминалном ганглиону и његова активација представљају процес који је условљен многим симбиотичким факторима, као што су фактори средине, природе вируса и особине домаћина (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).



**Слика 2.** Шема транспорта HSV-1 вируса из латентне фазе у рецидив (*извор, Farooq AV. and Shukla D. 2012*).

Латентна фаза HSV-1 вируса у рожњачи домаћина је контроверзна тема, пре свега, због неразумевања начина одржавања исте (22).

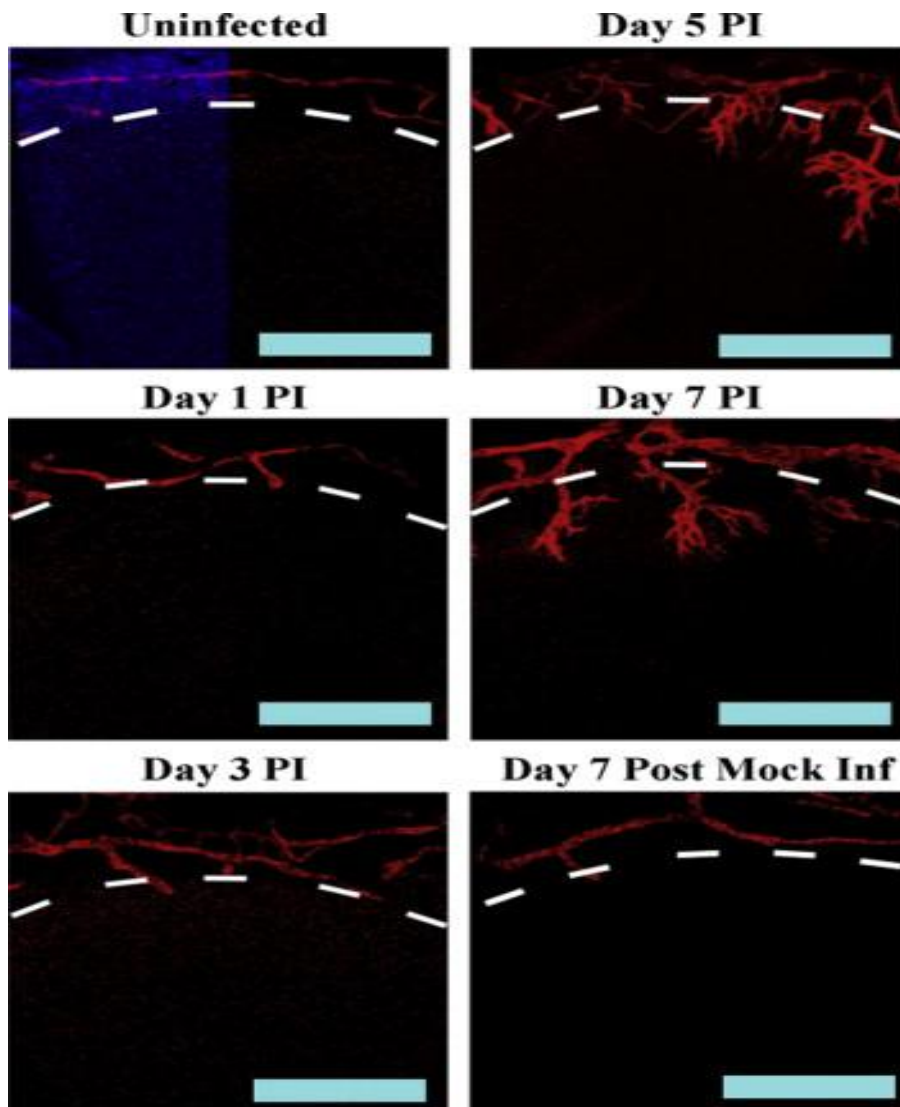
Неколико студија даје доказе за латенцију вируса у самој рожњачи, као и доказе о могућностима дугорочне вирусне активности у ткиву рожњаче (23, 24, 25, 26, 27, 28).

HSV-1 вирус се током трансплантације рожњаче може пренети са донора на примаоца без јасне клиничке слике кератитиса код самог донора. Квантитативну ланчану реакцију полимеразе PCR је важно урадити након експлантације ткива рожњаче код свих донора, а посебно код донора код којих се посумња на херпетични кератитис (23, 24, 25).

***1.3.2. Имуно-патологија херпетичног кератитиса***

Тренутно разумевање имуно-патологије херпетичног кератитиса код људи потиче из студија које су рађене на животињама (29, 30). HSV-1 инфекција рожњаче код мишева је најчешће коришћени животињски модел за проучавање херпетичног кератитиса код људи, јер нуди неколико предности. Саме упалне лезије у строми рожњаче опонашају херпесне лезије опажене код људи и имунска реакција је слична имунској реакцији код људи (32) (слика 3).





**Слика 3.** HSV-1 инфекција рожњаче код мишева - Код неинфициране мишје рожњаче лимфни судови се налазе у лимбусу, не улазе у рожњачу миша, ивица лимбуса је означена испрекиданом линијом. Након инфекције HSV-1 вирусом, после 7 дана лимфни судови улазе у ткиво рожњаче миша (*извор, Park PJ, et al. 2015*).

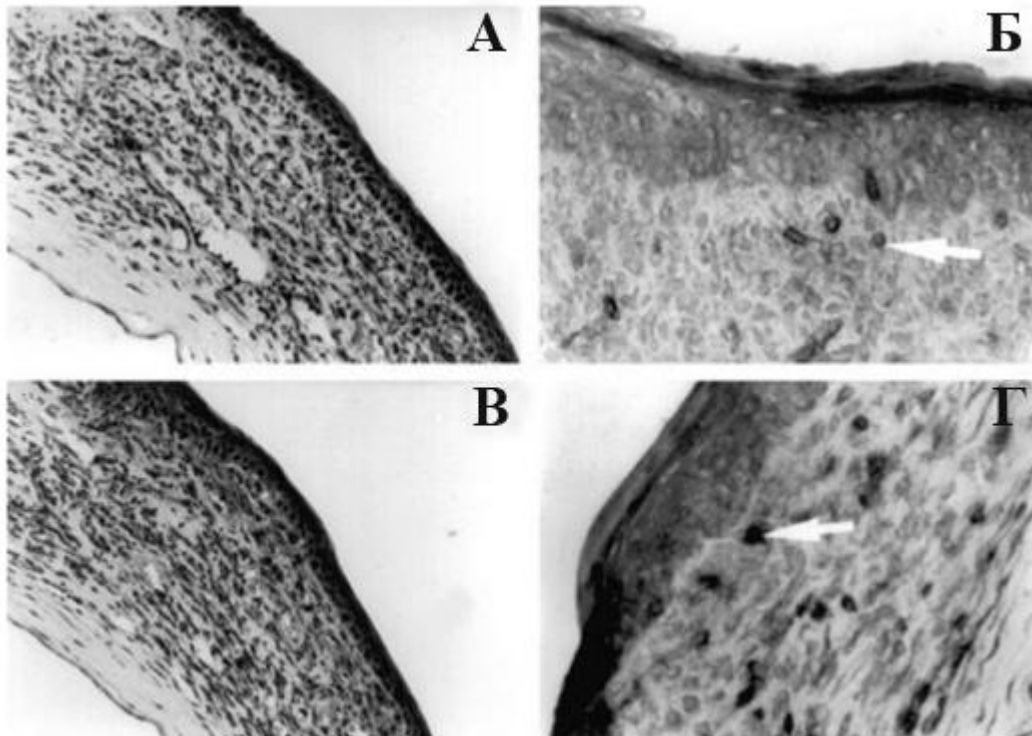
Велико ограничење коришћења мишева у експерименту настаје због тога што се углавном ради о примарној инфекцији, али не и рекурентној болести, што је у већини случајева код људи. Ако се посматра имуни одговор на HSV-1 окуларну инфекцију он укључује две фазе, урођене и адаптивне компоненте имуног система (33). Током претклиничке или акутне фазе, први талас имуних ћелија који се углавном састоји од неутрофила и макрофага помажу у уклањању вируса који се реплицира (28).

У самој клиничкој или хроничној фази болести, CD4 Т-ћелије почињу да се појављују у рожњачи након 6 до 7 дана и то је период у којем оне углавном успевају да елиминишу вирус (33). Уочава се да су CD4 Т-ћелије примарни носиоци херпетичне лезије, јер олакшавају прилив другог таласа неутрофила (34). Масивна ћелијска инфилтрација, посебно неутрофила, представља најважнији механизам који је одговоран за отицање и уништавање ткива рожњаче (35, 36).

### *1.3.3. Улога Th1, Th17, и CD8 Т-ћелија у настанку херпетичних кератитис лезија*

Примарни разлог за настанак херпетичне лезије је имунопатолошки одговор за који су одговорне Т-ћелије (Слика 4) (32). Ово гледиште је утемељено на налазима који показују да су мишеви који имају мање Т-ћелија и мање осетљиви на HSV-1 изазвану болест рожњаче. Током вирусне инфекције и код људи и код мишева преовладавају CD4 Т-ћелије у очним ткивима, и њихова функционална активност често је повезана са оштећењем ткива у рожњачи (37).

CD4 Т-ћелије код мишева се појављују у рожњачама око шест дана после окуларне HSV-1 инфекције и њихов број наставља да се повећава током последње фазе развоја болести. Th1 као помоћне ћелије имуног система експримирају фактор транскрипције T-bet и производе различите имуномодулаторе који играју улогу у експресији херпетичне лезије. Th1 ћелије излучују цитокине IFN- $\gamma$  и IL-2 који могу изазвати упалу и васкуларизацију рожњаче (37, 38).



**Слика 4.** Хистопатолошки пресек рожњаче зараженог миша - Стрелицом је означена пролиферација CD4 Т-ћелија у ткиво рожњаче након инфекције HSV-1 вирусом (*извор, Gangappa S. et al. 2015*).

Поред тога, ови цитокини такође модулирају хемокинске факторе и тако олакшавају масиван прилив неутрофила и макрофага у рожњачу током последње фазе развоја херпетичне лезије (40, 41). Друга група CD4 Т-ћелија која је недавно добила значајну улогу у развоју херпетичне лезије су Th17 ћелије (42). Ове ћелије експримирају фактор транскрипције ROR- $\gamma$  и производе цитокине попут IL-17, IL-21, и IL-22. Th17 ћелије се накупљају у рожњачи инфицираној HSV-1 вирусом током касније фазе патогенезе и помажу у одржавању и проширењу херпетичног кератитиса (43, 44).

Очна инфекција HSV-1 вирусом код мишева где је извршена неутрализација IL-17 коришћењем моноклонских антитела довела је до смањења напредовања болести и озбиљности херпетичних лезија (43). Подаци из ових студија сугеришу да IL-17 снажно индукује производњу кључних упалних медијатора као што су IL-6 и IL-8 у фибробластима рожњаче код људи. Може се рећи да ћелије Th17 производњом IL-17 модулирају ниво хемотактичких фактора попут CXCL-1 и IL-8 и утичу на миграцију неутрофила у упаљено ткиво рожњаче (43).

Иако се CD4 Т-ћелије сматрају главним покретачима херпетичне лезије, подаци представљени на неким експерименталним моделима имплицирају да и CD8 Т-ћелије имају важну улогу у патогенези херпетичне лезије. Исход у великој мери зависи од соја вируса који је коришћен у истраживањима. Неке студије су откриле да окуларна инфекција мишева HSV-1 вирусом RE сојем углавном индукује лезију посредовану CD4 Т-ћелијама, док инфекција мишева са HSV-1 KOS сојем индукује лезију посредовану од CD8 Т-ћелијама (45).

Код мишева заражених рекомбинантним HSV-1-gK сојем лезија је индукована углавном од стране CD8 Т-ћелија (46, 47). Рекомбинантни HSV-1-gK сој коришћен у овим истраживањима садржи три копије гликопротеина (протеина неопходног за репликацију вируса) у поређењу са једном копијом у дивљем типу HSV-1 McKrae соја (46).

Откривено је да HSV-1 мутирани сојеви којима недостају форме гликопротеина нису успеле да уђу у фазу латенције у неуронима у мишијим моделима, што сугерише да је гликопротеинска вирусна експресија кључна за репликацију вируса (48). Одговарајуће подгрупе CD4 Т и CD8 Т-ћелија играју улогу у патогенези херпетичне лезије, а остаје нејасно које су од њих примарно доминатне. Поједине студије показују да CD8 Т-ћелије углавном имају више заштитну улогу у смислу реактивације самог вируса на моделима животиња (49).

#### ***1.3.4. Облици херпетичног кератитиса***

Инфекција HSV-1 вирусом је честа. Готово 90% популације је серопозитивно на HSV-1 антитела (50,51,52). Због различитих клиничких и имунских презентација самог вируса, HSV инфекцију можемо лакше поделити у два типа:

- HSV-1 инфекција која се развија изнад струка (већином делови лица, очи и усне) и
- HSV-2 инфекција која се развија испод струка (генитални херпес).

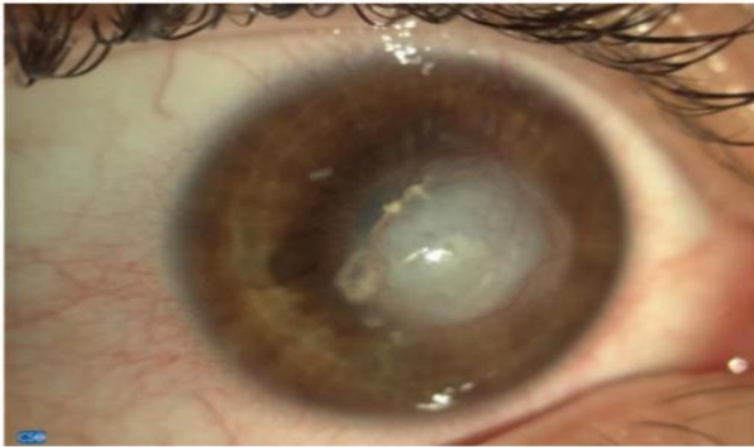
HSV-2 инфекција се ретко може јавити на оку и у већини случајева се ради о неонаталном конјунктивитису (53).

##### **1. Примарна HSV инфекција**

У већини случајева до примарне инфекције долази још у раном детињству капљичним путем у виду неспецифичног афтозног стоматитиса. Ретко се примарна херпетична инфекција испољава на оку у виду херпетичног блефароконјунктивитиса (1).

##### **2. Рекуретна HSV инфекција**

Рекуретна HSV инфекција представља најчешћи облик испољавања HSV инфекције на оку (1) (Слика 5). Клинички се манифестује као епителни кератитис, стромални херпетични кератитис и ендотелитис (дисциформни кератитис) (1).



**Слика 5.** Рекурентни херпетични кератитис са васкуларизованим променама на рожњачи (извор, *Jeffrey D, et al. 2012*).

#### Епителни кератитис

Епителни или дендритички кератитис је увек повезан са активном репликацијом вируса. Симптоми су црвенило, замагљен вид, фотофобија и непријатан осећај у оку.

Клинички знаци обухватају иницијални едем епителних ћелија који је праћен развојем дендритичне или амебоидне лезије епитела рожњаче са снижењем осетљивости рожњаче (1).

#### Стромални херпетични кератитис

Стромални кератитис се испољава као имунски облик кератитиса или неимунски кератитис који је повезан са активном репликацијом вируса у самој строми рожњаче. Ожиљавање услед рецидивирајућег стромалног херпетичног кератитиса најчешћи је узрок снижења вида код херпетичне болести ока (1).

Патофизиологија стромалног кератитиса је сложена и није у потпуности јасна. Тренутни подаци говоре да су за развој и одржавање стромалног херпетичног кератитиса одговорне CD4 Т-ћелије адаптивног имунског система (55).

На основу опсежних студија на животињским моделима, постоји неколико теорија о стимулацији имунопатолошког одговора CD4 Т-ћелија. Основно је да CD4 Т-ћелије специфичне за HSV-1 инфекцију на неки начин контролишу присуство HSV-1 антигена у строми (56). Аутореактивне CD4 Т-ћелије, које успеју да избегну дејство супресорских Т ћелија стимулишу протеине у рожњачи који опонашају HSV-1 вирусне протеине и на тај начин одржавају имунску реакцију без активне репликације вируса (57). Стромални херпетични кератитис карактерише недоследно присуство HSV-1 вируса у активној форми. У обе форме стромалног херпетичног кератитиса постоји имунска реакција, али нема поклапања са вирусном репликацијом (58).

#### Ендотелитис (Дисциформни кератитис)

Ендотелитис, раније описиван као дисциформни кератитис настаје услед вирусног оштећења ендотелних ћелија, што је праћено развојем централног стромалног едема рожњаче. Нелечени облици могу довести до трајне декомпензације ендотела и развоја булозне кератопатије (1).

### *1.3.5. Епидемиолошке карактеристике херпетичног кератитиса*

Годишња учесталост свих типова херпетичног кератитиса процењена је на 11,8 до 31,5 на 100.000 особа (59, 60). Велике студије у Сједињеним Америчким Државама (САД) и Великој Британији (ВБ) утврдиле су да је просечна старост пацијената за прво појављивање херпетичног кератитиса 37,4 године за САД и 25 година за ВБ (61). Годишња инциденција свих врста херпетичног кератитиса износи 11,8 на 100.000 особа у САД (59). У Француској је инциденца процењена на 31,5 на 100.000 особа (62).

Епителна дендритична лезија представља најчешћи облик рецидивног кератитиса, затим следи стромални кератитис (59). Укупан број оболелих од херпетичног кератитиса у САД је око 500.000 а само лечење пацијената са поновљајућим инфекцијама кошта око 177 милиона долара годишње (63, 64).

Шире епидемиолошке студије у нашој земљи за рекуретни херпетични кератитис нису рађене. Прецизне податке о глобалном утицају херпетичког кератитиса је тешко утврдити због недостатка свеобухватних епидемиолошких студија.

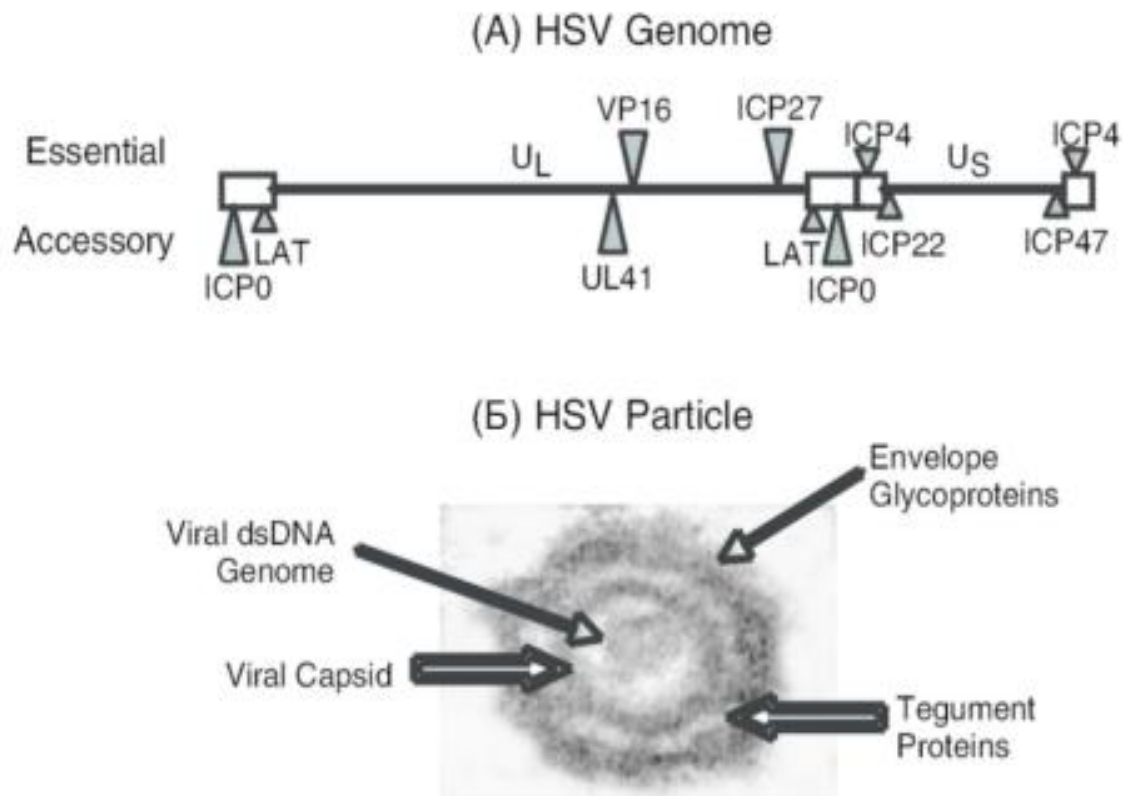


#### 1.4. Херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1)

Вирус *Herpes simplex* тип 1 (HSV-1) је ДНК вирус који припада породици *herpesviridae* и један је од осам херпес вируса који инфицирају људе (65). Поред поменутог херпес вируса тип 1 присутан је и тип 2 (HSV-2), затим варичела зостер (VZV), цитомегаловирус (CMV), Epstein-Barrov вирус (EBV), хумани херпес вирус 6 (HHV-6), хумани херпес вирус 7 (HHV-7) и хумани херпес вирус 8 (HHV-8).

Најчешћи узрок херпетичног кератитиса је HSV-1 тип вируса и то у 98% случајева (66). Геном HSV-1 вируса се састоји од линеарног молекула ДНК укупне дужине 152 кило база-Кб (Слика 6) (67). Овај тип вируса има кратак репликациони циклус и карактеристику брзог ширења. Сви алфахерпес вируси (*HSV-1*, *HSV-2* и *VZV*) су у стању да успоставе доживотну латенцију унутар неурона са периодичном ендегеном реактивацијом (68).

Већина светске популације носи латентно вирусно оптерећење (HSV-1) вирусом. У већини случајева ова инфекција пролази асимптоматски. После примарне инфекције вирус заувек остаје у организму утишан у најближим нервним ганглионима (68).



**Слика 6.** HSV-1 организација генома. (А) Шематски приказ HSV-1 генома, који показује јединствене дуге (UL) и јединствене кратке (US) сегменте. Локација неколико битних гена (VP16, ICP27 и ICP4) који су потребни за репликацију вируса *in vitro* и помоћних гена (ICP0, LAT, UL41, ICP22 и ICP47) који се могу избрисати без значајног утицаја на репликацију у култури ткива. (Б) Електронско-микроскопски приказ вируса HSV-1 који означава капсид и он садржи 152 Кб вирусног генома, тегумент протеин и овојница која садржи гликопротеин (извор, *Goins, WF. et al. 2008*).

### 1.5. Механизми реактивације HSV-1 вируса

Већина случајева херпетичког кератитиса представља понављајућу болест која се јавља као резултат HSV-1 реактивације вируса из латенције. Разумевање механизма и узрока реактивације HSV-1 вируса из латентног стања представља важан задатак за савремену вирусологију. Као што је приказано у животињским моделима, а касније и на људима латенција вируса може имати епигенетску регулацију, пре свега због тога што латентни вирусни геном има транскриптивно активни LAT (Latency-Associated Transcript) регион. Активност LAT региона је усмерена на распоред хроматина без кодирања познатих протеина (70).

Вируси који су мутирала и недостаје им LAT регион у геному још увек су у стању да успоставе и одрже реактивацију из латенције, али недавни налази потврђују да LAT регија повећава ефикасност реактивације и на неки начин контролише латенцију самог вируса (71, 72).

HSV-1 вирус успоставља латентну инфекцију у сензорним неуронима. У периоду латенције самог вируса опажа се да латентни вирусни геном има транскриптивно активну LAT регију која кодира протеин и транскрипционо неактивне генске регије што сугерише на епигенетску регулацију. Сама LAT регија бележи различите облике распореда хистона без кодирања познатих протеина (73, 74).

### **1.5.1. Вирусни утицај на имунски систем домаћина**

Да би HSV-1 вирус имао могућност доживотне инфекције потребна му је стратегија имуне евазије. Сам вирус је развио различите начине манипулације имунским системом домаћина. Један типичан пример заснован је на молекуларној мимикрији. Већина вируса кодира хомологе ћелијских интерлеукина (IL), хемокина или хемокинских рецептора (75). Epstein–Barr virus (EBV) и његов *BCRF1*-ген на пример кодира вирусни хомолог хуманог IL-10 (76). Вирусна верзија IL-10 омета уништавање инфицираних ћелија. Активност CD4 Т-ћелија је модулирана одговором вирусног цитокина (76).

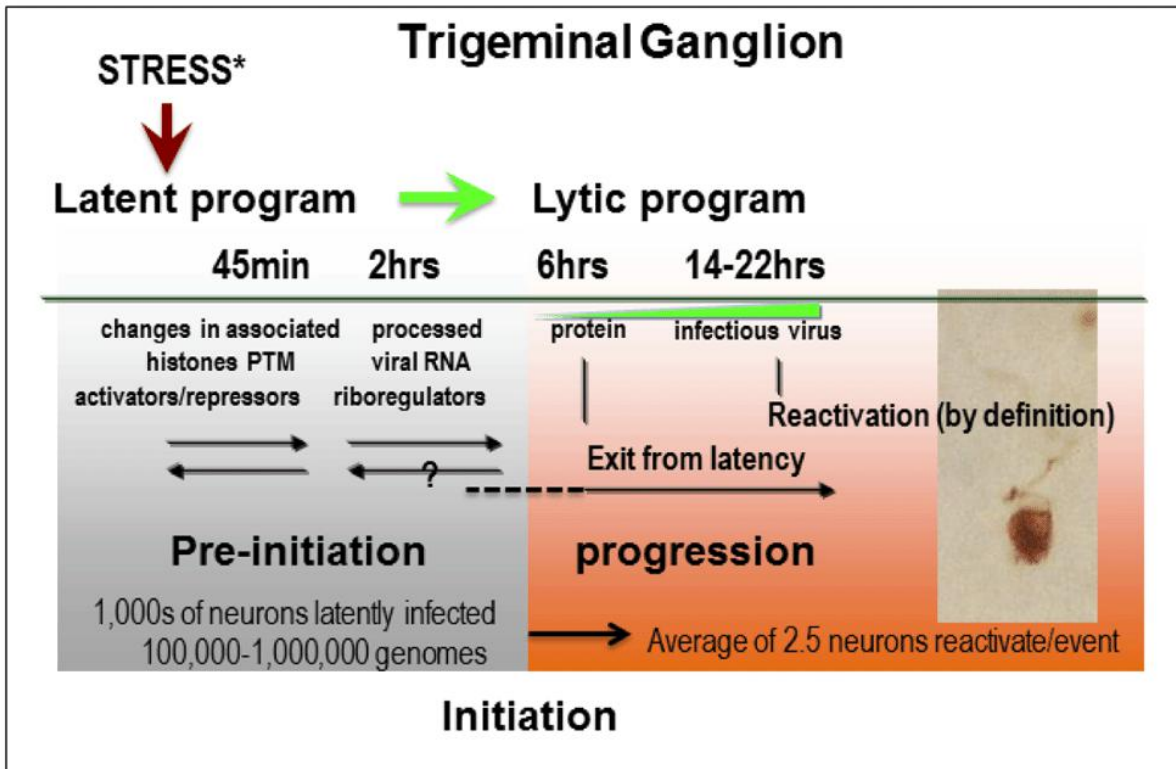
Манипулација имунским системом домаћина нуди реактивираним вирусом делимично олакшање од имунског надзора домаћина. Еволуција је очигледно избалансирала ову могућност на тај начин да ипак имуни систем домаћина контролише репликацију самог вируса тако да постоји равнотежа.

Описани механизам је највидљивији код пацијената који су на имуносупресивној терапији, код таквих болесника је честа прекомерна реактивација вируса са тежом клиничком сликом (77).

Друге студије наводе да херпес вируси могу остварити симбиотски однос са домаћинима (78). У студијама на моделу миша показано је да системска активација макрофага и IFN- $\gamma$  покренута херпес вирусним инфекцијама штити од накнадних болести које изазивају високо патогене бактерије *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pestis* (78). Ова врста симбиозе је у интересу и домаћина и вируса, јер штити домаћина од добијања других инфекција.

### 1.5.2. Спољни фактори који су укључени у реактивацију HSV-1 вируса

Код експерименталних модела на животињама, али и код људи, реактивација различитих херпес вируса може бити индукована локалном траумом (нпр. хирушком интервенцијом) или системским стресом (Слика 7).



**Слика 7.** Тригеминални ганглион (TG) латентно инфицираних мишева садржи вирусни геном (извор, Sawtell NM, Thompson RL. 2016).

Након стреса код мишева долази до хистонских транслацијских модификација у репу хистона (PTM). Већ након 2 сата детектује се вирусна РНК (viral RNA), али се вирусни протеини не кодирају. Вирусни протеини се откривају шест сати након изазваног стреса, и тада је вирус „изашао“ из латенције (од. енгл. exit from latency). Двадесет и два сата након стреса, вирусна активност се детектује у тригеминалном ганглиону (TG) (Слика 7) (79).

Пример за реактивацију вируса је и повишена телесна температура мишева на 43°C током 10 минута (80). Појава HSV папуле је у корелацији са широким спектром стресора, укључујући менталну напетост, умор и излагање јакој светлости (81).

Пре више од 100 година показало се да примена трауме на нерв у којем је утишан вирус, на пример у вези са лечењем хроничног бола, може довести до избијања херпеса у дерматому који је повезан са нервом (82). Остали ћелијски стресори, попут тренутног прекида синтезе протеина или хипоксије, довољни су да индукују вирусну активност. Познат је ефекат који може бити посредован поремећајем активности mTOR киназе (83). Овај ензим има централну улогу при реаговању на прехранбене или стресне ћелијске догађаје утицајем на транслацију РНК. У различитим моделима културе ткива је апсолутно могуће индуковати реактивацију хемијским путем на начине да она утичу на активност гена, користећи једињења која на пример блокирају метилацију хистона или одговарајућом променом на молекулу РНК (82).

Што се тиче HSV вируса, познато је да активност спољних фактора као што су емоционални стрес, грозница, изложеност УВ зрацима, хормоналне промене, зубна хирургија и траума могу да изазову активирање (80).

Није познато да ли ови фактори делују директно на заражени неурон, или индиректно помоћу различитих телесних функција. Ово је важан детаљ у самој патогенези латентне инфекције HSV вирусом, јер механизам реактивације вируса остаје нејасан и потпуно непредвидљив (82). Један од могућих механизма је ефекат повезан са менталним стресом преко CD8 Т-ћелија специфичних за вирус. Ове ћелије се често налазе у „комуникацији” са зараженим неуронима, који су повезани путем имунских синапси. CD8 Т-ћелије производе интерфероне који доприносе одржавању латенције вируса а истовремено помажу неурону да опстане (83).

Познато је да психички и физички стресори утичу на активност CD8 Т-ћелија ослобађањем неуроендокриних фактора, то је механизам који може повезати контролу латенције HSV са активношћу симпатичког нервног система (84).

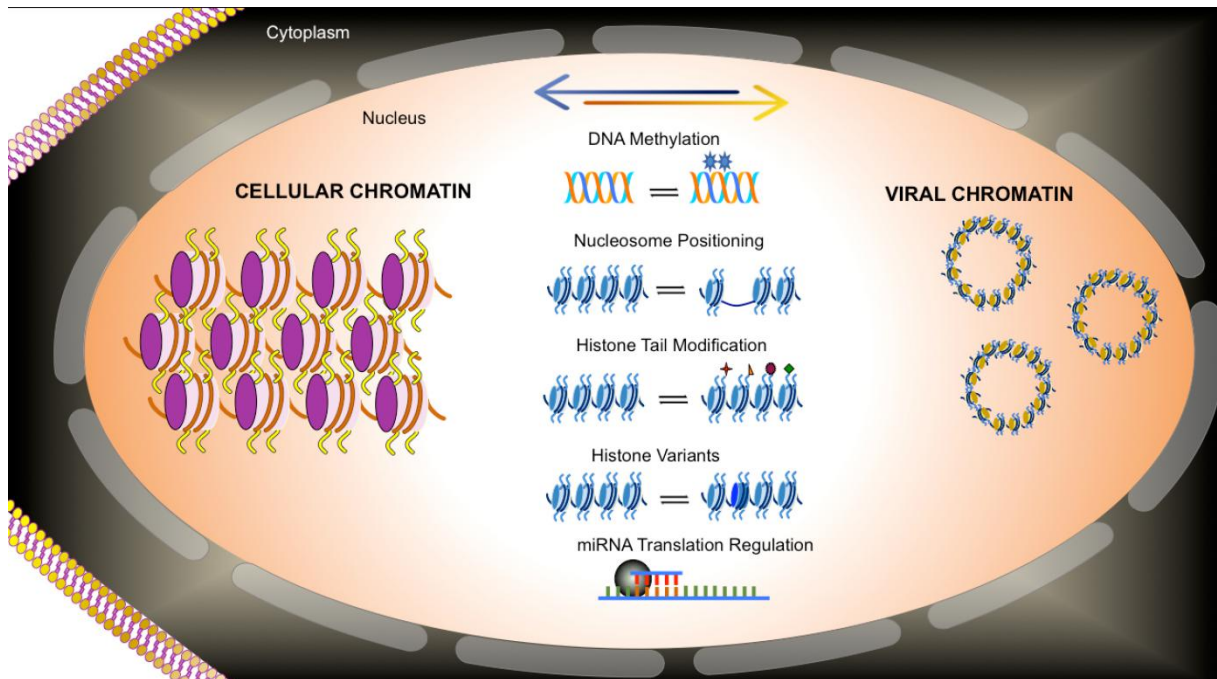
Ако се посматра биолошки процес старења сам организам због промена у имунском систему није у стању да ефикасно контролише вирус, што има за последицу и померање саме латентне фазе вируса ка бржој реактивацији (85). Промене у имунском систему које су последица старења организма доводе до појачане активности вируса, али није познато шта тачно узрокује пораст активности херпес вируса. Истраживања повезана са стресом астронаута приликом боравка у свемиру показују, да је тај ниво имунске супресије довољан да изазове реактивацију латентних херпес вируса, вероватно снижавањем ћелијског имунитета или као последица оксидативног стреса (86).

### ***1.5.3. Епигенетска регулација реактивације HSV-1 вируса***

Као што смо већ навели латентни вирусни геном има транскриптивно активну LAT регију. Активност LAT регије усмерена је на хроматинско уређење и нема познатих кодираних протеина. Ова врста активности LAT регије сугерише на епигенетску регулацију (Слика 8). Епигенетска регулација реактивације вируса је повезана са метилацијом молекула ДНК. Промене везане за метилацију молекула ДНК доводе до промена у репу хистона (од. енгл. histone tail modification) ћелијског хроматина. Ове промене су саставни део епигенетске регулације активности вируса на нивоу ћелијског хроматина (87).

У латентној фази HSV-1 вирус у LAT регија бележи различите промене у распореду хистона (73, 74). Витамин В12 и фолна киселина су укључени у процес метилације ДНК молекула, што је један од основних механизма епигенетског уређења молекула ДНК. Метилација молекула ДНК повезана је са уносом фолата и нивоом концентрације фолата у организму (88). Људи не могу самостално синтетизовати метилне групе, па их уносе храном или као додаток у виду суплемената. Епигенетска истраживања довела су до могућности идентификације епигенетског статуса одређеног локуса. На овај начин је могуће утврдити епигенетски ефекат одређених хранљивих материја на гене које желимо да посматрамо (88).





Слика 8. Вирусна епигенетска регулација реактивације (извор, Balakrishnan, L, and Barry M. 2017).

#### 1.5.4. Фолна киселина

У процесу метилације молекула ДНК најважнији нутритијенти су витамини В комплекса - фолна киселина или витамин В9, витамин В6, витамин В12 и аминокиселине као веза, бетаин, хомоцистеин и метионин. Фолна киселина се састоји од три компоненте, прва 2-амино-4-хидрокси-птеридинског језгра, друга р-амино-бензојеве киселине (РАВА) и L-(+) глутаминске киселине (89) (Слика 9). Овакав облик фолне киселине није метаболички активан. Тетрахидрофолати су биолошки активни деривати фолне киселине који делују као коензими за пренос. Највећи део фолата се уноси храном. Они су повезани са аминокиселинама најчешће глутаматом. Црева могу да апсорбују фолат само у облику моноглутамата. Четкаста слузница танког црева под утицајем фолат-редуктазе разграђује полиглутамат у моноглутамат и као такав се биолошки апсорбује (90).

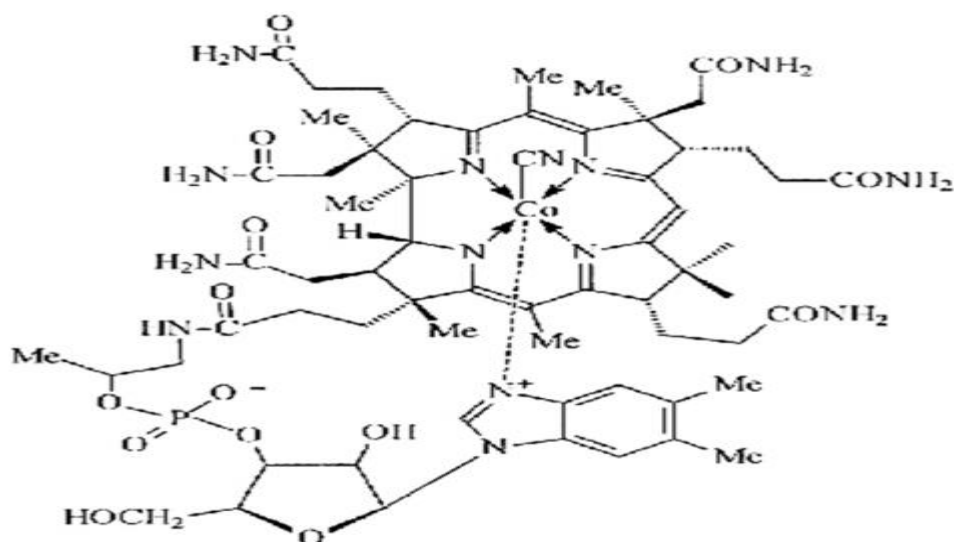
Фолати се у највећој мери складиште у хепатоцитима јетре, а мањи део се таложи у другим ћелијама у облику полиглутамата. Уколико дође до метаболичког вишка фолата, они се из јетре излучују у жучну кесу и путем урина и столице избацују из организма (90).



Слика 9. Хемијска структура фолне киселине (извор, Живановић В. и Костић Д. 2008).

### 1.5.5. Витамин В12

Витамин В12 је молекул који има највећу познату молекулску структуру међу витаминима (Слика 10) (91). Витамин В12 у организам уносимо у облику цијанокобаламина и највећи део овог витамина се уноси са протеинима животињског порекла. Апсорпција витамина се одвија у желуцу под утицајем хлороводоничне киселине и пепсина. Снижена серумска концентрација витамина В12 може резултирати различитим поремећајима. Дефицит витамина В12 узрокује мегалобластичну пернициозну анемију са симптомима сличним анемији узрокованој недостатком фолне киселине. Иако је механизам у потпуности непознат, недостатак В12 изазива промене нервног система укључујући оштећење мијелина мозга, кичмене мождине и периферних живаца, што се манифестује укоченошћу удова, губитком памћења и честим променама расположења (92).



Слика 10. Хемијска структура витамина В12, (извор, Живановић В. и Костић Д. 2008).

### 1.6. Интерлеукин *IL28B*

Интерлеукини делују као посредници између различитих елемената имунског система и имају важну улогу у борби против вирусних инфекција. Интерлеукини су мали сигнални протеински молекули. Класификују се као протеини, пептиди или гликопротеини. Ћелије различитог имуног порекла синтетишу интерлеукине како би помогли и комплетирали имунску реакцију. Производња интерлеукина типа један (IL-1) је најважнија је за контролу вирусне HSV-1 репликације (93).

На основу тога забележена је појачана вирусна активност HSV-1 код мишева са недостатком IL рецептора типа I (94). Интерлеукин IL-28B (интерферон- $\lambda$ 3), заједно са IL-28A и IL-29 (који се такође називају и интерферони IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2) чине нову удружену породицу унутар интерферона IL-10 (95).

Интерферони ламбда (IFN- $\lambda$ ) показују бројне биолошке карактеристике сличне онима које имају IFN- $\alpha/\beta$ , укључујући антивирусну активност, антипролиферативну активност као и *in vivo* антитуморско деловање. Сигнализацијом и проласком кроз хетеродимерни комплекс 28R $\alpha$ /IL-10R $\beta$  интерферони ламбда IFN- $\lambda$  врше своје антивирусне и имунорегулационе активности (96, 97). Доказана је антивирусна активност која је повезана са интерферонима ламбда IFN- $\lambda$  и са активирањем интерфероном стимулираних гена (од. енгл. *interferon-stimulated gene ISG*) (98). Овај облик деловања је основни механизам за инхибиторни ефекат IFN- $\lambda$  на HSV-1 вирус. Недавна истраживања су објавила везу између специфичног полиморфизма *IL28B* (rs12979860) и реактивације HSV-1 код пацијената са херпес лабијалисом (99), сугеришући да полиморфизми у генима који су укључени у антивирусне одговоре могу повећати ризик за развоја рекурентне HSV-1 инфекције. Важно је напоменути да се за овај полиморфизам наводи да има позитивну корелацију са нивоима интерферона IFN- $\lambda$  у серуму и исходом лечења код инфекције вирусом хепатитиса С (100, 101).

Третман интерферонима IFN- $\lambda$  доводи до инхибирања репликације вируса HSV-1 и смањује упалну реакцију у експерименталном моделу херпес симплекс кератитиса HSK код мишева (102).

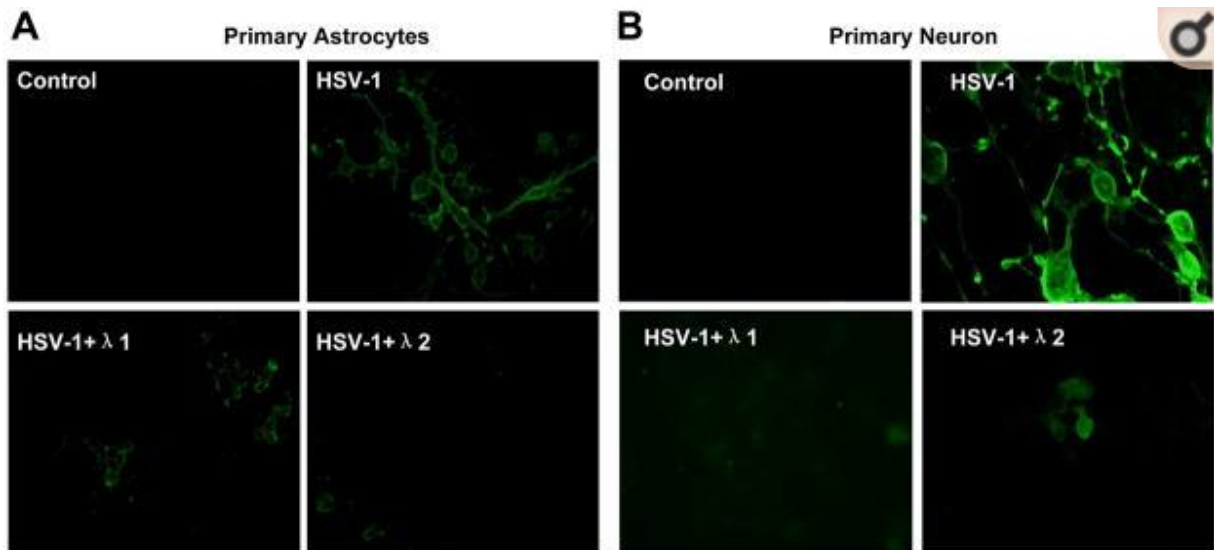
Интерферони- $\alpha/\beta$  имају основну улогу у урођеном имунитету ћелија домаћина против свих вирусних инфекција. Поставља се важно питање да ли интерферони IFN- $\lambda$  имају способност активирања путева који индукују експресију IFN- $\alpha/\beta$  и IFN-стимулисаних гена (ISG)?

Студија која је детаљно описала овај механизам на моделу примене IFN- $\lambda$  у астроцитима и неуронима открива важан детаљ који је везан за дејство IFN- $\lambda$  на астроците и неуроне (98). Деловањем IFN- $\lambda$  у астроцитима долази до индукуције и експресије ендогених IFN- $\alpha/\beta$  (99). У неуронима IFN- $\lambda$  индукује само експресију IFN- $\alpha$ , што значи да интерферони IFN- $\lambda$  показују селективност деловања у односу на место деловања, што је још једна њихова особина (Слика 11) (97,99). Важна особина интерферона IFN- $\lambda$  је и способност да индукује експресију ISG гена (98).

Интерферон- $\lambda$  има релативно широку дистрибуцију у ткивима, што сугерише да многа ткива садрже ћелије које реагују активно на IFN- $\lambda$ . Ова особина се и могла очекивати од цитокина са антивирусном активношћу, али је у комплетном имуном одговору важно одредити које тачно Т-ћелије производе који интерлеукин (95). Периферни подскупови Т-ћелија често се дефинишу као „помагачи“ или „цитотоксични“ облици због међусобно искључивог дејства као што су CD4 и CD8-ћелије. У последњим студијама које су проучавале разноврсност дејства Т-ћелија постало је очигледно да се одговор Т-помагача може поделити, у зависности од тога како су поларизоване (103). Ове поларизоване Т-ћелије су дефинисане у складу са одређеним цитокинима који се производе приликом стимулације (103).

На пример, Th1 ћелије производе IL-2 док Th2 ћелије производе IL-4, IL-5 и IL-13. У новије време, додатна подгрупа, такозване „Т-регулаторне 1“ (Tr1) ћелије, дефинисана је као способна да лучи IL-10 (104). Најновија класа Th ћелија, Th17 ћелије, су можда и витални играчи у упалном процесу и имуном одговору (105).

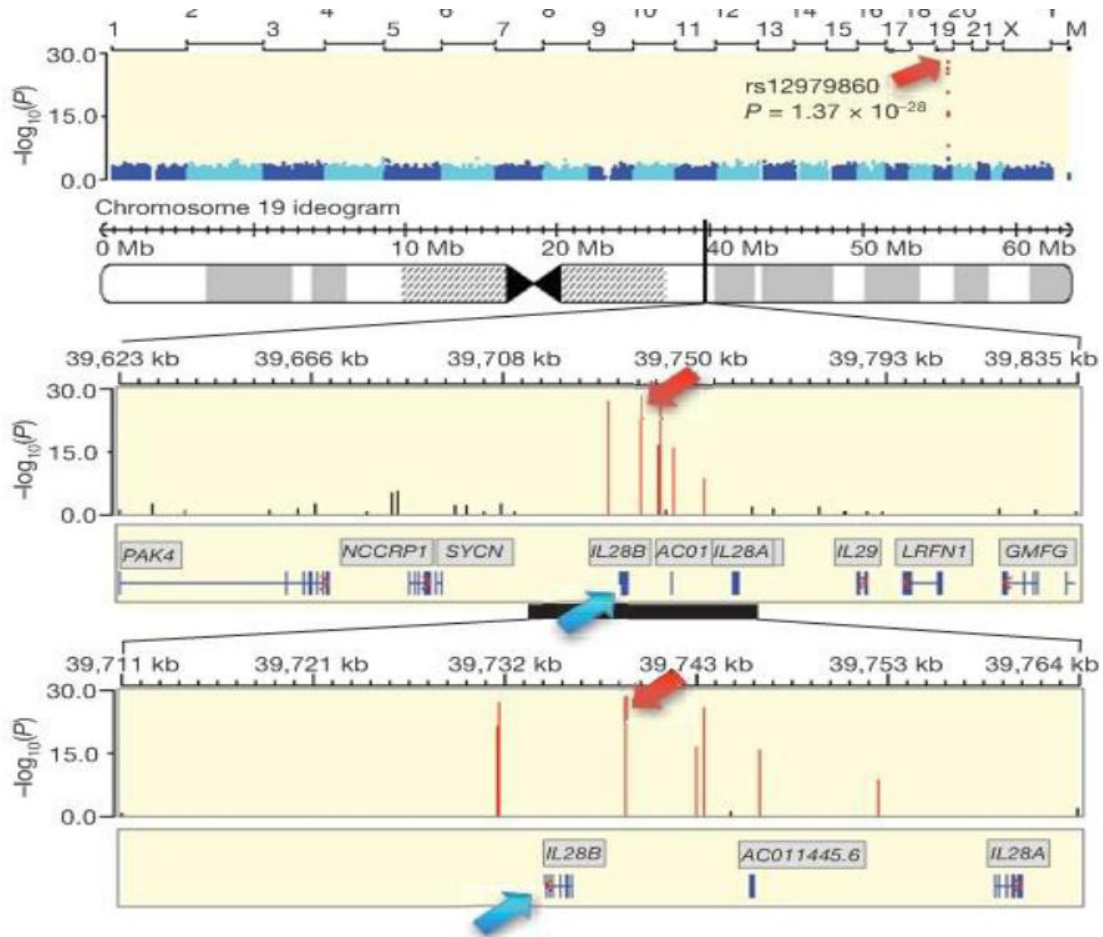
Способност IFN- $\lambda$  да модулира имунски одговор *in vitro* је проучаван одвојено од његових антивирусних имунских одговора (106). Доказано је да IFN- $\lambda$  може да регулише експресију хемокина различитих ћелија (107).



**Слика 11.** IFN- $\lambda$ 1 и IFN- $\lambda$ 2 инхибирају експресију протеина HSV-1 вируса у хуманим астроцитима и неуронима. Примарни хумани астроцит (А) и неурон (Б), претходно обрађени са или без IFN- $\lambda$ 1 и IFN- $\lambda$ 2, инфицирани HSV-1 вирусом (извор, Li J. et al. 2011).

### 1.6.1. Структура гена који кодира интерлеукин *IL28B*

Интерлеукин *IL28B*, односно гени који га кодирају су веома близу генима IL-29 на хромозому 19. Рецептор за *IL28B* садржи јединствени *IL28B* рецептор алфа ланца који се наставља на IL-10 рецептор бета ланца (Слика 12) (108).



Слика 12. Садржај и структура *IL28B* гена, rs12979860 3 кбр узводно од *IL28B* гена (извор, Balagopal A. et al. 2010).

## 2. Циљеви, хипотезе и значај истраживања

### 2.1. Циљеви истраживања

1. Циљ студије је да се истражи могућа повезаност између *IL28B* генотипа домаћина и и појаве рекурентног херпетичног кератитиса са последичним ожиљавањем и васкуларизацијом рожњаче услед стромалног облика херпетичног кератитиса.
2. Циљ истраживања је и анализа могуће повезаности између концентрација витамина В12 и фолне киселине у крви и развоја рекурентног херпетичног кератитиса, укључујући све могуће облике акутног херпетичног кератитиса.

### 2.2. Хипотезе истраживања

Хипотезе овог истраживања су:

1. Варијанте *IL28B* утичу на предиспозицију за појаву рекурентног стромалног херпетичног кератитиса.
2. Латентна инфекција HSV-1 и активација самог вируса је епигенетски условљена и повезана са недостатком витамина В12 и фолне киселине код испитника са рекурентним херпетичним кератитисом.



### 2.3. Значај истраживачког питања

1. Значај студије се огледа у првом генотипизирању испитаника са рекуретним херпетичним стромалним кератитисом за *IL28B* и могућем утицају генотипа на настанак рекуретног херпетичног кератитиса.

2. Значај студије се огледа и у откривању могуће улоге концентрација витамина В12 и фолне киселине у крви за реактивацију HSV-1 инфекције код испитаника са рекуретним херпетичним кератитисом. Витамин В12 и фолна киселина се први пут доводе у везу са рекуретним херпетичним кератитисом као доказани модулатори ДНК молекула.

Досадашња истраживања приказана у уводном делу показују да вирусне инфекције које могу индуковати експресију IFN- $\alpha/\beta$  такође стимулишу експресију IFN- $\lambda$ . Истраживања повезана са испитивањем спонтаног клиренса инфекције вирусом хепатитиса С (HCV), директно повезују утицај различитих фактора домаћина (100, 101).

Полиморфизми у региону гена *IL28B* су повезани са спонтаним клиренсом HCV, имплицирајући генски производ, интерферон (IFN)- $\lambda 3$ , у имунском одговору на HCV. Поред тога, полиморфизми у региону гена *IL28B* су повезани са HSV-1 инфекцијом лабијалног подручја (99). Анализа могуће корелације у варијацији *IL28B* домаћина и предиспозиције за рецидив херпетичног кератитиса је основа за наше истраживање.

Поред тога, HSV-1 успоставља латентну инфекцију у сензорним неуронима, а латентни вирусни геном има транскрипцијски активан LAT (енгл. Latency-Associated Transcript) регион који бележи различите облике распоређивања хистона што указује на епигенетску природу вируса. Витамин В12 и фолна киселина су укључени у процес метилације молекула ДНК. Метилација молекула ДНК је повезана са уносом фолата и концентрацијом фолне киселине у телу (88).

### **3. Материјал и методе**

#### **3.1. Врста студије**

Истраживање је обављено у виду експерименталне студије на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

Ова студија је рађена у складу са прописима одбора за ревизију институција, уредбом о информисаном пристанку и поштовању начела Хелсиншке декларације.

Етички комитет Клиничког центра Србије, Београд, је одобрио студију дана 21.03.2019. под редним бројем 57/14.

Генотипизација за *IL28B* (rs12979860snp), урађена је у Научном институту за ветеринарство Србије. Узорци крви за витамин В12 и фолну киселину анализирани су у истој лабораторији, која је сертифицивана системом квалитета Total Quality Management (TQM).

#### **3.2. Популација која се истражује**

Испитивање је обухватило 80 испитаника старијих од 18 година, оба пола, са или без историје рецидива херпетичног кератитиса који су анамнестички потврдили да су имали поновљене епизоде лабијалног херпеса. Испитаници са рекурентним херпетичним кератитисом са последичним ожиљавањем и васкуларизацијом рожњаче услед стромалног облика херпетичног кератитиса изабрани су на основу ретроспективне анализе медицинске документације, укључујући здравствени картон и историју болести на Клиници за очне болести.

Пацијенти са историјом поновљене епизоде лабијалног херпеса без појаве херпетичног кератитиса регрутовани су из реда запослених у Научном институту за ветеринарство Србије и Клиничком центру Србије.

### ***Метод испитивања***

1. Сви испитаници (80), са или без историје рецидива херпетичног кератитиса, добровољно су попунили упитник у којем су потврдили да су имали поновљене епизоде лабијалног херпес.
2. Сви испитаници тестирани су на IgG анти HSV-1 антитела. Седамдесет и пет испитаника од осамдесет било је серопозитивно на HSV-1, и код ових испитаника рађена је генотипизација за *IL28B*.
3. Педесет и један испитаник од седамдесет пет није имао рецидивирајући херпетични кератитис, већ само историју поновљених епизода лабијалног херпеса.
4. Двадесет и четири пацијента су имала историју рецидива херпетичног кератитиса укључујући и стромални облик са последичним ожиљавањем и васкуларизацијом рожњаче. Сви наведени пацијенти имали су значајно снижену видну оштрину која је била (мања или једнака 6/60 Снелен таблица за тестирање оштрине вида).
5. Испитаници са рекурентним херпетичним кератитисом клинички су праћени на Клиници за очне болести Клиничког центра Србије у Београду најмање годину дана. У акутној фази рецидива херпетичног кератитиса, код ових испитаника, (укупно 24) узет је узорак од 2ml периферне венске крви ради утврђивања нивоа фолне киселине и витамина B12. Рецидиви су дефинисани као епителни кератитис, стромални кератитис, ендотелитис, иридоциклитис или као комбинација наведених облика.
6. Дванаест месеци пре одређивања нивоа витамина B12 и фолне киселине испитаници нису користили суплементацију комплекса витамина B и фолне киселине. Такође, испитаници, нису јели најмање 8 сати пре узорковања.

***Критеријуми за неукључивање испитаника у студију:***

1. Историја очних коморбидитета.
2. Претходна операција ока.
3. Било који облик анемије.
4. Све системске и неуролошке болести.

***3.2.1. Величина узорка***

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима других аутора који су проучавали утицај испитиваног генотипа код испитаника са лабијалним херпесом (95). Коришћењем одговарајућег рачунарског програма G\*Power 3.1.9.4 и  $\chi^2$  теста уз вероватноћу алфа грешке од 0,05, снагу студије од 0,08, добијен је минималан број од 40 испитаника. Укупна величина узорка у студији је 75 испитаника.

**3.3. Узорковање и методе анализе*****3.3.1. Иmunске анализе***

Од сваког испитаника узето је 5 ml периферне венске крви како би се идентификовао HSV-1 IgG статус. Урађен је Elisa тест за квалитативно одређивање антитела IgG класе за HSV типа 1 у људском серуму или плазми (GenWay Biotech, Inc San Diego, CA, USA).

Гранична вредност за антитела класе IgG која су специфична за присуство HSV-1 инфекције: HSV-1 IgG < 9NTU.

### 3.3.2. Ниво фолне киселине и витамина В12

Испитаницима, код којих је клиничким прегледом установљен рецидивирајући херпетични кератитис, узета су 2ml периферне венске крви у стандардној биохемијској епрувети, у акутној фази болести, како би се одредио ниво фолне киселине и витамина В12.

Ниво витамина В12 је мерен на апарату "Roche Cobas 6000" analyzer, (ECLIA Method), а ниво фолне киселине је мерен на апарату "Roche Cobas E411" analyzer, (ECLIA Method).

Узорци крви су анализирани у лабораторији Научног института за ветеринарство Србије која има Total Quality Management (TQM) систем.

Референтне вредности за витамин В12: 6,9 доња граница – 44,4 ng/ml горња граница.

Референтне вредности за фолну киселину: 4,6 доња граница – 18,7 ng/ml горња граница.

### 3.3.3. Генотипизација *IL28B*

Пет милилитара периферне венске крви прикупљено је од сваког пацијента за генотипизацију *IL28B* rs12979860. Изоловање укупне ДНК вршено је комерцијалним китом по упутству произвођача QIAamp DNA Blood mini kit, (QIAGEN, Hilden, Germany). У геному је испитиван полиморфизам појединачног нуклеотида (engl. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) rs12979860 у близини *IL28B* на хромозому 19.

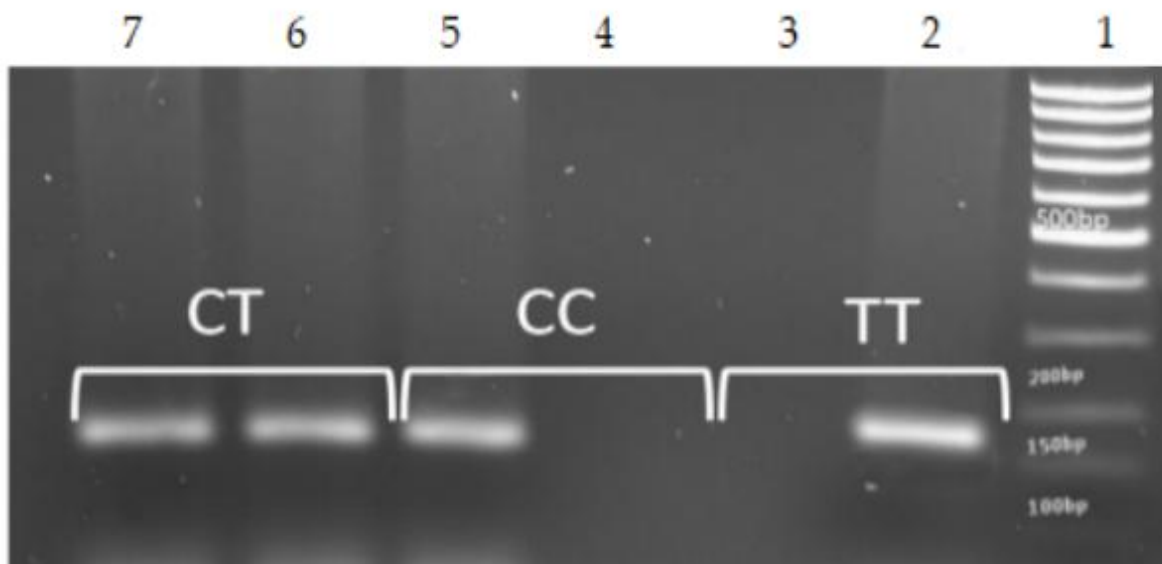
За испитивање полиморфизма коришћен је SSP-PCR (Specific Primer-Polymerase Chain Reaction) која умножава кратко ДНК подручје узводно или низводно од полиморфизма помоћу специфичног прајмера за алел (Табела 1) (110). PCR производи су анализирани у 2% агарозном гелу уз бојење етидијум бромидом (Слика 13). Одређивање појединачних генотипова полиморфизма извршено је на основу присуства или одсуства циљних секвенци.

Амплификација је извршена по следећем поступку:

- Иницијални циклус на 95 °C – 5 минута, затим
- 35 циклуса на 95 °C – 30s, 58C – 45s, 72 °C – 60s и
- 72 °C – 10 минута.

**Табела 1.** Нуклеотидне секвенце прајмера коришћених у нашој студији за *IL28B*

<i>IL28B</i> SNP	Нуклеотидна секвенца	Величина PCR продукта
	Gen (sense) 5'-TTATCGCATACGG CTAGGC-3'	
rs12979860	C (antisense) 5'TGCAATTCAACCCTGGTTC G-3'	153 bp
	T (antisense) 5' TGCAATTCAACCCTGGTTC A-3	



**Слика 13.** Полиморфизам rs12979860 - одређивање генотипова (Величина PCR продукта: 153 бп). Линија 1, ДНК бп; траке 2-3, ТТ хомозигот; траке 4-5, СС хомозигот, линије 6-7, СТ хетерозигот. Хетерозиготни узорци резултирали су амплификацијом оба опсега, што указује на присуство два алела.

#### 3.4. Статистичка обрада података

За статистичку обраду података коришћен је компјутерски програм SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences, ver. 20). Статистичка значајност постављена на нивоу од  $p < 0,05$ . За опис резултата од значаја коришћене су методе дескриптивне статистике, графичко и табеларно приказивање.

Израчунавањем дистрибуције генотипова, процењено је да ли се испитивана варијација гена налази у Hardy-Weinberg еквилибријуму (HWE) за вероватноћу од  $p > 0,05$ .

Зависност варијабли, тип генотипа и појава рекуретног стромалног херпетичког кератитиса анализирани су применом  $\chi^2$  теста, уз праг значајности од 0,05.

Илустрација асоцијације између генотипова и ризика за настанак рекуретног херпетичког стромалног кератитиса представљена је израчунавањем величине утицаја и применом корелационе анализе.

Применом Спирмановог коефицијента корелације ранга анализирали смо зависност концентрација витамина В12 и фолне киселине код испитаника у акутној фази болести, и појаве рекуретног херпетичног кератитиса.

#### 4. Резултати

Испитивање је обухватило 80 испитаника старијих од 18 година, оба пола. У циљу хомогенизације испитиване групе, сви испитаници са или без историје рецидива херпетичног кератитиса, старији од 18 година, имали су поновљене епизоде лабијалног херпеса, што су потврдили у упитнику који су добровољно попунили. Такође, сви испитаници су тестирани на IgG анти HSV-1. Седамдесет и пет испитаника од осамдесет било је серопозитивно на HSV-1 и они су укључени у студију.

На основу анализе медицинске документације и клиничким прегледом утврђено је да су двадесет и четири пацијента имала историју рецидива херпетичног кератитиса са израженим ожиљцима и васкуларизацијом рожњаче услед стромалног херпетичног кератитиса. Наведене промене на рожњачи довеле су до значајног снижења видне оштрине код ових пацијената,. Преостали испитаници, њих педесет и један, имали су само историју понољеног лабијалног херпеса без промена на очима. Демографске карактеристике студијске популације сажете су у Табели 2.



Табела 2. Демографске карактеристике популације

<i>Карактеристике популације</i>	<i>Сви пацијенти</i>
n - укупан број испитаника	75
Однос полова (М:Ж)	36:39
Старост испитаника, $\bar{x} \pm \text{С.Д.}$	44,95 $\pm$ 11,294
Имају кератитис (М)	5 (6,7%)
Немају кератитис (М)	31 (41,3%)
Имају кератитис (Ж)	19 (25,3%)
Немају кератитис (Ж)	20 (26,7%)

X - аритметичка средина  $\pm$  С.Д.- стандардна девијација, М, мушки пол ; Ж, женски пол.

#### 4.1. Одређивање *IL28B* rs12979860 генотипова и њихова дистрибуција

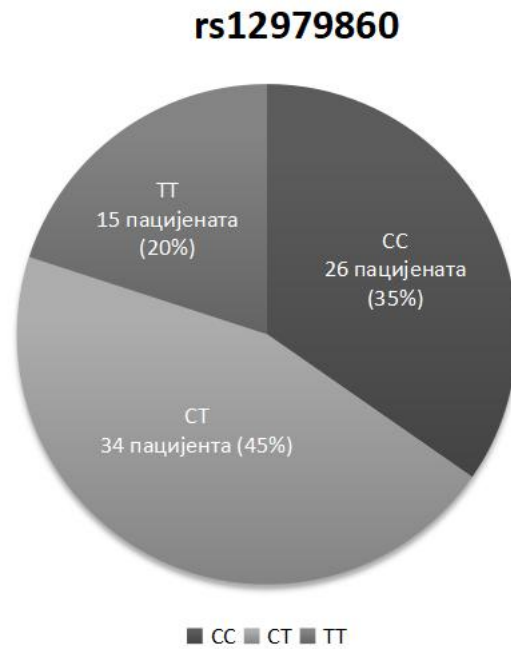
Дистрибуција *IL28B* rs12979860 генотипова за испитивани полиморфизам је у складу са Hardy-Weinberg еквилибријумом (HWE) (Табела 3).

**Табела 3.** Дистрибуција генотипа за испитивани полиморфизам и Hardy-Weinberg еквилибријум,  $\chi^2$ - тест је 0,63,  $p > 0,05$ .

<i>IL28B</i> полиморфизам	Генотип %	$\chi^2$	P
rs12979860	CC (35%)	0,63	0,43
	CT (45%)		
	TT (20%)		

#### *Дистрибуција генотипа IL28B rs12979860*

Дистрибуција генотипова *IL28B* rs12979860 за целокупну студијску популацију приказана је на Слици 14. У нашој студији CTrs1279860 је био најчешће идентификован генотип у студијској популацији, а био је присутан код 45% пацијената (34/75). Потом следи генотип CCrs1279860, са присутношћу од 35% у популацији (26 пацијената), и генотип TTrs1279860 који се јавља у преосталих 20% популације (15 пацијената) (Слика 14). Процентуална дистрибуција оболелих и необолелих пацијената од рекурентног стромалног херпетичног кератитиса у зависности од генотипа за целокупну студијску популацију представљена је у Табели 4.



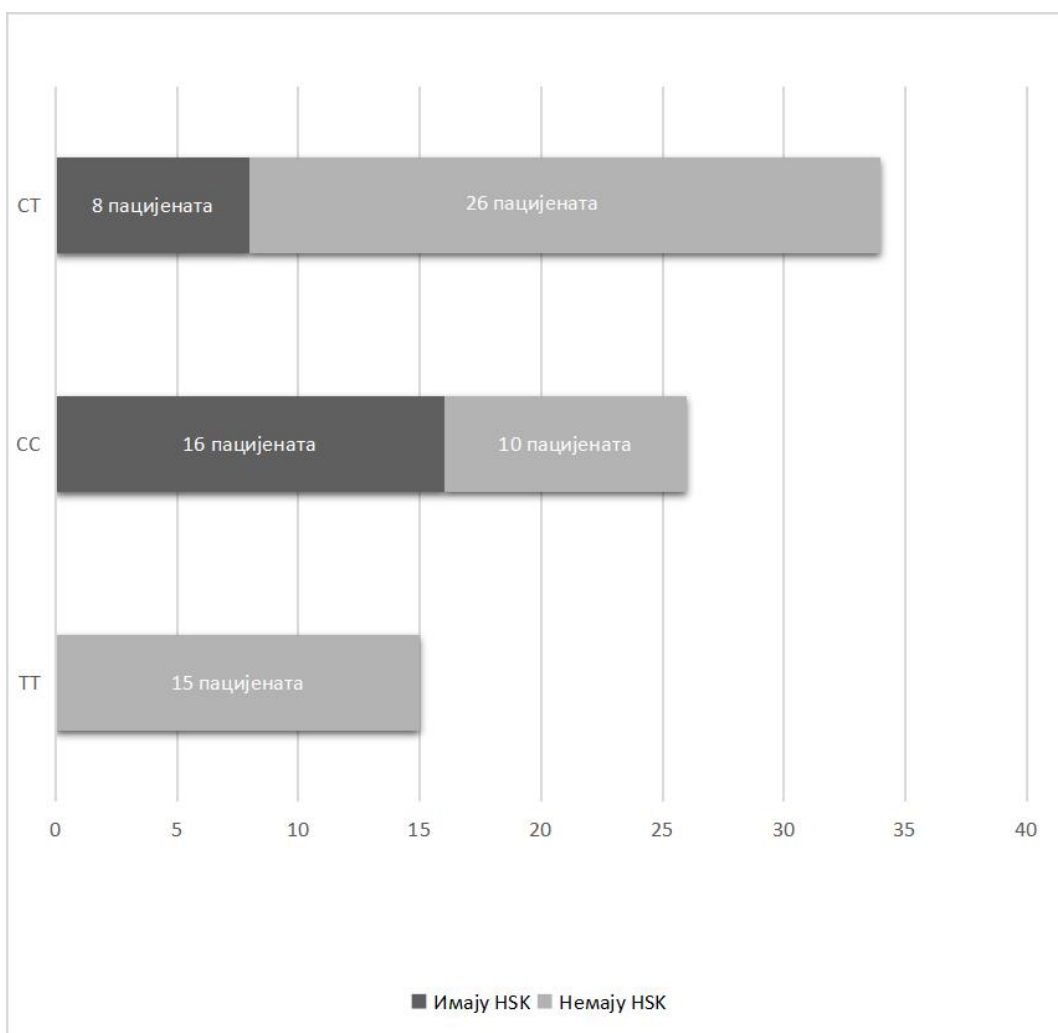
**Слика 14.** Дистрибуција *IL28B* rs12979860 генотипа у целокупној студијској популацији. Процентуална дистрибуција за *IL28B* rs12979860. CC: CCrs1279860, CT: CTrs1279860, TT: TTrs1279860.

**Табела 4.** Дистрибуција *IL28B* rs12979860 генотипа у целој студијској групи. Процентуална дистрибуција по генотипу у групи оболелих и необолелих од херпетичног стромалног кератитиса.

Дистрибуција			Генотип			Укупно
			СС	СТ	ТТ	
Стање	Имају кератитис	Укупно	16	8	0	24
		Имају кератитис %	66,7%	33,3%	0%	100,0%
		Генотип %	61,5%	23,5%	0%	32,0%
		Укупно %	21,3%	10,7%	0%	32,0%
	Немају кератитис	Укупно	10	26	15	51
		Немају кератитис %	19,6%	51,0%	29,4%	100,0%
		Генотип %	38,5%	76,5%	100,0%	68,0%
		Укупно %	13,3%	34,7%	20,0%	68,0%

У нашем истраживању запажена је статистички значајна повезаност између појаве рекурентног стромалног HSV кератитиса и два SNP генотипа за *IL28B* (CCrs12979860 и CTrs12979860, )  $\chi^2 = 18,605$ ;  $p < 0,05$ . Величина утицаја између варијабли у нашој студији је била 0,498 и указује на велики значајан утицај наведених генотипова на појаву рекурентног стромалног HSV кератитиса. Дистрибуција генотипова *IL28B* према клиничкој манифестацији рекурентног стромалног HSV кератитиса приказана је на слици 15. Варијације генотипа CCrs12979860 и CTrs12979860 показале су значајну повезаност са рекурентним стромалним HSV кератитисом (Табела 5).

Ако се узме у обзир да је генотипска варијација TTrs12979860 примећена само код пацијената који су пријавили да имају лабијални херпес, укупан број пацијената са *IL28B* TTrs12979860 је 15 (Слика 15), можемо рећи да се генотипска варијација *IL28B* TTrs12979860 у нашој студији не открива код пацијената који имају рекуретни стромални херпетични кератитис.



**Слика 15.** Дистрибуција генотипова *IL28B* према клиничкој манифестацији рекуретног стромалног HSV кератитиса.

Јачину асоцијације између генотипова *IL28B* rs12979860 и праћеног обољења, рецидивирајућег стромалног HSV кератитиса, изразили смо корелационом анализом за генотип CCrs1279860 и CTrs1279860.

Израчунавањем Пирсоновог коефицијента корелације између CCrs1279860 генотипа и појаве рекурентног стромалног HSV кератитиса закључујемо да постоји статистички значајна повезаност између CC генотипа и појаве рекурентног стромалног херпетичног кератитиса (*Pearson Correlation* = 0,843), (Табела 5).

Анализирајући добијени Пирсонов коефицијент корелације за генотип CTrs1279860 закључујемо да постоји статистичка повезаност између СТ генотипа и појаве рекурентног стромалног херпетичног кератитиса (*Pearson Correlation* = 0,735) (Табела 5).

**Табела 5.** Јачина асоцијације генотипа CC, СТ и појаве рекурентног стромалног херпетичног кератитиса.

Генотип	Значајност	<i>Pearson Correlation</i> ( <i>R</i> )
CC: CCrs1279860	000	0,843
СТ: CTrs1279860	000	0,735

#### 4.2. Фолна киселина, витамин В12 и број рецидива

Код двадесет и четири пацијента, са рецидивирајући херпетичним кератитисом, узето је 2 ml периферне венске крви како би се измерио ниво фолне киселине и витамина В12 у акутној фази рецидива болести.

Код испитиваних пацијената ниво витамина В12 у крви кретао се у оквиру референтних вредности (6,9 - 44,4 ng/mL) и на основу коефицијента варијације ( $c_v < 30\%$ ) био је хомоген, табела 6. Такође, ниво фолне киселине у крви посматраних пацијената кретао се у оквиру референтних вредности (4,6 - 18,7 ng/mL) и био је хомоген, табела 6. С обзиром на хомогеност података, аритметичке средине су адекватни показатељи просечних вредности, па је код пацијената просечан ниво витамина В12 у крви износио 8,33 ng/mL, а просечан ниво фолне киселине у крви био је 6,50 ng/mL. Број рецидива херпетичног кератитиса се кретао од 1 до 3 и није био хомоген ( $C_v = 50,72\%$ ), па се на основу медијане закључује да се у просеку јавио један рецидив херпетичног кератитиса. Код четрнаест пацијената утврђен је по један рецидив херпетичног кератитиса, а код по пет пацијената јавила су се по два и три рецидива херпетичног кератитиса. Резултати  $\chi^2$ -теста указују на статистички значајно различиту учесталост броја рецидива херпетичног кератитиса ( $\chi^2 = 4,263$ ;  $p = 0,034$ ). Статистички значајно чешће се јавио један рецидив херпетичног кератитиса,  $\chi^2 = 4,263$ ;  $p = 0,039$ .

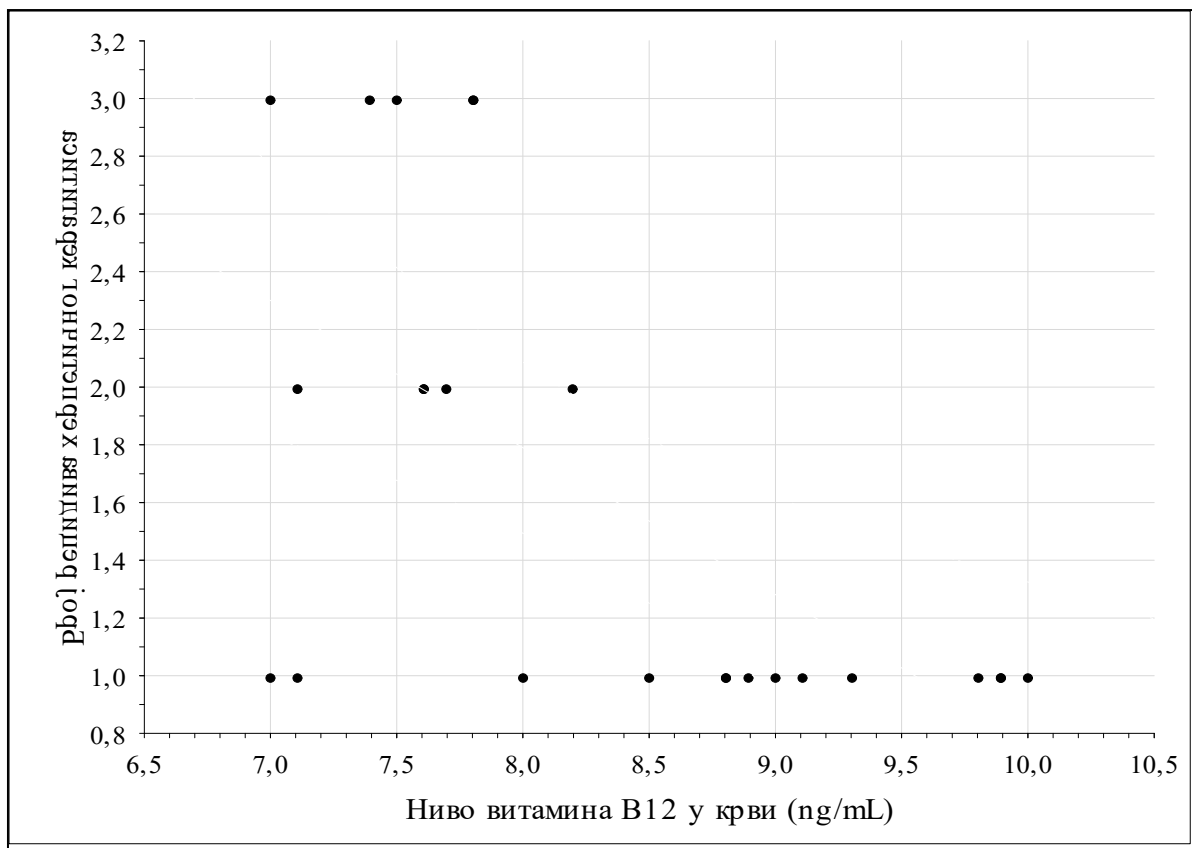
*Shapiro-Wilk*-овим тестом је испитана сагласност расподеле експерименталних података са теоријским моделом нормалне расподеле, Табела 6. На основу резултата тестирања може се закључити да подаци за ниво витамина В12 у крви следе нормалну расподелу ( $p > 0,05$ ) и да подаци о нивоу фолне киселине у крви и броју рецидива херпетичног кератитиса статистички врло значајно одступају од модела нормалне расподеле ( $p < 0,01$ ).

**Табела 6.** Статистички показатељи за анализирание карактеристике крви и број рецидива херпетичног кератитиса

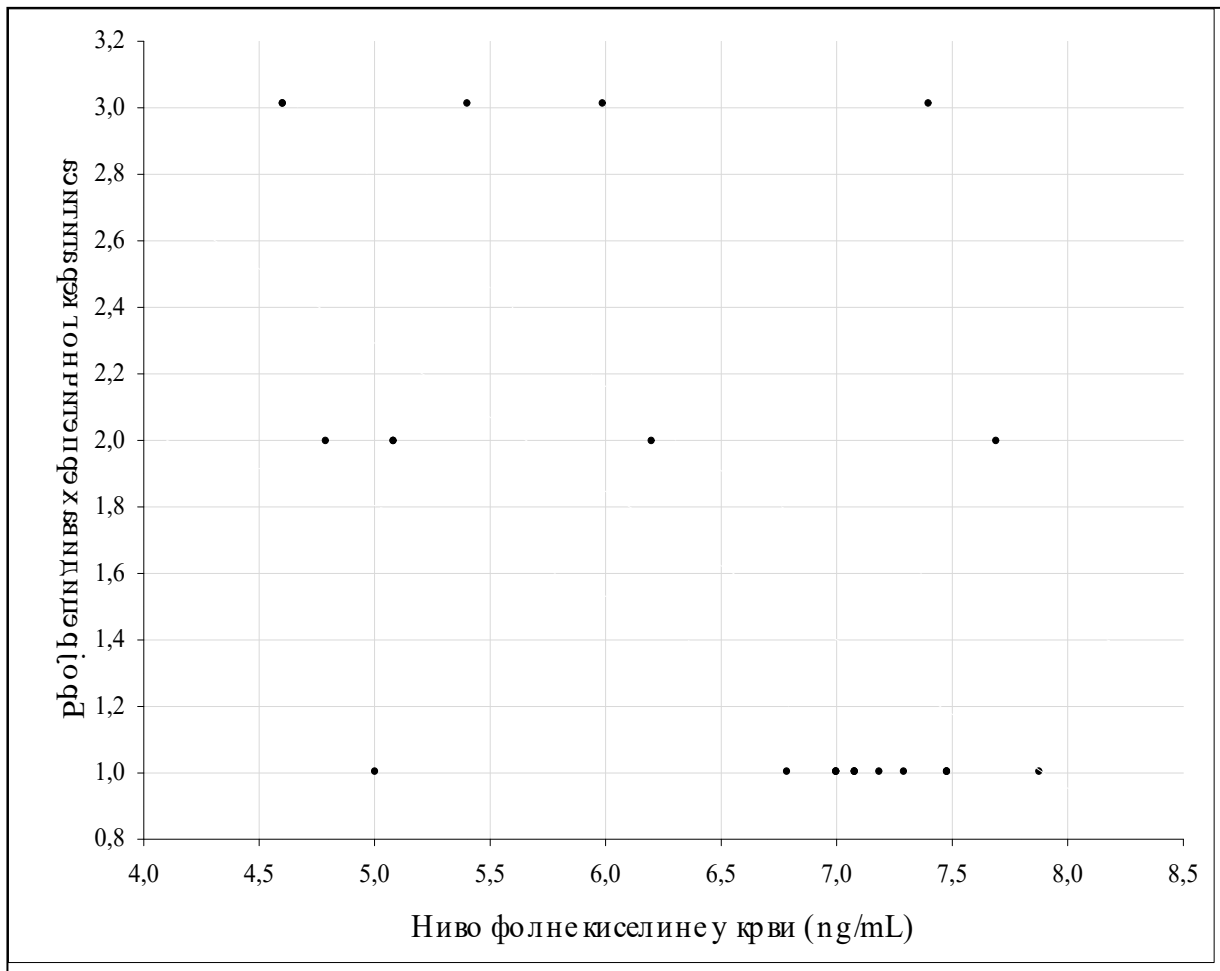
Варијабле	Интервал варијације	Аритмет. средина	Медијана	Стандардна грешка	Коеф. варијације (%)	Shapiro-Wilk's -тест	
						W	p
Ниво витамина В12 (ng/mL)	7,0-10,0	8,33	8,10	0,204	11,99	0,92	0,061
Ниво фолне киселине (ng/mL)	4,6-7,9	6,50	7,00	0,226	17,01	0,85	0,003
Број рецидива	1-3	1,63	1,00	0,168	50,72	0,71	<0,001

С обзиром да подаци за број рецидива херпетичног кератитиса нису хомогени и нису нормално дистрибуирани зависност ове појаве појединачно од нивоа витамина В12 и нивоа фолне киселине у крви испитана је преко Спирмановог коефицијента корелације ранга. На основу добијених вредности, број рецидива херпетичног кератитиса врло значајно зависи од нивоа витамина В12 у крви ( $r=-0,619$ ;  $t=3,694$ ;  $p=0,001$ ) и нивоа фолне киселине у крви ( $r=-0,518$ ;  $t=2,843$ ;  $p=0,009$ ). Негативне вредности Спирманових коефицијената корелације ранга указују да број рецидива херпетичног кератитиса опада са порастом нивоа витамина В12, као и са порастом и нивоа фолне киселине у крви, а то се види и на Графикону 1. и Графикону 2.





Графикон 1. Однос нивоа витамина В12 у крви и броја рецидива херпетичног кератитиса



**Графикон 2.** Однос нивоа фолне киселине у крви и броја рецидива херпетичног кератитиса

## 5. Дискусија

Вирус *Herpes simplex* тип 1 (HSV-1) је најчешћи вирусни патоген у светској популацији. Број заражених носиоца вируса стално расте и досеже чак 80-90% старијих од 50 година (64). У већини случајева ова инфекција пролази асимптоматски. После примарне инфекције вирус заувек остаје у организму утишан у најближим нервним ганглионима. Херпетични кератитис се јавља у различитим формама, а то највише зависи од дубине продора вируса у ткиво рожњаче. Већина случајева херпетичног кератитиса представља рекурентну болест, која је настала као резултат реактивације (HSV-1) вируса из латентности у најближим нервним ганглионима (65). Из тог разлога разумевање механизма латентности и побуђивања вируса, као и препознавање могућих узрочника, представља важну карику у разумевању настанка саме инфекције.

У нашој студији, полиморфизам гена *IL28B* (rs12979860) анализиран је код HSV-1 серопозитивних пацијената са историјом рекурентне HSV болести, укључујући HSV кератитис или херпес лабиалис. Генотип CTrs12979860 био је најчешћа варијација SNP-а код пацијената са рецидивирајућом HSV-ом болести, а потом следе генотипови CCrs12979860 и TTrs12979860. Занимљиво је да је већина пацијената са рецидивирајућим HSV стромалним кератитисом показала генотип CC (16 од 24, 66,7%), док је само 10 од 51 (19,6%) појединаца са лабијалном формом херпеса (без анамнезе рекурентних HSV очних болести) показало CC генотип.

*Griffiths* и сарадници износе податке да појединци са СТ или ТТ генотиповима за *IL28B* ген имају чешће епизоде тешког лабијалног херпеса, стања које је резултат реактивације HSV-1 (99). На основу тих налаза, аутори су сугерисали да су рекурентне инфекције HSV-а вероватно повезане са полиморфизмом *IL28B* гена што је једна од полазних тачака нашег истраживања.

У нашој студији резултати показују да су генотипови CTrs12979860 и TTrs12979860 били више распрострањени код појединаца са изолованим лабијалним херпесом.

Међутим ако посматрамо даље, CC генотип за *IL28B* био је високо повезан са рекурентним стромалним HSV кератитисом. Оно што примећујемо је да се можда и клиничка манифестација и место саме реактивације HSV-а из тригеминалних ганглија може повезати са различитим генотиповима домаћина, укључујући и друге факторе који утичу на генотип домаћина. Као што су микро окружење, епигеном домаћина, макро окружење, вирулетност вируса и утицај спољних фактора

Због тога је од највећег клиничког интереса идентификовати подгрупу пацијената са рекурентним лабијалним херпесом, који имају већи ризик за развој рекурентног херпетичног кератитиса, који може довести и до слепила.

Морамо указати на чињеницу да потпуни одговор на ово питање могу дати будуће студије са већим бројем учесника, како би се потврдила хипотеза да генотип домаћина за *IL28B* ген може утицати на клиничку манифестацију болести након HSV инфекције.

Код пацијената са хроничним хепатитисом C, профил генотипа CCrs12979860 повезан је са нижим нивоом транскрипције гена стимулираних интерфероном (ISG) (111, 112). Генотипови CTrs12979860 и TTrs12979860 су повезани са вишим нивоом експресије интерферон стимулишућих гена (ISG) у настанку хроничне инфекције хепатитисом C (111). Са друге стране генотипови CTrs12979860 и TTrs12979860 су повезани са нижим стопама спонтаног чишћења вируса хепатитиса C, што представља својеврсни парадокс (111, 112). Супротно томе, генотип CCrs12979860, у коме се примећује експресија ISG ниског нивоа, повезан је са високим стопама спонтаног чишћења вируса. Овај парадокс је тема даљих истраживања и није потпуно јасан (111).

Ако ове резултате повежемо са нашим истраживањем где је присуство варијанте CCrs12979860 генотипа доминатно код пацијената са рекурентним стромалним херпетичним кератитисом, може се закључити да можда управо CCrs12979860 генотип доводи до непотпуне контроле инфекције и испољавања инфекције услед нижег нивоа транскрипције ISG, као што је раније потврђено код пацијената са хроничном инфекцијом хепатитисом С (111, 112).

Студије са животињским моделима откриле су да генетски састав домаћина има утицај на тежину HSV-1 болести рожњаче. Доказано је да се мишеви-*inbred* разликују у својој осетљивости на HSV инфекцију рожњаче (113). Међутим у свим тим истраживањима улога специфичних гена домаћина у отпорности на рекурентни херпетични кератитис није довољно разумљива.

Гени домаћина свакако да могу утицати на исход и тежину HSV-1 инфекције утичући на урођене факторе резистенције, као и на функцију имунског система и његову реакцију на различите патогене (114). Потпуно јасно је доказано да је осетљивост на инфекцију HSV-1 модулисана или зависна од полиморфизма у генима који контролишу ефекторске функције цитотоксичних Т-ћелија и лимфоцита NK ћелија (*Natural killer cells*), природних убица (115).

Бројне студије су истраживале однос између полиморфизама гена домаћина и озбиљности рецидива HSV-1 инфекције (99, 114, 115). У том контексту, недавно је објављено да је експресија гена IFN- $\lambda$  повезана са рецидивом и озбиљношћу рекурентне HSV-1 болести (99).

Откривено је да интерферони типа III (IFN- $\lambda$ ) имају антивирусне ефекте против HSV-1 инфекције (116, 117). Pica и сарадници извештавају да смањена производња интерферона-ламбда може бити у корелацији са развојем рекурентних HSV-1 лабијалних инфекција код имунокомпетентних појединаца (52).

Недавно истраживање известило је да је лечење интерферонима- $\lambda$  резултирало значајним сузбијањем репликације HSV-1 у астроцитима и у неуронима. Ово истраживање је повезано са регулацијом ендogene функције интерферона- $\alpha/\beta$  и неколико интерферон стимулираних гена (ISG) (98). Ови налази показују да интерферон- $\lambda$  функционално подсећа на интерфероне типа I, изазивајући ISG експресију што резултира сузбијањем вирусне репликације (99).

Имунска контрола реактивације HSV-1 вируса је јако важна и она мора бити узета у обзир када се говори о реактивацији и латенцији HSV-1 вируса. Спољни и физиолошки надражаји који индукују HSV-1 вирус из латенције укључују многе факторе: излагање УВ светлости, стрес и имунску супресију, што сугерише јако важну улогу Т-ћелија у спречавању реактивације HSV-1 вируса (118).

Понављајући стромални херпетични кератитис препознат је као најчешћи инфективни узрочник оштећења вида који доводи до ожиљавања рожњаче у развијеном свету (119). Сходно томе велику пажњу у нашој студији смо посветили пацијентима који имају рекурентни стромални HSV кератитис. У нашем истраживању сви пацијенти са херпетичним кератитисом имали су тежак облик стромалног кератитиса са опсежним ожиљавањем на рожњачи и значајним смањењем видне оштрине. У том смислу, група је веома хомогена.

Упални процес који настаје због дејства различитих Т-ћелије и других инфламаторних ћелија доводе до хроничног имунског одговора који оштећује ткиво рожњаче у свим њеним структурама. Поред директних вирусних ефеката ту су и фактори инфилтрације неутрофила који подстичу васкуларизације у рожњачи (119).

Вирус HSV-1 се понаша врло интелигентно у телу домаћина, правећи баланс између имунске реакције домаћина и сопствене потребе за репликацијом.

Сам вирус се понаша као домаћин у ћелијама домаћина, односно када „угради” свој ДНК у ћелије домаћина, „ресурси” ћелије домаћина се не троше, и не дозвољава се исцрљивање ћелије од стране других патогена који могу бити велики терет за опстанак ћелије. Генотип домаћина или његов имунски одговор на саму инфекцију представља и резултат симбиозе коју вирус и домаћин направе. Неколико ствари утиче и на број репликација самог вируса, то су: фактори средине, природа вируса и природа домаћина (80, 82, 84). Када су ове три компоненте у складу, односно нико није доминантан, чини се да је вирус тада део механизма који штити домаћина од других патогена.

Где и у каквом облику ће се вирус појавити зависи понајвише од природе домаћина. Када говоримо о вирулентности самог вируса, вирус има своје особености, које је јако тешко квантификовати. Како је сама природа вируса непредвидива нејасно је који ће пут изабрати за своје клиничко испољавање.

У фази латенције сам вирус се труди да не наруши нормалан физиолошки процес у ћелији. Суштина механизма реактивације и латенције вируса је резултат епигенетске природе вируса, генетике вируса, генетике домаћина и утицаја спољних фактора. Све ово заједно даје један сложен механизам активације и реактивације који је сигурно повезан са још неколико фактора који још нису откривени у савременој вирусологији.

Ова студија је спојила неколико фаза које су повезане са активацијом и реактивацијом вируса. Прво повезали смо генетске особине домаћина-односно генотип са појавом болести, а друго по први пут смо повезали могуће епигенетске спољне факторе за

активацију и реактивацију вируса. Свакако нисмо дали потпун одговор али смо апострофирали полазне тачке које могу дати коначне одговоре за поменути механизам.

Чини се да сам механизам реактивације није толико сложен колико је сложен однос између фактора који доводе до реактивације. Сваки појединачни елемент има своју улогу. Спољни утицај, природа вируса и особине домаћина су елементи који се доминатно појављују у механизму, али су некад мање или више доминатни што има за последицу различите облике херпетичног кератитиса.

Дубина продора вируса у ткиво рожњаче, а касније и имунска реакција на присуство вируса, су елементи који су већ последица поменутог механизма. Елементи који доводе до реактивације су заслужни у негативном смислу за појаву болести, али не појединачним утицајем, него заједничким доминатним утицајем у појединим фазама болести. Разумевање ових елемената доводи до основног мотива за ово истраживање а то је превенција херпетичног кератитиса. Витамин В12 и фолна киселина су можда полазне тачке за ову тезу. Генотип домаћина је део тог мозаика и представља основ за превенцију код пацијената који могу да развију неки облик рекурентног херпетичног кератитиса.

Све је више студија које потврђују епигенетску регулацију реактивације вируса, пре свега чињеницом да вирусни геном има транскрипционо активан латентни регион (*Latency-Associated Transcript- LAT*).

Активност LAT-региона је усмерена на хроматинско уређење без кодирања протеина, односно нема вирусних протеина које препознаје наш имуни систем. И витамин В12 и фолна киселина су укључени у процес метилације молекула ДНК. Метилација молекула ДНК повезана је са уносом и концентрацијом фолата у организму (79). Бољи увид у епигенетску природу самог вируса могао би бити користан за контролу реактивације HSV-1 инфекције, коришћењем додатних суплемената код пацијената код којих постоји већи ризик од рецидива болести.



Занимљиво је да је студија случаја из 1956. године, која није узела у обзир епигенетску природу реактивације вируса, показала да додаток витамина В12 значајно побољшава клиничку слику херпетичног кератитиса (120). Пацијенти из ове студије су имали блажу клиничку слику и лакши ток рекурентног херпетичног кератитиса (120, 121).

Закључујемо да можда реактивација вируса из латентне фазе болести у активну HSV-1 инфекцију може зависити од минималног недостатка витамина В12 или фолне киселине.

У нашој студији, сви пацијенти су имали ниже референтне вредности ових витамина у акутној фази болести. Ово је важно истаћи, јер ниже референтне вредности можда могу бити потенцијални окидачи за реактивацију вируса и теже клиничке манифестације херпетичног кератитиса.

Неколико студија је показало сличне резултате са другим вирусима. Занимљиво је истраживање *Piyathilake* и сарадника у коме су проценили утицај концентрације витамина В12 на ризик за настанак карцинома грлића материце. Закључили су да фолати и витамин В12 могу имати важну улогу у снижавању ризика повезаних са метилацијом HPV 16 вируса и развоја лезија (122).

Слично истраживање спроводе *Lopes* и сарадници. Они откривају да је унос витамина В12 обрнуто повезан са присутношћу онкогеног HPV-а (123).

Нова студија *Šlebioda Z* и сарадника из 2018 године открива да се понављајући афтозни стоматитис, укључујући херпетичну етиологију, јасно повезује са недостатком витамина В12 (124).

Имунска контрола реактивације вируса је јако важна. У складу са тим, студије на кунџима и мишевима јасно показују да су Т-ћелије инфилтриране у сензорни неурон очне регије око 8 до 10 дана након инфекције рожњаче и да остају на том месту и после престанка активности вируса, односно његове репликације (125, 126).

Вирус не ствара протеине у периоду латенције и тако се „скрива“ од имуног система домаћина. Није јасно шта одржава везу између имунских ћелија као што су CD8 Т-ћелија, и латентно инфицираних неурона. У овом тренутку дефиниција појмова „латенција“ и „реактивација“ је важна јер се вирус може спорадично активирати манифестујући различите клиничке слике у односу на место активације (127).

Као што је наведено до сада, латенција асимптоматског вируса може бити повезана са епигенетском природом вируса (73). У нашој студији ниже референтне вредности фолне киселине и витамина В12 јасно су повезане са вишом стопом понављајућег херпетичног кератитиса. Закључујемо да епигенетска природа HSV-1 вируса можда утиче на појаву рекурентног херпетичног кератитиса. Будуће клиничке и молекуларне епигенетске студије су неопходне да би се ово додатно разјаснило.

Виши ниво познавања епигенетске природе вируса нам даје одговор на важност употребе додатне суплементације у лечењу и превенцији рецидива херпетичног кератитиса. У нашој студији повезујемо те две ствари, боље познавање епигенетске природе HSV-1 вируса и могућност да објаснимо важност примене доказаних епигенетских модификатора молекула ДНК.

Намеће се јасно питање колико је важно са епигенетске стране модификовати молекул ДНК са доказаним донорима метилних група као што су витамин В12 и фолна киселина? Потребе организма у акутној фази херпетичног кератитиса могу бити условљене минималним недостацима витамина В12 и фолне киселине. Закључујемо да додатна суплементација витамином В12 и фолном киселином код пацијената који имају херпетични кератитис, уз стандардну антивирусну терапију, може довести до смањења последица реактивације HSV-1 вируса у оку. И оно што је важно ово је основ за могућу превенцију реактивације самог вируса, узимањем суплемената фолне киселине и витамина В12 пре, у току, и након манифестације херпетичног кератитиса.

Епигенетске промене у молекулу ДНК су важне за људски организам, а основ тих промена су измене повезане са експресијом гена без утицаја на примарну структуру молекула ДНК. Неколико промена чине епигенетску регулацију ДНК молекула, као што су метилација ДНК молекула, хистонске промене у молекулу ДНК и друге хроматинске промене (88).

Модел по којем се епигеном мења је делом наследан, а делом зависи од начина живота појединца. Промене епигенома су под великим утицајем спољне средине, што резултира променама у активностима гена односно експресији гена (88).

Те промене могу довести до промена у фенотипском изгледу појединца, без неког великог утицаја или до великих структурних промена у ћелији и развоја малигних ћелија. Храна се може понашати као доказани епигенетски модулатор. Различити циклуси доводе до промена у епигеному који могу бити повезани са недостатком неких елемената у исхрани појединца (88). У нашој студији минимални недостатак витамина В12 и фолне киселине може довести до промена у епигеному, које су важне за настанак херпетичног кератитиса.

Јако је тешко прецизно одредити утицај неке супстанце на епигеном, али су доказани модулатори молекула ДНК одговорни за експресију гена и имунски одговор на одређени патоген.

Рекуретни херпетични кератитис је болест која је узрокована вирусом HSV-1 у највећем броју случајева. Овај вирус је епигенетски завијан у смислу реактивације.

Епигеном домаћина је битан елемент у реактивацији вируса и појави рекуретног херпетичног кератитиса.

## 6. Закључци

На основу добијених резултата дошли смо до следећих закључака:

1. Колико је нама познато ово је прво истраживање које повезује генотип *IL28B* гена и рекурентни стромални херпетични кератитис (HSK).
2. Резултати наше студије показују да се клиничка манифестација рекурентне HSV-1 инфекције може повезати са полиморфизмом *IL28B* гена.
3. Генотип CTrs12979860 је најчешћа варијација SNP код пацијената са рецидивирајућом HSV болешћу, затим следе генотипови CCrs12979860 и TT rs12979860.
4. Иако су генотипови CTrs12979860 и TTrs12979860 чешће изоловани код појединаца са лабијалним херпесом, HSV-серопозитивни појединци који изражавају CC rs12979860 генотип имају тенденцију ка развоју рекурентног стромалног херпетичког кератитиса.
5. Ово је прва студија која је истраживала потенцијалну повезаност улоге витамина B12 и фолне киселине у реактивацији HSV кератитиса.
6. Сви пацијенти су у акутној фази болести имали ниже референтне вредности витамина B12 и фолне киселине.
7. Број рецидива херпетичног кератитиса је био нижи код пацијената са вишим нивоом витамина B12 у крви и фолне киселине у акутној фази болести.
8. Реактивација вируса HSV-1 може бити повезана са минималним недостатком витамина B12 и фолне киселине током латентне фазе болести због епигенетске природе HSV-1 вируса.

## 7. Попис ознака и скраћеница

HSV-1 - херпес симплекс вирус тип 1  
CD4 T - помоћне Т ћелије имуног система  
PCR - ланчана реакција полимеразе  
Th1 - помоћне Т ћелије имуног система  
IFN- $\gamma$  - интерферон гама  
IL-2 - интерлеукин 2  
T-bet - фактор транскрипције  
Th17 - помоћне Т ћелије имуног система  
ROR- $\gamma$  - транскрипцијски фактор  
IL-17 - интерлеукин 17  
IL-21 - интерлеукин 21  
IL-22 - интерлеукин 22  
IL-6 - интерлеукин 6  
IL-8 - интерлеукин 8  
CXCL-1 - хемотактичких фактора  
CD8 T - помоћне Т ћелије имуног система  
HSK - херпес симплекс кератитис  
VZV - варицела зостер вирус  
HSV-2 - херпес симплекс вирус тип 2  
CMV - цитомегаловирус  
EBV - Epstein-Barr вирус  
HHV-6 - хумани херпес вирус 6  
HHV-7 - хумани херпес вирус 7  
HHV-8 - хумани херпес вирус 8  
LAT - транскриптивно активни регион  
*BCRF1*- ген Epstein-Barr вируса  
PABA - p-амино-бензојева киселина  
L-(+) - глутаминска киселина  
IL-28B - интерлеукин 28B

IL-28A - интерлеукин 28A

IL-29 - интерлеукин 29

IFN- $\lambda$ 1 - интерферон  $\lambda$ 1

IFN- $\lambda$ 2 - интерферон  $\lambda$ 2

IL-10 - интерлеукин 10

IFN- $\alpha/\beta$  интерферон  $\alpha/\beta$

28R $\alpha$ /IL-10R $\beta$  хетеродимерни комплекс

IFN- $\lambda$  - интерферон ламбда

ISG - интерферон стимулирани гени

Th2 - помоћне Т ћелије имуног система

Tr1 - регулаторне Т ћелије имуног система

TQM - систем квалитета

HWE - Hardy-Weinberg еквилибријум

NK - ћелије лимфоцити природне убице

HPV - хумани папилома вирус

SNP - полиморфизам појединачног нуклеотида

SSP-PCR - специфична ланчана реакција прајмера и полимеразе

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

РНК - рибонуклеинска киселина

## 8. Списак слика, табела и графикана

### Слике:

Слика 1. Хистолошки пресек рожњаче .....	10
Слика 2. Шема транспорта HSV-1 вируса из латентне фазе у рецидив.....	15
Слика 3. HSV-1 инфекција рожњаче код мишева.....	17
Слика 4 . Хистопатолошки пресек рожњаче зараженог миша.....	19
Слика 5. Рекурентни херпетични кератитис са васкуларизованим променама на рожњачи. .....	22
Слика 6. HSV-1 организација генома.....	26
Слика 7. Тригеминални ганглион (TG) латентно инфицираних мишева садржи вирусни геном.....	29
Слика 8. Вирусна епигенетска регулација реактивације.....	33
Слика 9. Хемијска структура фолне киселине .....	34
Слика 10. Хемијска структура витамина B12.....	35
Слика 11. IFN- $\lambda$ 1 и IFN- $\lambda$ 2 инхибирају експресију протеина HSV-1 вируса у хуманим астроцитима и неуронима.....	38
Слика 12. Садржај и структура <i>IL28B</i> гена, rs12979860 3 kbp узводно од <i>IL28B</i> гена.....	39
Слика 13. Полиморфизам rs12979860.....	47
Слика 14. Дистрибуција <i>IL28B</i> rs12979860 генотипа у целокупној студијској популацији.....	51
Слика 15. Дистрибуција генотипова <i>IL28B</i> према клиничкој манифестацији рекурентног стромалног HSV кератитиса.....	53

**Табеле:**

Табела 1. Нуклеотидне секвенце прајмера коришћених у нашој студији за <i>IL28B</i> .....	46
Табела 2. Демографске карактеристике популације.....	49
Табела 3. Дистрибуција генотипа за испитивани полиморфизам и Hardy-Weinberg еквilibријум.....	50
Табела 4. Дистрибуција <i>IL28B</i> rs12979860 генотипа у целој студијској групи.....	52
Табела 5. Јачина асоцијације генотипа СС, ТТ и појаве рекуретног стромалног херпетичног кератитиса. ....	54
Табела 6. Статистички показатељи за анализиране карактеристике крви и број рецидива херпетичног кератитиса.....	56

**Графикони:**

Графикон 1. Однос нивоа витамина В12 у крви и броја рецидива херпетичног кератитиса .....	57
Графикон 2. Однос нивоа фолне киселине у крви и броја рецидива херпетичног кератитиса .....	58



---

## 9. ЛИТЕРАТУРА

1. Kanski JJ. *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach: Expert Consult: Online and Print*, 8e. Saunders, Elsevier Limited, 2015.
2. <http://www.images.missionforvisionusa.org/anatomy/2005/10/cornea-histology.html>
3. Stevenson W, Cheng SF, Dastjerdi MH, Ferrari G, Dana R. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: ranibizumab (Lucentis) vs bevacizumab (Avastin). *Ocul Surf.* 2012;10(2):67-83.
4. Perez VL, Saeed AM, Tan Y, Urbietta M, Cruz-Guilloty F. The eye: A window to the soul of the immune system. *J Autoimmun.* 2013;45:7-14.
5. Yoon JJ, Ismail S, Sherwin T. Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis. *World J Stem Cells.* Sep 26, 2014; 6(4): 391-403
6. Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD, Coulombre JL, Coulombre AJ. Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res.* 1979;29(1):27-43.
7. Streilein JW, Niederkorn JY. Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med.* 1981;153(5):1058-1067
8. Cerovski B, Jukić T, Juratovac Z, Juri J, Kalauz M, Katušić D i sur. *Oftalmologija-udžbenik za studente medicine.* Zagreb 2012.
9. Cvetković D, Golubović S, Hentova-Senčanić P, Ignjačev M, Jovanović M, Kontić Đ, et al. Sočivo. In: Slobodan G, editor. *Oftalmologija.* 1st ed. Beograd: Univerzitet u Beogradu- Medicinski fakultet; 2010. p. 1–377.
10. Krachmer, J.H., Mannis, M.J. and Holland, E.J. (2011) *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management.* 3rd Edition, Elsevier Inc., New York, 1121-1122.

11. Bertke AS, Patel A, Krause PR. Herpes simplex virus latency-associated transcript sequence downstream of the promoter influences type-specific reactivation and viral neurotropism. *Journal of virology* 81.12 (2007): 6605-6613.
12. Branco FJ, Fraser NW. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript expression protects trigeminal ganglion neurons from apoptosis. *Journal of virology* 79.14 (2005): 9019-9025.
13. Dixit R, Tiwari V, Shukla D. Herpes simplex virus type 1 induces filopodia in differentiated P19 neural cells to facilitate viral spread. *Neurosci Lett.* 2008;440:113–118.
14. Ghiasi H, Cai S, Perng GC, et al. Both CD4+ and CD8+ T cells are involved in protection against HSV-1 induced corneal scarring. *Br J Ophthalmol.* 2000;84:408–412.
15. LaVail JH, Tauscher AN, Aghaian E, et al. Axonal transport and sorting of herpes simplex virus components in a mature mouse visual system. *J Virology.* 2003;77:6117–6126.
16. Leib DA, Coen DM, Bogard CL, et al. Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. *J Virology.* 1989;63:759–768.
17. Lilley CE, Carson CT, Muotri AR, et al. DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:5844–5849.
18. Perng G, Jones C, Ciacci-Zanella J, et al. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science.* 2000;287:1500–1503.
19. Zheng X. Reactivation and donor-host transmission of herpes simplex virus after corneal transplantation. *Cornea.* 2002;21(suppl 7):S90–S93.
20. Zwaagstra JC, Ghiasi H, Nesburn AB, et al. Identification of a major regulatory sequence in the latency associated transcript (LAT) promoter of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) *Virology.* 1991;182:287–297.

21. Farooq AV, Shukla D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. *Survey of ophthalmology* 57.5 (2012): 448-462.
22. Gordon YJ, Romanowski E, Araullo-Cruz T, McKnight JL. HSV-1 corneal latency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:663–665.
23. McGraw HM, Awasthi S, Wojcechowskyj JA, et al. Anterograde spread of herpes simplex virus type 1 requires glycoprotein E and glycoprotein I but not US9. *J Virol.* 2009;83:8315–8326.
24. Morris DJ, Cleator GM, Klapper PE, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in donor cornea culture medium by polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol.* 1996;80:654–657.
25. Polcicova K, Biswas PS, Banerjee K, et al. Herpes keratitis in the absence of anterograde transport of virus from sensory ganglia to the cornea. *Proc Nat Acad Sci.* 2005;102:11462–11467.
26. Remeijer L, Maertzdorf J, Doomenbal P, et al. Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation. *Lancet.* 2001;357:442.
27. Robert P, Adenis J, Denis F, et al. Herpes simplex virus DNA in corneal transplants: prospective study of 38 recipients. *J Med Virol.* 2003;71:69–74.
28. Shimomura Y, Deai T, Fukuda M, et al. Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome. *Cornea.* 2007;26:190–193.
29. Rowe AM, Leger AJ, St, Jeon S, Dhaliwal DK, Knickelbein JE, Hendricks RL. Herpes keratitis. *Prog Retin Eye Res.* (2013) 32:88–101.
30. Gimenez F, Suryawanshi A, Rouse BT. Pathogenesis of herpes stromal keratitis—a focus on corneal neovascularization. *Prog Retin Eye Res.* (2013) 33:1–9.
31. Park PJ, Chang M, Garg, N, Zhu, J, Chang, JH, & Shukla D. Corneal lymphangiogenesis in herpetic stromal keratitis. *Survey of ophthalmology,* (2015) 60(1), 60-71.

32. Rajasagi NK, Rouse BT. Application of our understanding of pathogenesis of herpetic stromal keratitis for novel therapy. *Microbes Infect.* (2018) 20:526–30.
33. Biswas PS, Rouse BT. Early events in HSV keratitis—setting the stage for a blinding disease. *Microbes Infect.* (2005) 7:799–810.
34. Doymaz MZ, Rouse BT. Herpetic stromal keratitis: an immunopathologic disease mediated by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (1992) 33:2165–73.
35. Thomas J, Gangappa S, Kanangat S, Rouse BT. On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis. *J Immunol.* (1997) 158:183.
36. Daheshia M, Kanangat S, Rouse BT. Production of key molecules by ocular neutrophils early after herpetic infection of the cornea. *Exp Eye Res.* (1998) 67:619–24.
37. Epstein RJ, Hendricks RL, Stulting RD. Interleukin-2 induces corneal neovascularization in A/J mice. *Cornea.* (1990) 9:318–23.
38. Hendricks RL, Tumpey TM, Finnegan A. IFN-gamma and IL-2 are protective in the skin but pathologic in the corneas of HSV-1-infected mice. *J Immunol.* (1992) 149(9):3023-8.
39. Gangappa S, Deshpande SP, Rouse BT. Bystander activation of CD4<sup>+</sup> T cells accounts for herpetic ocular lesions. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2000, 41.2: 453-459.
40. Tang Q, Hendricks RL. Interferon gamma regulates platelet endothelial cell adhesion molecule 1 expression and neutrophil infiltration into herpes simplex virus-infected mouse corneas. *J Exp Med.* (1996) 184:1435–47.
41. Tang Q, Chen W, Hendricks RL. Proinflammatory functions of IL-2 in herpes simplex virus corneal infection. *J Immunol.* (1997) 158:1275–83.
42. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* (2009) 27:485–517.

43. Suryawanshi A, Veiga-Parga T, Rajasagi NK, Reddy PB, Sehrawat S, Sharma S, et al. Role of IL-17 and Th17 cells in herpes simplex virus-induced corneal immunopathology. *J Immunol.* (2011) 187:1919–30.
44. Suryawanshi A, Veiga-Parga T, Reddy PB, Rajasagi NK, Rouse BT. IL-17A differentially regulates corneal vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and soluble VEGF receptor 1 expression and promotes corneal angiogenesis after herpes simplex virus infection. *J Immunol.* (2012) 188:3434–46.
45. Hendricks RL, Tumpey TM. Contribution of virus and immune factors to herpes simplex virus type I-induced corneal pathology. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (1990) 31:1929–39.
46. Mott KR, Perng GC, Osorio Y, Kousoulas KG, Ghiasi H. A recombinant herpes simplex virus type 1 expressing two additional copies of gK is more pathogenic than wild-type virus in two different strains of mice. *J Virol.* (2007) 81:12962–72.
47. Jaggi U, Wang S, Tormanen K, Matundan H, Ljubimov AV, Ghiasi H. Role of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Glycoprotein K (gK) Pathogenic CD8(+) T Cells in Exacerbation of Eye Disease. *Front Immunol.* (2018) 9:2895.
48. Saied AA, Chouljenko VN, Subramanian R, Kousoulas KG. A replication competent HSV-1(McKrae) with a mutation in the amino-terminus of glycoprotein K (gK) is unable to infect mouse trigeminal ganglia after cornea infection. *Curr Eye Res.* (2014) 39:596–603.
49. Zhu J, Peng T, Johnston C, Phasouk K, Kask AS, Klock A, et al. Immune surveillance by CD8 $\alpha$  $\alpha$ <sup>+</sup> skin-resident T cells in human herpes virus infection. *Nature.* (2013) 497:494–7.
50. Knickelnein JE, Hendricks RL, Charukamnoetkanok P. Management of Herpes Simplex Virus stromal keratitis: an evidence-based review. *Surv Ophthalmol.* 2009;54(2):226-43.
51. Shtein RM, Garcia DD, Musch DC, Elner VM. Herpes simplex virus keratitis: histopathologic inflammation and corneal allograft rejection. *Ophthalmology.* 2009;116(7): 1301-5.

52. Pica F, Volpi A, Gaziano R, Garaci E. Interferon-lambda in immunocompetent individuals with a history of recurrent herpes labialis. *Antivir Ther* (2010); 15(5):737–43.10.3851/IMP1610.
53. Kimberlin DW. Neonatal Herpes Simplex. *Infection. Clin Microbiol Rev.* 2004 Jan; 17(1): 1–13.
54. Jeffrey D, Welder MD, Anna S, Kitzmann MD, Michael D, Wagoner MD. Herpes Simplex Keratitis eye (OS) (2012);20, 25-1.
55. Knickelbein JE, Beula KA, Hendricks RL. Herpes stromal keratitis: Erosion of ocular immune privilege by herpes simplex virus. *Future Virol* 2010;5(6):699-708.
56. Verjans GM, Remeijer L, van Binnendijk RS, et al. Identification and characterization of herpes simplex virus-specific CD4+ T cells in corneas of herpetic stromal keratitis patients. *J Infect Dis* 1998;177(2):484-8.
57. Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, et al. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: Autoimmune disease after viral infection. *Science* 1998;279(5355):1344-7.
58. Rolinski J, Hus I. Immunological aspects of acute and recurrent herpes simplex keratitis. *J Immunol Res.* 2014; 2014: 513560.
59. Austin A, Lietman T, Rose-Nussbaumer J. Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology* , Vol 124(11), (2017) 1678 – 1689.
60. Young RC, Hodge DO, Liesegang TJ, Baratz KH. Incidence, recurrence, and outcomes of herpes simplex virus eye disease in Olmsted County, Minnesota, 1976–2007: the effect of oral antiviral prophylaxis. *Arch Ophthalmol.* 2010;128:1178–1183.
61. Labetoulle M, Auquier P, Conrad H, Crochard A, Daniloski M, Bouee S, El Hasnaoui A, Colin J. Incidence of herpes simplex virus keratitis in France. *Ophthalmology.* 2005;112:888–895.
62. Darougar S, Wishart MS, Viswalingam ND. Epidemiological and clinical features of primary herpes simplex virus ocular infection. *Br J Ophthalmol.* 1985;69:2–6.

63. Lairson DR, Begley CE, Reynolds TF, et al. Prevention of herpes simplex virus eye disease: a cost-effectiveness analysis. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:108–112.
64. Liesegang TJ, Melton LJ, Daly PJ, et al. Epidemiology of ocular herpes simplex: incidence in Rochester, Minn, 1950 through 1982. *Arch Ophthalmol.* 1989;107:1155–1159.
65. Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea.* 2001;20(1):1-13.
66. Knickelnein JE, Hendricks RL, Charukannoetkanok P. Management of Herpes Simplex Virus stromal keratitis: an evidence-based review. *Surv Ophthalmol.* 2009;54(2):226-43.
67. Macdonald SJ, Mostafa HH, Morrison LA, Davido DJ. Genome sequence of herpes simplex virus 1 strain KOS. *Journal of virology.* 2012;86(11):6371–2. pmid:22570244; PubMed Central PMCID: PMC3372216.
68. Roizman B, Whitley RJ. An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. *Annu Rev Microbiol.* (2013) 67:355–74.
69. Goins WF, Krisky DM, Wechuck JB, Huang S, Glorioso JC. Construction and production of recombinant herpes simplex virus vectors. *Gene Therapy Protocols* (2008);97-103.
70. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature.* 2008;454:780–783.
71. Bertke AS, Swanson SM, Chen J, Imai Y, Kinchington PR, Margolis TP. A5-positive primary sensory neurons are nonpermissive for productive infection with herpes simplex virus 1 in vitro. *J Virol.* 2011;85:6669–6677.
72. Yang L, Voytek CC, Margolis TP. Immunohistochemical analysis of primary sensory neurons latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2000;74:209–217.
73. Bloom DC, Giordani NV, Kwiatkowski DL. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799:246–256.

74. Cliffe AR, Garber DA, Knipe DM. Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *J Virol.* 2009; 83: 8182–8190.
75. Nicholas J. Human gamma herpes virus cytokines and chemokine receptors. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25:373–83.
76. Jochum S, Moosmann A, Lang S, Hammerschmidt W, Zeidler R. The EBV immunoevasins vIL-10 and BNLF2a protect newly infected B cells from immune recognition and elimination. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002704.
77. Fishman JA. Overview: cytomegalovirus and the herpesviruses in transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13(Suppl 3):1–8.
78. Barton ES, White DW, Cathelyn JS, Brett-McClellan KA, Engle M, Diamond MS, et al. Herpes virus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature.* 2007;447:326–9.
79. Sawtell, NM, and Thompson RL. Herpes simplex virus and the lexicon of latency and reactivation: a call for defining terms and building an integrated collective framework. *F1000 Research* 5 (2016).
80. Sawtell NM, Thompson RL. Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol.* 1992;66:2150–6.
81. Worrall G. Herpes labialis. *Clin Evid.* 2009;9:1704.
82. Wilson AC, Mohr I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Trends Microbiol.* 2012;20:604–11.
83. Kobayashi M, Wilson AC, Chao MV, Mohr I. Control of viral latency in neurons by axonal mTOR signaling and the 4E-BP translation repressor. *Genes Dev.* 2012;26:1527–32.
84. St Leger AJ, Hendricks RL. CD8+ T cells patrol HSV-1-infected trigeminal ganglia and prevent viral reactivation. *J Neurovirol.* 2011;17:528–34.



85. Stowe RP, Kozlova EV, Yetman DL, Walling DM, Goodwin JS, Glaser R. Chronic herpesvirus reactivation occurs in aging. *Exp Gerontol.* 2007;42:563–70.
86. Stowe RP, Mehta SK, Ferrando AA, Feedback DL, Pierson DL. Immune responses and latent herpes virus reactivation in spaceflight. *Aviat Space Environ Med.* 2001;72:884–91.
87. Balakrishnan, L, Barry M. Epigenetic regulation of viral biological processes. *Viruses* 9.11 (2017): 346.
88. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC, Nutrition and epigenetic: An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism, and DNA methylation. *J Nutr Biochem.* 2012 Aug; 23(8): 853–859.
89. Živanović V, Kostić D, *Osnovi biohemije*, PMF Niš, 2008.
90. Milman N. Intestinal absorption of folic acid - new physiologic & molecular aspects. *Indian J Med Res.* 2012 Nov; 136(5): 725–728.
91. Structural details for vitamin B12, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitamin-B12>.
92. Linus Pauling Institute Micronutrient Information Center, Higdon J.: Vitamin B12, <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-B12>.
93. Hochrein H, Schlatter B, O’Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M, Wagner H. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- $\alpha$  production via Toll-like receptor 9-dependent and-independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 11416–11421.
94. Leib DA. Counteraction of interferon-induced antiviral responses by herpes simplex viruses. In *Viral Proteins Counteracting Host Defenses*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2002; pp. 171–185.

95. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 2003, 4, 69–77.
96. Uzé, G, Monneron D. IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie* 2007, 89, 729–734.
97. Srinivas S, Dai J, Eskdale J, Gallagher GE, Megjugorac, NJ, Gallagher G. Interferon- $\lambda$ 1 (interleukin-29) preferentially down-regulates interleukin-13 over other T helper type 2 cytokine responses in vitro. *Immunology* 2008, 125, 492–502.
98. Li J, Hu S, Zhou L, Ye L, Wang X, Ho J, Ho W. Interferon lambda inhibits herpes simplex virus type I infection of human astrocytes and neurons. *Glia* 2011, 59, 58–67.
99. Griffiths, SJ, Koegl M, Boutell C, Zenner HL, Crump CM, Pica F, Gonzalez O, Friedel CC, Barry G, Martin K. et al. A systematic analysis of host factors reveals a Med23-interferon- $\lambda$  regulatory axis against herpes simplex virus type 1 replication. *PLoS Pathog.* 2013, 9, e1003514.
100. Ge D1, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009, 461, 399–401.
101. Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, Nischalke HD, Nattermann J, Oldenburg J, Sauerbruch T, Spengler U. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *J. Hepatol.* 2011, 54, 859–865.
102. Jaggi U, Bhela S, Rouse BT, Role of Interferon lambda (IL-28A) in Herpes Stromal Keratitis. *J. Immunol. Res. Ther.* 2018, 3, 135–144.
103. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:635–73.
104. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+ CD4+ Tr cells. *Blood.* 2005;105:1162–9.

105. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6:1123–32.
106. Jordan WJ, Eskdale J, Srinivas S, Pekarek V, Kelner D, Rodia M, Gallagher G. Human interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) modulates the Th1/Th2 response. *Genes Immun.* 2007;8:254–61.
107. Pekarek V, Srinivas S, Eskdale J, Gallagher G. Interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29) induces ELR(-) CXC chemokine mRNA in human peripheral blood mononuclear cells, in an IFN-gamma-independent manner. *Genes Immun.* 2007;8:177–80.
108. Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum Genomics.* 2010; 5(1): 30–55.
109. Balagopal A, Thomas DL, and Thio CL. "IL28B and the control of hepatitis C virus infection." *Gastroenterology* 139.6 (2010): 1865-1876.
110. Hori K, Shin WS, Hemmi C, Toyo-oka T, Makino T. High fidelity SNP genotyping using sequence-specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2003, 4, 477–484.
111. Abe H, Hayes CN, Ochi H, Maekawa T, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S. et al. IL28 variation affects expression of interferon stimulated genes and peg-interferon and ribavirin therapy. *J. Hepatol.* **2011**, 54, 1094–1101.
112. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y. et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010, 139, 499–509.
113. Metcalf JF, Michaelis BA. Herpetic keratitis in inbred mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1984, 25, 1222–1225.

114. Brandt CR. The role of viral and host genes in corneal infection with herpes simplex virus type 1. *Exp. Eye Res.* 2005, 80, 607–621.
115. Russell CD, Griffiths SJ, Haas J. Interferon lambda genetic polymorphisms and viral infection: The tip of the iceberg?. *DNA Cell Biol.* 2014, 33, 60–63.
116. Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR. Lambda interferon (IFN- $\lambda$ ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J. Virol.* 2006, 80, 4501–4509.
117. Melchjorsen J, Sirén, J, Julkunen, I, Paludan, SR, Matikainen S. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF- $\kappa$ B and IRF-3. *J. Gen. Virol.* 2006, 87, 1099–1108.
118. Sainz B, Loutsch JM, Marquart ME, Hill JM. Stress-associated immunomodulation and herpes simplex virus infections. *Med. Hypotheses* 2001, 56, 348–356.
119. Azher TN, Yin XT, Tajfirouz D, Huang AJ, Stuart PM. Herpes simplex keratitis: Challenges in diagnosis and clinical management. *Clin. Ophthalmol.* 2017, 11, 185–191.
120. Rossler H. *Klin. Mbl. Augenheilk.*, 1956; 128,727.
121. Maclatchy RS. Herpes ophthalmicus. *Br J Ophthalmol.* 1956 Dec; 40(12): 762–764.
122. Piyathilake CJ, Macaluso M, Chambers MM, Badiga S, Siddiqui NR, Bell WC, Edberg JC, Partridge EE, Alvarez RD, Johanning GL. Folate and vitamin B12 may play a critical role in lowering the HPV 16 methylation-associated risk of 12 developing higher grades of CIN. *Cancer Prev Res (Phila).* 2014 Nov;7(11):1128-37.
123. Lopes RDVC, Teixeira JA, Marchioni D, Villa LL, Giuliano AR, Luiza Baggio M, Fisberg RM. Dietary intake of selected nutrients and persistence of HPV infection in men. *Int J Cancer.* 2017 Aug 15;141(4):757-765.

- 
124. Ślebioda Z, Krawiecka E, Szponar E, Dorocka-Bobkowska B, Haematinic deficiencies and patient clinical profiles in Polish patients with recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2018 May;47(5):531-537.
  125. Gebhardt BM, Hill JM. T lymphocytes in the trigeminal ganglia of rabbits during corneal HSV infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988; 29: 1683–1691.
  126. Liu T, Tang Q, Hendricks RL. Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection. *J Virol*. 1996; 70: 264–271.
  127. Bertke AS, Swanson SM, Chen J, Imai Y, Kinchington PR, Margolis TP. A5-positive primary sensory neurons are nonpermissive for productive infection with herpes simplex virus 1 in vitro. *J Virol*. 2011;85:6669–6677.

## Биографија

Савић Боривоје је рођен 06.05.1980. године у Кикинди где је завршио основну школу и гимназију природно математичког смера. Дипломирао је и специјализирао на Факултету за примењену екологију Универзитета Сингидунум у Београду и Биолошком факултету Универзитета у Београду. Стекао је звање дипломирани мастер аналитичар заштите животне средине – еколог са просечном оценом 8,80 и дипломирани биолог специјалиста – генетичар са просечном оценом 10,00. Докторирао је на факултету за примењену екологију Универзитета Сингидунум 2014. године и стекао звање доктора наука – заштита животне средине екологија, ужа област – генетика са просечном оценом 9,50.

Поред наведеног образовања кандидат Савић Боривоје, дипломирао је и на Високој медицинској Школи у Београду-Земун и стекао звање дипломираног струковног медицинског радиолога са просечном оценом 8,00.

Ради у Клиници за очне болести Клиничког центра Србије у одељењу за трансплантацију рожњаче (очна банка) као специјалиста биолог - генетичар. Члан је Националног трансплантационог тима Клиничког центра Србије. Извршио је преко 60 експлантација рожњаче и учествовао у преко 60 успешних трансплантација рожњаче. Први је у Србији, у очној банци КЦС у августу 2017. године „банкирао“ ткиво рожњаче. У оквиру додатног и стручног образовања поседује сертификате: 1) Очна банка, Клиника за очне болести у Венецији, Италија - процена квалитета рожњаче; 2) КЦ „Ребро“, Хрватска - процена квалитета рожњаче, експлантација рожњаче. 3) КЦ Србије, Клиника за очне болести - експлантација рожњаче. Аутор или коаутор је у више од 15 научних и стручних радова који су објављени у часописима категорије М22, М23, М51 и тренутно је учесник на једном међународном пројекту из области генетичке зависности дијабетесне ретинопатије. Излагао је своје радове на више научних скупова са међународним учешћем.

**Библиографија научних радова**

1. **Savić B**, Stanojlović S, Hadži Milić M, Đonović N, Milošević-Đorđević O, Milisavljević F, Stojković M, Pajić S. IL28B genetic variations in patients with recurrent herpes simplex keratitis. *Medicina* (2019); Sep 2019. DOI broj 10.3390/medicina55100642. **(M22)**
2. **Savić B**, Milicevic V, Bojkovski J, Prodanović R, Kureljusic B, Potkonjak A, Savic B. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Serbia. *Archives of virology* (2012); vol. 157 br. 1, str. 21-28. DOI broj 10.1007/s00705-011-1130-9. **(M22)**
3. Stanojlović S, Pejin V, Kalezić T, Pantelić J, **Savić B**. Corneal collagen cross-linking in pediatric patients with keratoconus. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* (2019); DOI broj 10.2298/SARH190108123S. **(M23)**
4. Savić B, Stanojlović S, Stojković M, Mišić M, Draganić V. Potential role of folic acid and vitamin b12 in herpes simplex virus keratitis reactivation. *Vojnosanitetski pregled* (2019); March, 2019. DOI broj 10.2298/VSP181001037S. **(M23)**
5. Stanojlović S, Glišić S, Arandjelović S, Kalezić T, Dačić Krnjaja B, Savić B. Cataract surgery in a patient with bilateral necrotising scleritis and peripheral ulcerative keratitis associated with granulomatosis with polyangiitis (wegener's granulomatosis). *Vojnosanitetski pregled* (2019); January, 2019. DOI broj 10.2298/VSP181029013S. **(M23)**
6. Savić B, Radanovic O, Cvetojević Dj, Stevančević O, **Savić B**. Multi locus sequence typing of *Brucyospira hyodysenteriae* isolates from pigs on Serbian farms. *Berliner und munchener tierarztliche wochenschrift* (2017); February, 130br. 7-8, str 332-336. DOI broj 10.2376/0005-9366-15124. **(M23)**

7. Ilic M, Radevic S, Stefanovic V, Cirkovic T, Zurovac T, **Savic B**, Kovacevic V. Mortality rate of lip, oral cavity and pharynx malignant tumors in Serbia within a period 1991-2009. *Vojnosanitetski pregled* (2013); vol. 70 br. 2, str. 189-194. DOI broj 10.2298/VSP1302189I (**M23**)
8. Pavlović I, **Savić B**, Jovičić D, Jovanović L, Elezović-Radovanović M. Ekološki značaj parazitske kontaminiranosti zelenih površina u gradovima. *Ecologica* (2013); 453str. UDC:502.7 ISSN 0354 - 3285. No - 71 (**M51**)
9. Pavlović I, Jovičić D, **Savić B**. Uticaj pasa na zagađivanje javnih površina u gradovima. Treći naučno stručni skup Politehnika 2015. Zbornik Radova štampan u celini (2015) Beograd 4 Decembar. CD ROM ISBN 978-86-7498-064-4 (**M63**)



---

**Biography**

Borivoje Savic was born on 06.05.1980. in Kikinda where he finished elementary school and high school of mathematical science. He graduated and specialized in the Faculty of Applied Ecology, Singidunum University in Belgrade and the Faculty of Biology, University of Belgrade. He earned a Bachelor of Science degree in Environmental Sciences - ecologist with an average score of 8.80 and a Bachelor of Science in Biology - a geneticist with an average score of 10.00. He received his PhD from the Faculty of Applied Ecology at Singidunum University in 2014 and earned his Ph.D. in Environmental Sciences in Ecology, narrow field - genetics with an average score of 9.50.

In addition to the aforementioned education, candidate Savic Borivoje also graduated from the Medical College of Belgrade-Zemun and earned a Bachelor of Professional Medical Radiology with an average grade of 8.00.

He works at the Clinic for eye diseases, Clinical Center of Serbia in the corneal transplant department (eye bank) as a specialist biologist - geneticist. He is a member of the National Transplant Team of the Clinical Center of Serbia. He has performed over 60 corneal explantation and participated in over 60 successful corneal transplantation. The first in Serbia, at the KCS eye bank, in August 2017, "banked" corneal tissue. Within additional and professional education, he holds the certificates: 1) Eye Bank, Clinic for Ophthalmic Diseases in Venice, Italy - corneal quality assessment; 2) KC "Rebro", Croatia - evaluation of corneal quality, corneal explantation. 3) Clinical Center of Serbia, Clinic for Ophthalmic Diseases - Corneal explantation. He is the author or co-author of more than 15 scientific and professional papers published in the journals of categories M22, M23, M51 and is currently a participant in an international project in the field of genetic dependence of diabetic retinopathy. He has exhibited his work at multiple scholarly meetings with international involvement.

**Bibliography of scientific papers**

1. Savić B, Stanojlović S, Hadži Milić M, Đonović N, Milošević-Đorđević O, Milisavljević F, Stojković M, Pajić S. IL28B genetic variations in patients with recurrent herpes simplex keratitis. *Medicina* (2019); Sep 2019. DOI broj 10.3390/medicina55100642. (M22)
2. Savić B, Milicevic V, Bojkovski J, Prodanović R, Kureljusic B, Potkonjak A, Savic B. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Serbia. *Archives of virology* (2012); vol. 157 br. 1, str. 21-28. DOI broj 10.1007/s00705-011-1130-9. (M22)
3. Stanojlović S, Pejin V, Kalezić T, Pantelić J, Savić B. Corneal collagen cross-linking in pediatric patients with keratoconus. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* (2019); DOI broj 10.2298/SARH190108123S. (M23)
4. Savić B, Stanojlović S, Stojković M, Mišić M, Draganić V. Potential role of folic acid and vitamin b12 in herpes simplex virus keratitis reactivation. *Vojnosanitetski pregled* (2019); March, 2019. DOI broj 10.2298/VSP181001037S. (M23)
5. Stanojlović S, Glišić S, Arandjelović S, Kalezić T, Dačić Krnjaja B, Savić B. Cataract surgery in a patient with bilateral necrotising scleritis and peripheral ulcerative keratitis associated with granulomatosis with polyangiitis (wegener's granulomatosis). *Vojnosanitetski pregled* (2019); January, 2019. DOI broj 10.2298/VSP181029013S. (M23)
6. Savić B, Radanovic O, Cvetojević Dj, Stevančević O, Savić B. Multi locus sequence typing of *Brucyospira hyodysenteriae* isolates from pigs on Serbian farms. *Berliner und munchener tierarztliche wochenschrift* (2017); February, 130br. 7-8, str 332-336. DOI broj 10.2376/0005-9366-15124. (M23)
7. Ilic M, Radevic S, Stefanovic V, Cirkovic T, Zurovac T, Savic B, Kovacevic V. Mortality rate of lip, oral cavity and pharynx malignant tumors in Serbia within a period 1991-2009. *Vojnosanitetski pregled* (2013); vol. 70 br. 2, str. 189-194. DOI broj 10.2298/VSP1302189I (M23)

8. Pavlović I, Savić B, Jovičić D, Jovanović L, Elezović-Radovanović M. Ecological significance of parasitic contamination of green spaces in cities. *Ecologica* (2013); 453str. UDC:502.7 ISSN 0354 - 3285. No - 71 (M51)
9. Pavlović I, Jovičić D, Savić B. The impact of dogs on urban pollution. Third Scientific Conference of the Polytechnic 2015. Proceedings printed in full (2015) Belgrade 4th December. CD ROM ISBN 978-86-7498-064-4 (M63)

## ПРИЛОГ

### 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број - РБ:**

**Идентификациони број - ИБР:**

**Тип документације - ТД:** Монографска публикација

**Тип записа - ТЗ:** Текстуални штампани материјал

**Врста рада - ВР:** Докторска дисертација

**Аутор - АУ:** Боривоје Савић

**Коментори - МН:** Проф др Нела Ђоновић, Проф др Оливере Милошевић-Ђорђевић

**Наслов рада - НР:** Улога фолне киселине, витамина В12 и генетичке варијације *IL28B* гена у настанку рекурентног херпетичног кератитиса

**Језик публикације - ЈП:** српски (ћирилица)

**Језик извода - ЈИ:** српски /енглески

**Земља публикавања - ЗП:** Србија

**Уже географско подручје - УГП:** Србија

**Година - ГО:** 2020

**Издавач - ИЗ:** Ауторски репринт

**Место и адреса - МС:** Крагујевац 34000, Светозара Марковића 69

**Физичи опис рада - ФО:** 92 стране 15 слика ,6 табела, 2 графикана

**Научна област - УДК:** Медицина

**Научна дисциплина - ДИ:** Генетика

**Предметна одредница/ кључне речи - ПО:** генске варијације *IL28B*, рекурентни херпетични кератитис, епигенетика, витамин В12 и фолна киселина.

**Чува се - ЧУ:** Библиотеци Факултета медицинских наука

**Важна напомена - МН:**

**Извод - ИД:**

**Увод.** У готово 90% одрасле популације присутна су антитела према типу 1 *Herpes simplex* (HSV-1) вируса. Интерферони типа III (IFN- $\lambda$ ) имају веома значајну антивирусну и антиинфламацијску активност, што је од посебног значаја код рекурентног херпетичног кератитиса. Епигенетска природа реактивације HSV-1, између осталог, може зависити од присуства и концентрација доказаних епигентских модулатора као што су витамин В12 и фолна киселина, који су укључени у процес метилације молекула ДНК. **Циљеви.** Циљ студије је да се истражи могућа повезаност између *IL28B* генотипа домаћина и предиспозиције за рекурентни стромални херпетични кератитис. Такође, циљ овог истраживања је и анализа могуће повезаности између концентрација витамина В12 и фолне киселине у крви са развојем рекурентног херпетичног кератитиса. **Метод.** Испитивање је спроведено на узорку од осамдесет пацијената старијих од 18 година, оба

пола, који су у анамнези имали појаву рекурентног *herpesvirus hominis labialis* (HSL). Сви испитаници су тестирани на присуство IgG антитела специфичних за HSV-1, како би се код серопозитивних појединаца типизирао ген *IL28B* (rs12979860snp). Седамдесет и пет серопозитивних испитаника укључено је у студију. Двадесет и четири пацијената имала су рекурентни херпетични кератитис са последичним ожиљавањем рожњаче и значајним смањењем видне оштрине. Укупна ДНК изолована је из узорака крви испитаника. Испитаницима са рецидивирајућим херпетичним кератитисом, додатно је узето 2ml периферне венске крви за одређивање нивоа фолне киселине и витамина В12 у акутној фази рецидива херпетичне болести ока. **Резултати.** У нашем истраживању показана је статистички значајна повезаност између појаве рекурентног HSV кератитиса и два једнонуклеотидна полиморфизма (SNP) за генотип *IL28B* (CCrs12979860 и CTrs12979860,  $p < 0.05$ ). Такође, према резултатима наше студије, сви пацијенти су имали ниже вредности витамина В12 и фолне киселине у серуму у акутној фази рецидивирајућег херпетичног кератитиса. **Закључак.** Резултати наше студије показују да се клиничка манифестација рекурентне HSV-1 инфекције може повезати са полиморфизмом *IL28B* гена. Реактивација вируса HSV-1 може бити повезана са минималним недостатком витамина В12 и фолне киселине током латентне фазе болести, због епигенетске природе HSV-1 вируса.

**Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 04.09.2019.**

**Датум одбране - ДО:**

**Чланови комисије - КО:**

1. **Проф. др Сунчица Срећковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, председник
2. **Доц. др Татјана Шаренац-Вуловић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Офталмологија, члан
3. **Проф. др Јевросима Стевановић**, ванредни професор Факултета ветеринарских наука Универзитета у Београду за ужу научну област Биологија-генетика, члан

## 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC**  
**FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

**Accession number - ANO:**

**Identification number - INO:**

**Documentation type - DT:** Monographic publication

**Type of record - TR:** Textual printed material

**Contents code - CC:** PhD thesis

**Author - AU:** Borivoje Savić

**Menthor/co-mentor - MN:** Nela Đonović, MD, PhD, Full Professor, Olivera Milosevic-Đorđević, PhD, Full Professor

**Title - TI:** The role of folic acid, vitamin b12 and the genetic variation of il28b genes in the oncome of recurrent herpetic keratitis

**Language of text - LT:** Serbian

**Language of abstract:** Serbian / English

**Country of publication - CP:** Serbia

**Locality of publication - LP:** Serbia

**Publication year - PY:** 2020.

**Publisher - PU:** Author`s reprint

**Publication place - PP:** 34000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69

**Physical description - PD:** 92 pages 15 pictures, 6 tables, 2 charts

**Scientific field - SF:** Medicine

**Scientific discipline - SD:** Genetics

**Subject/key words - SKW:** IL28B gene variations, recurrent herpetic keratitis, epigenetics, vitamin B12 and folic acid.

**UDC:** Medicine

**Holding data:** Library of faculty of Medical Sciences, 34000 Kragujevac

**Note - N:**

**Abstract - AB:**

**Introduction.** Herpes simplex (HSV-1) type 1 antibodies are present in almost 90% of the adult population. Type III interferons (IFN- $\lambda$ ) have very significant antiviral and anti-inflammatory activity, which is of particular importance in recurrent herpetic keratitis. The epigenetic nature of HSV-1 reactivation may depend, among other things, on the presence and concentrations of proven epigenetic modulators such as vitamin B12 and folic acid involved in the DNA methylation process.

**Objectives.** The aim of this study is to investigate the possible association between IL28B host genotype and the predisposition to recurrent stromal herpetic keratitis. Also, the aim of the study is to find out the possible relationship between vitamin B12 and folic acid concentrations in blood and recurrent herpetic keratitis.



**Methods.** The study was conducted on a sample of eighty patients over 18 years of age, of both genders with a history of recurrent herpesvirus hominis labialis (HSL). All subjects were tested for the presence of HSV-1-specific IgG in order to typify IL28B genes (rs12979860snp) in seropositives. Seventy-five of these patients were found to be seropositive for HSV-1 and were subsequently enrolled in the study. Twenty-four of the enrolled patients also had a history of recurrent herpetic keratitis (HSK) associated with severe corneal scarring and visual acuity deterioration. Total DNA was isolated using blood samples. Two milliliters of peripheral venous blood were additionally collected from subjects with recurrent herpetic keratitis, in the acute phase of the disease, in order to determine folic acid and vitamin B12 levels.

**The results.** A significant association was observed between recurrent HSK and two single nucleotide polymorphisms (SNP) of the IL28B genotype (CCrs12979860 and CTrs12979860,  $p < 0.05$ ). Our results show that all patients in the acute phase of the recurrent herpetic keratitis had lower B12 and folic acid sera levels.

**Conclusion.** The results from our study indicate that the clinical manifestation of recurrent HSV-1 infection may be related to IL28B gene polymorphism. HSV-1 virus reactivation may be associated with minimal vitamin B12 and folic acid deficiency during the latent phase of the disease, due to the epigenetic nature of the HSV-1 virus.

**Accepted by the Scientific Board on - ASB: 04.09.2019**

**Defended on - DE:**

**Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:**

1. Associate Professor, Sunčica Srećković, MD, PhD, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, scientific domain Ophthalmology, chairman
2. Assistant Professor, Tatjana Šarenac-Vulović, MD, PhD, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, scientific domain Ophthalmology, member
3. Associate Professor, Jevrosima Stevanovic, PhD, Faculty of Veterinary Medicine Science, University of Belgrade, scientific domain Biology-Genetics, member

Образац 1

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Савић Боривоје \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Улога фолне киселине, витамина В12 и генетичке варијације IL28В гена у настанку рекурентног херпетичног кератитиса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 10.3.2020. године,

  
потпис аутора

## Образац 2

## ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Савић Боривоје \_\_\_\_\_,

 дозвољавам не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Улога фолне киселине, витамина В12 и генетичке варијације IL28B гена у настанку рекурентног херпетичног кератитиса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

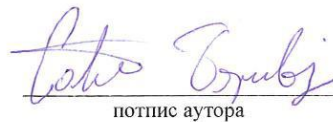
 дозвољавам не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведсну докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делим под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делим под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 10.3.2020. године,



ПОТПИС АУТОРА

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>


**Радови који су били услов за пријаву завршене докторске дисертације:**

1. **Savić B.**, Stanojlović S, Hadži-Milić M, Đonović N, Milošević-Đorđević O, Milisavljević F, Stojković M, Pajić S. *IL28B* genetic variations in patients with recurrent herpes simplex keratitis. *Medicina* (2019); Sep 2019. DOI broj 10.3390/medicina55100642. **(M22)**
2. **Savić B.**, Stanojlović S, Stojković M, Mišić M, Draganić V. Potential role of folic acid and vitamin b12 in herpes simplex virus keratitis reactivation. *Vojnosanitetski pregled* (2019); Mar 2019. DOI broj 10.2298/VSP181001037S. **(M23)**
3. Stanojlović S, Glišić S, Arandjelović S, Kalezić T, Dačić Krnjaja B, **Savić B.** Cataract surgery in a patient with bilateral necrotising scleritis and peripheral ulcerative keratitis associated with granulomatosis with polyangiitis (wegener's granulomatosis). *Vojnosanitetski pregled* (2019); January, 2019. DOI broj 10.2298/VSP181029013S. **(M23)**



Article

## IL28B Genetic Variations in Patients with Recurrent Herpes Simplex Keratitis

Savić Borivoje <sup>1</sup>, Stanojlović Svetlana <sup>1,2</sup>, Hadži-Milić Milan <sup>3</sup>, Đonović Nela <sup>4</sup>, Milošević-Đorđević Olivera <sup>5,6</sup>, Milisavljević Filip <sup>7</sup>, Stojković Milenko <sup>1,2</sup> and Pajić Srbislav <sup>8,\*</sup> 

<sup>1</sup> Clinic for Eye Diseases, Clinical Center of Serbia, 11000 Belgrade, Serbia; sb.bora@gmail.com (S.B.); stanojlovic.svetlana@gmail.com (S.S.); milenko.stojkovic@mub.bg.ac.rs (S.M.)

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> Department of Surgery, Orthopedics and Ophthalmology, Faculty of Veterinary Medicine, 11000 Belgrade, Serbia; milanhmilic@gmail.com

<sup>4</sup> Department of Hygiene and Ecology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia; nela@medf.kg.ac.rs

<sup>5</sup> Department of Genetics, Faculty of Medical Science, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia; olivera@kg.ac.rs

<sup>6</sup> Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>7</sup> Clinic of Neurosurgery, Clinical Center of Serbia, 11000 Belgrade, Serbia; milisavljevic93@gmail.com

<sup>8</sup> Emergency Center, Clinic for Emergency surgery, Clinical Center of Serbia, 11000 Belgrade, Serbia

\* Correspondence: nevus-ng@hotmail.com; Tel.: +381-64-903-0226

Received: 9 September 2019; Accepted: 25 September 2019; Published: 26 September 2019



**Abstract:** *Background and objectives:* Recurrent herpes simplex keratitis (HSK) is the most common cause of corneal blindness in the developed world. A relationship between host gene polymorphisms and the recurrence of herpes simplex virus (HSV) infection has previously been proposed. Thus, the aim of this study was to investigate a potential association between the *IL28B* host genotype and recurrent HSK. *Materials and Methods:* Eighty patients older than 18 years of age of both genders with a history of recurrent herpes simplex labialis (HSL) were considered for inclusion. Seventy-five of these patients were found to be seropositive for HSV-1 and were subsequently enrolled in the study. Twenty-four of the enrolled patients also had a history of recurrent HSK associated with severe corneal scarring and visual acuity deterioration. Total DNA was isolated from whole blood samples. A single-nucleotide polymorphism (SNP) rs12979860 near the *IL28B* gene on chromosome 19 was genotyped. *Results:* A significant association was observed between recurrent HSK and two SNPs of the *IL28B* genotype (CCrs12979860 and CTrs12979860,  $p < 0.01$ ). The variation CCrs12979860 showed a significantly greater association with HSK (16 out of 26 patients) compared with CTrs12979860 (8 out of 34 patients). *Conclusion:* Seropositive individuals with a history of recurrent HSK are likely to have the CC *IL28B* genotype. This genotype may be related to incomplete control of the infection and more frequent periodical viral shedding along the first nerve branch of the trigeminal ganglion, which clinically manifests as recurrent herpes keratitis. The clinical manifestation of recurrent HSV-1 infection seems to be influenced by polymorphism of the *IL28B* genotype.

**Keywords:** type III interferons (*IL28B*) genotype; keratitis; herpes simplex virus type 1 (HSV-1)

### 1. Introduction

Herpes simplex virus (HSV) infection is ubiquitous in humans, infecting 50–90% of the world's population [1,2]. HSV-1 causes a wide range of diseases, including herpes labialis, gingivostomatitis, and keratitis. The prevalence of ocular HSV disease has been estimated to be 149 in a population of

100,000 and in about one-fifth of the cases, leads to the development of stromal herpetic keratitis [3]. Herpes simplex keratitis (HSK) is one of the leading causes of corneal blindness, primarily because of its recurrent nature [4].

After primary infection of the sensory nerves innervating the skin and mucosal epithelium, HSV-1 has the ability to establish lifelong latency, most commonly within the trigeminal ganglion. The HSV-1 virus uses actin and microtubules for retrograde transport from the plasma membrane during entry and exit along axons. The composition of the viral particles, especially their protein complement, seems to determine the direction of transport during the entry and exit of the virus in neuronal and non-neuronal cells [5]. It has been estimated that one-third of the world's population suffers from recurrent HSV infections [3]. Upon periodical reactivation, the virus may follow any of the three branches of the fifth cranial nerve, regardless of the innervation branch of the primary HSV infection area. It is believed that cycles of HSV reactivation in latently infected neurons accompanied by anterograde axonal spread to the cornea lead to recurrent infections and scarring of the cornea [6]. Antiviral cytokine secretion as a result of host immunity plays a vital role in virus clearance; however, the concurrent inflammatory response is a major cause of corneal scarring, leading to vision loss [2,3,7].

The production of Type I interferons (IFNs) is most important for controlling viral replication [8]. Accordingly, enhanced HSV virulence has been reported in Type I IFN-receptor-deficient mice [9]. Interleukin (IL) 28B (interferon (IFN)- $\lambda$ 3), together with IL-28A and IL-29 (also termed IFN- $\lambda$ 1 and IFN- $\lambda$ 2) constitute a new subfamily within the IL-10 interferon family [10]. Indeed, IFN- $\lambda$  exhibits a number of biological characteristics that are similar to those of IFN- $\alpha/\beta$ , including antiviral activity, antiproliferative activity, and in vivo antitumor activity. By signaling through the heterodimeric IL-28R $\alpha$ /IL-10R $\beta$  complex, IFN- $\lambda$  performs antiviral and immunoregulatory activities [11,12]. It has also been shown that IFN- $\lambda$ -mediated antiviral activity is linked to the activation of type I IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) and the induction of IFN- $\alpha/\beta$ - and IFN- $\lambda$ -stimulated antiviral genes [13]. This provides a potential mechanism for the inhibitory effect of IFN- $\lambda$  on HSV-1. Additionally, IFN- $\lambda$  has the ability to activate the same JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator transcription factor) and MAP (mitogen-activated protein) kinase pathway as Type I IFNs [14–16].

Recent studies have reported a relationship between a specific polymorphism of *IL28B* (rs12979860) and HSV-1 reactivation in patients with herpes labialis [17], suggesting that polymorphisms in genes involved in antiviral responses might modulate the risk of developing recurrent HSV infection. Of note, this polymorphism was also reported to have a positive correlation with IFN- $\lambda$ 3 serum levels and the treatment outcome in patients with hepatitis C virus infection [18,19]. Treatment with IFN- $\lambda$  also inhibited virus replication and inflammatory reaction in an experimental model of HSK in mice [20].

The aim of this study was to evaluate possible correlations between host polymorphisms of the *IL28B* genotype and recurrent HSV keratitis in HSV-1 IgG-seropositive patients. To the best of our knowledge, the potential relationship between *IL28B* genotype and recurrent HSK has not previously been reported.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Setting

This was an in vitro experimental study using material of human origin. The study was conducted in accordance with the Institutional Review Board regulations, adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki, and informed consent was obtained from all participants.

The sample consisted of 80 patients over the age of 18 of both genders. All participants filled out a questionnaire to confirm their history of recurrent herpes simplex labialis (HSL) infection (cold sores). In addition, blood samples were collected from all patients in order to confirm the HSV1 IgG-positive status. Seventy-five of the tested patients were seropositive for HSV-1 and were subsequently enrolled in the study.

Twenty-four of the enrolled patients also had a history of recurrent HSV keratitis, leading to severe corneal scarring and, consequently, visual acuity deterioration. Recurrences were classified as epithelial keratitis, stromal keratitis, endothelitis, iridocyclitis, or combinations of these conditions. All patients were followed up for at least one year, from January to December 2018, at the Clinic for Eye Diseases, Clinical Centre of Serbia, Belgrade. Participants with no history of herpetic eye disease were voluntary employees from the Scientific Institute of Veterinary Medicine of Serbia. Genotyping for *IL28B* (rs12979860snp) was performed in the laboratory of the Scientific Institute of Veterinary Medicine of Serbia.

### 2.2. Inclusion and Exclusion Criteria

The study included participants with a history of recurrent HSL infection and confirmed HSV-1 IgG-seropositive status. Participants lacking anti-HSV-1 IgG antibodies were excluded (5 out of 80). This selection step resulted in a main study sample of 75 subjects.

Inclusion criteria for patients exhibiting recurrent herpetic eye disease were as follows: recurrent herpetic keratitis associated with corneal scarring and neovascularization and significant deterioration of visual acuity (less than 6/60, Snellen).

Exclusion criteria were as follows: a history of associated ocular comorbidities and previous ocular surgery, systemic and neurological diseases.

### 2.3. Immunological Analyses

Five milliliters of peripheral venous blood was collected from each patient in order to identify HSV-1 IgG status. An enzyme immunoassay was conducted for the qualitative determination of IgG class antibodies against HSV Type 1+2 in human serum or plasma (GenWay Biotech, Inc., San Diego, CA, USA). The cut-off value was HSV1 IgG < 9NTU.

### 2.4. Determination of *IL28B* Genotype

Five milliliters of peripheral venous blood was collected from each patient in order to identify the polymorphic gene *IL28B* rs12979860.

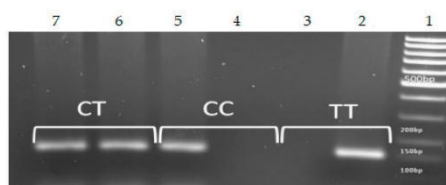
Total DNA was isolated using a commercial QIAamp DNA Blood mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. The single-nucleotide polymorphism (SNP) rs12979860, near the *IL28B* gene on chromosome 19, was genotyped.

Polymorphism was evaluated using the Sequence-Specific Primer-Polymerase Chain Reaction (SSP-PCR) method, which multiplies a short DNA region upstream or downstream of the polymorphism with an allele-specific primer (Table 1) [21]. PCR products were analyzed in 2% agarose gel with ethidium bromide staining (Figure 1). Determination of individual-polymorphism genotypes was performed on the basis of the presence or absence of amplified target sequences. The amplification was performed using the following parameters: initial denaturation step at 95 °C for 5 min, then 35 cycles at 95 °C for 30 s, 58 °C for 45 s, 72 °C for 60 s, and 72 °C for 10 min.

**Table 1.** Nucleotide sequences of the primers used in this study. SNP: single-nucleotide polymorphism.

<i>IL28B</i> SNP	Nucleotide Sequence	Size of PCR Product
rs12979860	Gen (sense) 5'-TTATCGCATACGG CTAGGC-3' C (antisense) 5'TGCAATTCAACCCTGGTTC G-3' T (antisense) 5' TGCAATTCAACCCTGGTTC A-3	153 bp





**Figure 1.** Polymorphism rs12979860—determination of genotypes (size of PCR product: 153 bp). Line 1, DNA ladder; lanes 2,3, TT homozygous; lanes 4,5, CC homozygous, Lines 6,7, CT heterozygous. Heterozygous samples resulted in the amplification of both bands, indicating the presence of the two alleles.

### 2.5. Ethical Approval

This study was approved by the Ethics Committee and the Institutional Review Board of Clinical Center of Serbia, Belgrade (decision No. 57/14, approved on 21 March 2019). Please mention that the study was done according to the Helsinki declaration.

### 2.6. Statistical Analysis

The statistical analysis was performed with SPSS Statistics 20. We used the Chi-square test to determine if there was an association between *IL28b* genotypes and prevalence of HSV infections.

The Chi-square independence test was applied in order to determine a possible association between *IL28b* genotypes and incidence of HSK infection; *p*-values below 0.01 were considered statistically significant. The calculation of the total sample was based on the results of other authors who had studied the impact of the examined genotype in subjects with labial herpes and patients with hepatitis C. Using a G\*Power 3.1.9.4 and  $\chi^2$  test with a significance level (alpha) of 0.01 and a study strength of 0.08, it was deemed that a minimum number of 40 subjects was required to achieve significant results. The total sample size comprised 75 respondents; thus, the sample size was sufficient.

## 3. Results

### 3.1. Clinical Characteristics

This study included 75 participants with confirmed HSV IgG-positive status. Twenty-four patients had experienced recurrent HSK, and the remaining 51 individuals only had a history of recurrent HSL disease. The demographic characteristics of the study population are summarized in Table 2.

**Table 2.** Demographic characteristics of the study population.

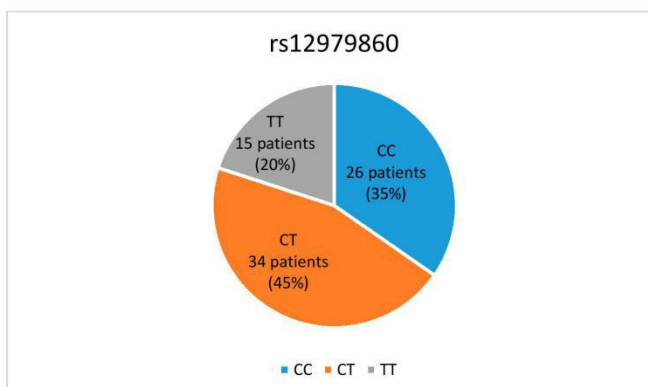
Characteristics	All Patients
n	75
Gender (M/F)	36:39
Age, y	44.95 ± 11.294
Have keratitis (M)	5 (6.7%)
Do not have keratitis (M)	31 (41.3%)
Have keratitis (F)	19 (25.3%)
Do not have keratitis (F)	20 (26.7%)

Data are reported as mean ± standard deviation. M, male; F, female.

### 3.2. Distribution of *IL28B* Genotype Polymorphisms

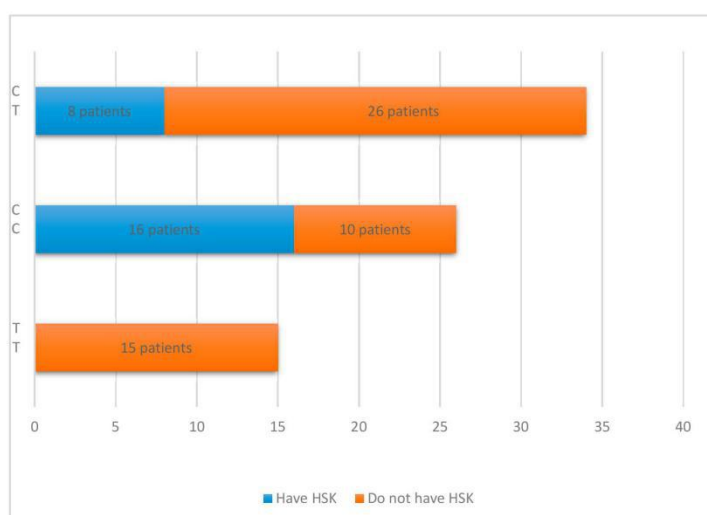
The presence of the host *IL28B* rs1279860 genotype was investigated in all participants. The distribution of the polymorphism in the *IL28B* gene region for the study population as a whole is shown in Figure 2. CT rs1279860 was the most common genotype identified and was estimated to be present

in 45% of patients (34 out of 75), followed by the CCrs1279860 genotype, present in 35% of patients (26 patients), and the TTrs1279860 genotype, observed in the remaining 20% of patients (15 patients) (Figure 2).



**Figure 2.** Distribution of the *IL28B* genotype rs12979860 in the study group as a whole. Percent distribution of the *IL28B* genotype rs12979860. CC: CCrs1279860, CT: CTrs1279860, TT: TTrs1279860.

A significant association was observed between recurrent HSV keratitis and two SNPs of the *IL28B* genotype (CCrs12979860 and CTrs12979860,  $p < 0.01$ ). Interestingly, the variation in CCrs12979860 showed a more significant association with recurrent HSV keratitis compared with CTrs12979860 (16 and 8 patients, respectively), as demonstrated in Figure 3. Furthermore, the TTrs12979860 genotype variant of *IL28B* was observed in 15 participants with HSV labialis disease. Of note, in our study, patients with recurrent HSV keratitis did not show the TTrs12979860 genotype variant (Figure 3).



**Figure 3.** *IL28B* genotype distribution according to the clinical manifestation of recurrent herpes simplex virus (HSV) infection. Patients with herpes simplex keratitis (HSK) are marked in blue, and patients without HSK are marked in orange.

#### 4. Discussion

In our study, the polymorphism of the *IL28B* (rs12979860) gene was analyzed in HSV-1-seropositive patients with a history of recurrent HSV disease including HSV keratitis and/or herpes labialis. The CTrs12979860 genotype was the most common SNP variation in patients with recurrent HSV disease, followed by the CCrs12979860 and the TTrs12979860 genotypes. Interestingly, the majority of patients with recurrent HSV keratitis demonstrated the CC genotype (16 out of 24, 66.7%), whereas only 10 out of 51 (19.6%) individuals with herpes labialis (without a history of recurrent HSV eye disease) showed the CC genotype variant of *IL28B*.

Recurrent stromal HSV keratitis is recognized as the most common infectious cause of vision-threatening corneal scarring in the developed world [22]. Accordingly, in our study, all patients with recurrent HSV keratitis exhibited severe corneal scarring accompanied by significant visual acuity reduction. The inflammatory process orchestrated by Th1 cells and non-lymphoid inflammatory cells leads to a chronic tissue-damaging response in addition to direct viral effects [4]. Most of the corneal damage results from neutrophil infiltration and neovascularization [23].

Studies with animal models have revealed that the genetic make-up of the host has an impact on the severity of HSV-1 corneal disease. Strains of inbred mice were shown to differ in their susceptibility to HSV corneal infection [24]. However, the roles of specific host genes in the resistance to HSK are poorly understood. Host genes may influence the outcome of an infection by affecting innate resistance factors as well as the function of the immune system [25]. It was also shown that susceptibility to HSV-1 infection is modulated by polymorphisms in genes that control the effector functions of cytotoxic T and natural killer (NK) lymphocytes [26].

A number of studies have investigated the relationship among host gene polymorphisms and both the severity and the recurrence of HSV infection [17,26,27]. In this context, it was recently reported that *IFN-λ* gene expression is associated with the recurrence and severity of recurrent HSV-1 disease [17]. Indeed, the minor T allele at rs12979860 was found to be associated with the severity and frequency of labial herpes recurrence. Griffiths et al. found that individuals with the CT or TT genotypes for *IL28B* had more frequent episodes of severe labial herpes, a condition resulting from the reactivation of HSV-1 [17]. On the basis of these findings, the authors suggested that recurrent HSV disease is likely to be associated with the *IL28B* polymorphism. Likewise, in our study, the CT and TT genotypes were more prevalent in individuals with isolated labial herpes. However, the CC genotype for *IL28B* was highly associated with recurrent HSK. It seems that both clinical manifestation and site of HSV reactivation from trigeminal ganglia might be related to different host genotypes as well as to the micro-environment. It is therefore of utmost clinical interest to identify a subgroup of patients with recurrent HSK who possess a higher risk for developing HSK, a potentially blinding disorder. Future studies with larger numbers of participants are necessary to confirm the hypothesis that the host genotype of *IL28B* might have an influence on determining which one of the three branches of trigeminal ganglion is most likely to be followed upon periodical HSV reactivation.

In patients with chronic hepatitis C, the CC genotype profile has been associated with a lower level of transcription of interferon-stimulated genes (ISGs) compared with TT individuals [28,29]. The non-CC genotypes, associated with a higher level of ISG expression in the setting of chronic hepatitis C infection, have previously been related to lower rates of spontaneous virus clearance. In contrast, the CC genotype, in which a low level ISG expression is observed, has been associated with high rates of spontaneous virus clearance [28].

The presence of the CC genotype variant in our patients with recurrent HSK might have led to incomplete control of infection and periodical viral shedding due to a lower transcription level of ISGs, as previously reported in patients with chronic hepatitis C infection [28,29].

Type III IFNs (IFN- $\lambda$ ) have been found to possess antiviral effects against HSV [30,31]. Pica et al. reported that reduced production of IFN- $\lambda$  might be correlated with the development of recurrent HSV-1 labialis in immunocompetent individuals [32]. A recent study reported that IFN- $\lambda$  treatment resulted in significant suppression of HSV-1 replication in both astrocytes and neurons. Furthermore,

this was associated with the upregulation of endogenous IFN- $\alpha/\beta$  and several ISGs [13]. These findings indicate that IFN- $\lambda$  functionally resembles that of type I IFN, inducing ISG expression and resulting in the suppression of viral replication [13]. Immunological control of virus reactivation should also be taken into account. The environmental and physiologic stimuli that induce HSV-1 reactivation from latency include exposure to UV light, stress, and immune suppression, suggesting a possible role for T cells in preventing viral reactivation [33].

## 5. Conclusions

In our study, the CTrs12979860 genotype was found to be the most common SNP variation in patients with recurrent HSV disease, followed by CCrs12979860 and TTrs12979860.

While the CT and TT genotypes were more prevalent in individuals with isolated labial herpes, our results indicate that HSV-1-seropositive individuals expressing the CC *IL28B* genotype have a tendency toward developing recurrent herpetic keratitis. Clinical manifestation and the severity of recurrent HSV-1 infection seem to be influenced by polymorphism of the *IL28B* genotype. Further studies on host genetics in patients with recurrent herpetic eye disease are necessary to support our results.

**Author Contributions:** S.B. carried out the molecular genetic studies and drafted the manuscript, conceived the study, and participated in its design and coordination. S.S. participated in the design of the study and coordination and helped to draft the manuscript. Đ.N. participated in the design of the study and performed the statistical analysis. M.-Đ.O. participated in the design of the study and helped to draft the manuscript. H.-M.M. helped to draft the manuscript. M.F. helped to draft the manuscript. S.M. helped to draft the manuscript. P.S. helped to draft the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Boppana, S.B.; Fowler, K.B. Persistence in the population: Epidemiology and transmission. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2007.
2. Smith, J.S.; Robinson, N.J. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: A global review. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, S3–S28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Liesegang, T.J. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea* **2001**, *20*, 1–13. [[CrossRef](#)]
4. Biswas, P.S.; Rouse, B.T. Early events in HSV keratitis—Setting the stage for a blinding disease. *Microbes Infect.* **2005**, *7*, 799–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Miranda-Saksena, M.; Denes, C.E.; Diefenbach, R.J.; Cunningham, A.L. Infection and transport of herpes simplex virus type 1 in neurons: Role of the cytoskeleton. *Viruses* **2018**, *10*, 92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Shimeld, C.; Hill, T.; Blyth, B.; Easty, D. An improved model of recurrent herpetic eye disease in mice. *Curr. Eye Res.* **1989**, *8*, 1193–1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Abdelfattah, N.S.; Amgad, M.; Zayed, A.A. Host immune cellular reactions in corneal neovascularization. *Int. J. Ophthalmol.* **2016**, *9*, 625–633. [[PubMed](#)]
8. Hochrein, H.; Schlatter, B.; O’Keeffe, M.; Wagner, C.; Schmitz, F.; Schiemann, M.; Bauer, S.; Suter, M.; Wagner, H. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- $\alpha$  production via Toll-like receptor 9-dependent and-independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11416–11421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Leib, D.A. Counteraction of interferon-induced antiviral responses by herpes simplex viruses. In *Viral Proteins Counteracting Host Defenses*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2002; pp. 171–185.
10. Kotenko, S.V.; Gallagher, G.; Baurin, V.V.; Lewis-Antes, A.; Shen, M.; Shah, N.K.; Langer, J.A.; Sheikh, F.; Dickensheets, H.; Donnelly, R.P. IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 69–77. [[CrossRef](#)]
11. Uzé, G.; Monneron, D. IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie* **2007**, *89*, 729–734. [[CrossRef](#)]
12. Srinivas, S.; Dai, J.; Eskdale, J.; Gallagher, G.E.; Megjugorac, N.J.; Gallagher, G. Interferon- $\lambda$ 1 (interleukin-29) preferentially down-regulates interleukin-13 over other T helper type 2 cytokine responses in vitro. *Immunology* **2008**, *125*, 492–502. [[CrossRef](#)]

13. Li, J.; Hu, S.; Zhou, L.; Ye, L.; Wang, X.; Ho, J.; Ho, W. Interferon lambda inhibits herpes simplex virus type I infection of human astrocytes and neurons. *Glia* **2011**, *59*, 58–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sheppard, P.; Kindsvogel, W.; Xu, W.; Henderson, K.; Schlutsmeyer, S.; Whitmore, T.E.; Kuestner, R.; Garrigues, U.; Birks, C.; Roraback, J.; et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 63–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Dumoutier, L.; Tounsi, A.; Michiels, T.; Sommereyns, C.; Kotenko, S.V.; Renauld, J.C. Role of the Interleukin (IL)-28 Receptor Tyrosine Residues for Antiviral and Antiproliferative Activity of IL-29/Interferon- $\lambda$ 1 similarities with type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 32269–32274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zhou, Z.; Hamming, O.J.; Ank, N.; Paludan, S.R.; Nielsen, A.L.; Hartmann, R. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. *J. Virol.* **2007**, *81*, 7749–7758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Griffiths, S.J.; Koegl, M.; Boutell, C.; Zenner, H.L.; Crump, C.M.; Pica, F.; Gonzalez, O.; Friedel, C.C.; Barry, G.; Martin, K.; et al. A systematic analysis of host factors reveals a Med23-interferon- $\lambda$  regulatory axis against herpes simplex virus type 1 replication. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ge, D.; Fellay, J.; Thompson, A.J.; Simon, J.S.; Shianna, K.V.; Urban, T.J.; Heinzen, E.L.; Qiu, P.; Bertelsen, A.H.; Muir, A.J.; et al. Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* **2009**, *461*, 399–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Langhans, B.; Kupfer, B.; Braunschweiger, I.; Arndt, S.; Schulte, W.; Nischalke, H.D.; Nattermann, J.; Oldenburg, J.; Sauerbruch, T.; Spengler, U. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *J. Hepatol.* **2011**, *54*, 859–865. [[CrossRef](#)]
20. Jaggi, U.; Bhela, S.; Rouse, B.T. Role of Interferon lambda (IL-28A) in Herpes Stromal Keratitis. *J. Immunol. Res. Ther.* **2018**, *3*, 135–144.
21. Hori, K.; Shin, W.S.; Hemmi, C.; Toyooka, T.; Makino, T. High fidelity SNP genotyping using sequence-specific primer elongation and fluorescence correlation spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2003**, *4*, 477–484. [[CrossRef](#)]
22. Rolinski, J.; Hus, I. Immunological aspects of acute and recurrent herpes simplex keratitis. *J. Immunol. Res.* **2014**, *2014*, 513560. [[CrossRef](#)]
23. Azher, T.N.; Yin, X.T.; Tajfirouz, D.; Huang, A.J.; Stuart, P.M. Herpes simplex keratitis: Challenges in diagnosis and clinical management. *Clin. Ophthalmol.* **2017**, *11*, 185–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Metcalf, J.F.; Michaelis, B.A. Herpetic keratitis in inbred mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1984**, *25*, 1222–1225.
25. Brandt, C.R. The role of viral and host genes in corneal infection with herpes simplex virus type 1. *Exp. Eye Res.* **2005**, *80*, 607–621. [[CrossRef](#)]
26. Moraru, M.; Cisneros, E.; Gómez-Lozano, N.; de Pablo, R.; Portero, F.; Cañizares, M.; Vaquero, M.; Roustán, G.; Millán, I.; López-Botet, M.; et al. Host genetic factors in susceptibility to herpes simplex type 1 virus infection: Contribution of polymorphic genes at the interface of innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 4412–4420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Russell, C.D.; Griffiths, S.J.; Haas, J. Interferon lambda genetic polymorphisms and viral infection: The tip of the iceberg? *DNA Cell Biol.* **2014**, *33*, 60–63. [[CrossRef](#)]
28. Abe, H.; Hayes, C.N.; Ochi, H.; Maekawa, T.; Tsuge, M.; Miki, D.; Mitsui, F.; Hiraga, N.; Imamura, M.; Takahashi, S.; et al. IL28 variation affects expression of interferon stimulated genes and peg-interferon and ribavirin therapy. *J. Hepatol.* **2011**, *54*, 1094–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Honda, M.; Sakai, A.; Yamashita, T.; Nakamoto, Y.; Mizukoshi, E.; Sakai, Y.; Yamashita, T.; Nakamura, M.; Shirasaki, T.; Horimoto, K.; et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 499–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ank, N.; West, H.; Bartholdy, C.; Eriksson, K.; Thomsen, A.R.; Paludan, S.R. Lambda interferon (IFN- $\lambda$ ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J. Virol.* **2006**, *80*, 4501–4509. [[CrossRef](#)]

31. Melchjorsen, J.; Sirén, J.; Julkunen, I.; Paludan, S.R.; Matikainen, S. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF- $\kappa$ B and IRF-3. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 1099–1108. [[CrossRef](#)]
32. Pica, F.; Volpi, A.; Gaziano, R.; Garaci, E. Interferon- $\lambda$  in immunocompetent individuals with a history of recurrent herpes labialis. *Antivir. Ther.* **2010**, *15*, 737. [[CrossRef](#)]
33. Sainz, B.; Loutsch, J.M.; Marquart, M.E.; Hill, J.M. Stress-associated immunomodulation and herpes simplex virus infections. *Med. Hypotheses* **2001**, *56*, 348–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**VOJNOSANITETSKI PREGLED**

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)**ACCEPTED MANUSCRIPT**

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article **POTENTIAL ROLE OF FOLIC ACID AND VITAMIN B12 IN HERPES SIMPLEX VIRUS KERATITIS REACTIVATION**

**MOGUĆA ULOGA FOLNE KISELINE I VITAMINA B12 U REAKTIVACIJI HERPES SIMPLEKS VIRUSNOG KERATITISA**

Authors **Borivoje Savić, PhD\***, **Svetlana Stanojlović, MD, PhD\*†\***, **Milenko Stojković MD, PhD\*†**, **Miroslav Mišić, PhD‡**, **Prof. dr Božidar Savić, MD, PhD||**, **Veselin Draganić, PhD §**, *Vojnosanitetski pregled* (2019); Online First March, 2019.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP181001037S>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

**POTENTIAL ROLE OF FOLIC ACID AND VITAMIN B12 IN HERPES  
SIMPLEX VIRUS KERATITIS REACTIVATION**

**MOGUĆA ULOGA FOLNE KISELINE I VITAMINA B12 U  
REAKTIVACIJI HERPES SIMPLEKS VIRUSNOG KERATITISA**

**Authors: Borivoje Savić, PhD\*, Svetlana Stanojlović, MD, PhD\*†\*, Milenko Stojković  
MD, PhD\*†, Miroslav Mišić, PhD‡, Božidar Savić, MD, PhD||, Veselin Draganić, PhD  
§**

\*Clinic for Eye Diseases, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

† University of Belgrade, Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia

‡ College for Specialized Studies, Belgrade, Serbia

|| Institute of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

§ The Obstetrics and Gynaecology Clinic „Narodni front”, Belgrade, Serbia

**Corresponding author**

Borivoje Savić, Clinic for Eye Diseases, Clinical Centre of Serbia, Pasterova street, No 2,  
11000 Belgrade, Serbia, E-mail: sb.bora@gmail.com, Phone: +381 64 4040689



**Abstract**

**Background/Aim.** Most cases of herpetic keratitis present a recurrent disease, as a result of herpes simplex virus type 1 reactivation from latency the nearest sensory ganglia. Therefore, understanding the mechanisms of latency and reactivation of latent virus is an important link in understanding the onset of recurrent eye disease itself. Epigenetic regulation of virus reactivation as a result of the presence of transcriptionally active LAT region (Latency-Associated Transcript - LAT) in the latent viral genome has already been demonstrated in several studies. The activity of the LAT region is directed to the chromatin arrangement. Epigenetic modulation of DNA methylation is associated with folat and vitamin B12 intake or their serum concentrations. The aim of this study was to analyze the potential role of folic acid and vitamin B12 in the control of ocular herpes simplex keratitis reactivation. **Methods.** The study included 50 patients older than 18 years of age with recurrent herpes simplex virus eye disease. Levels of vitamin B12 and folic acid were measured in the acute phase of the disease. All patients were followed up for at least one year and episodes of recurrent herpetic eye diseases were recorded. **Results.** Recurrence rate of herpetic keratitis is lower in patients with a higher blood level of vitamin B12. There is statistical significance between these two variables. In addition, recurrence rate of herpetic keratitis is lower in patients with higher blood level of folic acid. However, statistical significance is lower in comparison with vitamin B12. **Conclusion.** Vitamin B12 and folic acid might have important role in herpes simplex keratitis reactivation. To our knowledge there is no report on potential role of vitamin B12 and folic acid in HSV keratitis reactivation.

**Key words:** Herpes simplex virus reactivation, HSV-1, keratitis, vitamin B12, folic acid, epigenetics.

**Apstrakt**

**Uvod/Cilj.** U većina slučajeva herpetični keratitis predstavlja rekurentnu bolest, kao rezultat reaktivacije herpes simpleks virusa tipa 1 iz latentnosti u najbližoj senzornoj gangliji. Prema tome razumevanje mehanizma latentnosti i reaktivacije latentnog virusa predstavlja važnu kariku u razumevanju nastanka recidivne bolesti oka. Sve je više studija

koje potvrđuju epigenetsku regulaciju reaktivacije virusa kao posledicu prisustva transkripciono aktivnog LAT regiona (transkripti vezani za latenciju - LAT) u latentnom virusnom genomu. Aktivnost LAT regiona usmerena je na hromatinsko uređenje. Epigenetska modulacija metilacije DNA je povezana sa unosom folata i vitamina B12 ili njihovim koncentracijama u serumu. Cilj ovog rada je bio da se analizira moguća uloga folne kiseline i vitamina B12 u kontroli reaktivacije okularnog herpetičnog keratitisa. **Metode.** Studija je obuhvatila 50 pacijenata starijih od 18 godina koji imaju različite forme herpetičnog keratitisa kao posledica reaktivacije herpes simpleks virusa tipa 1. Nivoi vitamina B12 i folne kiseline su mereni u akutnoj fazi bolesti. Svi pacijenti su praćeni najmanje godinu dana, a beležen je broj recidiva virusne infekcije. **Rezultati.** Stopa recidiva herpetičnog keratitisa je niža kod pacijenata sa višim nivoom vitamina B12 u krvi. Postoji statistička značajnost između ove dve varijable. Pored toga, stopa recidiva herpetičnog keratitisa je niža i kod pacijenata sa višim nivoom folne kiseline u krvi. Međutim, statistička značajnost je niža u poređenju sa vitaminom B12. **Zaključak.** Vitamin B12 i folna kiselina mogu imati važnu ulogu u reaktivaciji herpetičnog keratitisa. Prema našim saznanjima, ne postoji izveštaj o potencijalnoj ulozi vitamina B12 i folne kiseline u reaktivaciji HSV keratitisa.

**Кljučне речи: Reaktivacija herpes simpleks virusa, HSV1, keratitis, vitamin B12, folna kiselina, epigenetika.**

#### **Introduction**

The results of recent studies have shown that 50-90% of adult humans have serum antibodies to herpes simplex virus type 1 (HSV-1).

The annual incidence of all types of new ocular HSV infections has recently been estimated at 11.8 to 31.5 per 100,000 person a year. Epithelial dendritic lesion is the most frequent type of recurrent keratitis, with prevalence as much as 56.3%, followed by stromal keratitis, 29.5%. The clinical manifestations of primary HSV ocular infection are rare. Reactivation of latent virus in the ophthalmic branch of trigeminal ganglia can result in its shedding with subsequent infection of the overlying corneal epithelium. Herpetic keratitis occurs in various forms, and this largely depends on the depth of virus penetration into a

corneal tissue. Direct effect of virus and potent immune response to the viral proteins trigger corneal inflammation and neovascularisation leading to corneal thinning and scarring.

Most cases of herpetic keratitis represent recurrent disease that occurs as a result of HSV-1 reactivation from latency. Due to its recurrent nature, herpes virus keratitis is the second leading cause of corneal blindness, after cataract, in developed world. Therefore, understanding the mechanism and causes of HSV-1 reactivation from the latent state has long been the holy grail of herpes virologists. In animal models and later humans, latency of the virus may have epigenetic regulation, primarily because latent viral genome has a transcriptionally active LAT region. The activity of the LAT-region is directed to chromatin arrangement without encoding of known proteins. Although viral mutants lacking LATs are still able to establish and maintain reactivation from latency, recent findings indicate that the LAT-region increases the reactivation efficiency and in some way controls the latency of the virus itself <sup>10</sup>.

The aim of this study was to analyze the potential role of folic acid and B12 vitamin in the control of ocular HSV-1 reactivation. To our knowledge there is no report on potential role of vitamin B12 and folic acid in HSV keratitis reactivation.

### **Methods**

This study was conducted in compliance with the institutional review board regulations, informed consent regulation and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. It included 50 patients older than 18 years of age, regardless of gender, with recurrent ocular HSV-1 disease. Recurrent herpetic keratitis was confirmed by slit lamp examination on the basis of clinical findings. Recurrences were classified as epithelial keratitis, stromal keratitis, endothelitis, iridocyclitis or as combinations of these conditions. Exclusion criteria were as follows: history of associated ophthalmic comorbidities, previous ocular surgery, some form of anemia or systemic and neurological diseases.

All patients were followed up for at least one year between January 2017 and January 2018 at the Clinic for Eye Diseases, Clinical Centre of Serbia, Belgrade. In all

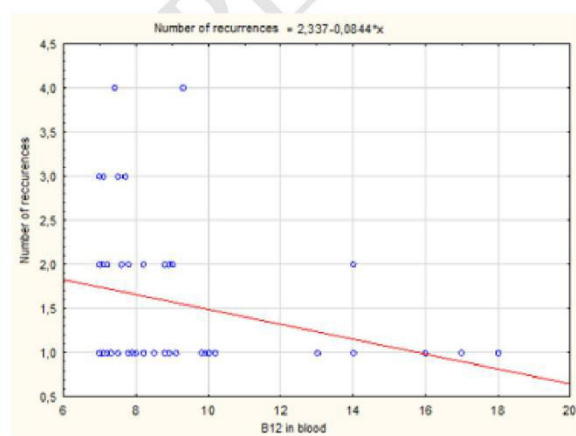
patients, levels of vitamin B12 and folic acid were measured during the acute phase of recurrent ocular HSV disease.

All patients were fasting 8 hours before taking blood samples. In addition, none of the included patients took any form of vitamin B complex supplementation for at least 12 months prior to blood sample harvesting. Two milliliters of venous blood was collected in a standard biochemical tube. Vitamin B12 level was measured on the "Roche Cobas 6000" analyzer, (ECLIA Method) and folate level on the "Roche Cobas E411" analyzer, (ECLIA Method). Blood samples were analyzed in the same laboratory, certified by the Total Quality Management (TQM) quality system. Correlation analysis was performed using SPSS Statistics 17.

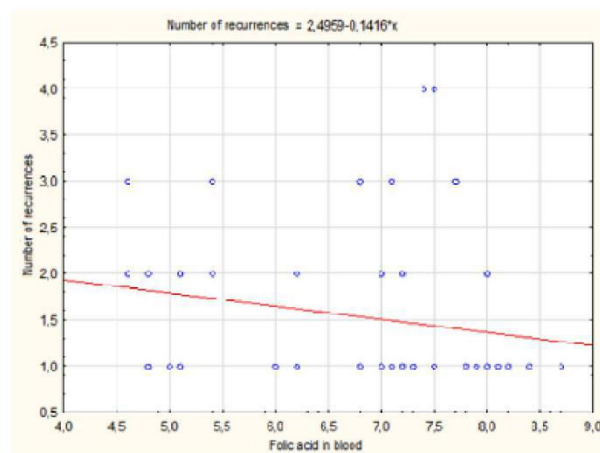
### Results

The analysis of our results shows that in all patients blood levels of vitamin B12 and folic acid were in lower reference range. According to the scatter diagrams (**Figure 1 and Figure 2**), there is a drop in number of relapses (as dependent variable) depending on both, the blood level of vitamin B12 and folic acid (independent variable).

Analysis of Variance (ANOVA) table and F-test ( $F = 5.031$ ) **Table 1**, show that there is highly statistically significant differences between dependent (number of recurrences) and independent variables (B12 level in the blood); thus, the model has a statistical significance.



**Fig. 1** Scatter plot for vitamin B12 levels vs. number of recurrences



**Fig. 2** Scatter plot for folic acid levels vs. number of recurrence

**Table 1** Differences between number of recurrences and vitamin B12 level in the blood

	Model	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Regression		3,265	1	3,265	,031	,830
Residual		31,155	8	,649		
Total		34,420	9			

a. Dependent Variable: Number of recurrences

b. Predictors: (Constant), B12 in blood

Pearson correlation coefficient **Table 2** shows that there is a statistically significant correlation between the level of vitamin B12 in the acute phase of the disease recurrence and the number of HSV keratitis recurrences. The higher level of vitamin B12 was associated with a reduced rate of disease recurrences. The higher folate level has also an impact on decrease the number of HSV keratitis recurrence; however, not as significantly as vitamin B12.

**Table 2** Correlation between the level of vitamin B12 in and the number of HSV recurrences

		B12 in blood	Folic acid in blood	Number of recurrences
B12 in blood	Pearson Correlation	1	-,587	-,308
	Sig. (2-tailed)		,000	,030
Folic acid in blood	Pearson Correlation		1	-,200
	Sig. (2-tailed)			,164
Number of recurrences	Pearson Correlation			1
	Sig. (2-tailed)			

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

\* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

## Discussion

Both, vitamin B12 and folic acid are involved in methylation process of DNA molecules. Methylation of DNA molecules is associated with folate intake and serum folate concentrations in the body. A better insight in epigenetic nature of the virus itself might be helpful in controlling HSV reactivation by using additional supplements in patients at higher risk of disease recurrence. Interestingly, a case study from 1956, did not consider epigenetic nature of virus reactivation, however, additional vitamin B12 supplementation significantly improved clinical course of herpetic keratitis. Those patients experienced milder clinical picture of recurrent herpetic eye disease [10].

Reactivation of the virus from a latent phase of disease into active HSV-1 keratitis may depend on the minimal deficiency of vitamin B12 or folic acids.

In our study, all patients had lower reference values of these vitamins in the acute phase of disease, thus it may be a potential trigger for virus reactivation and more severe clinical manifestations of herpetic keratitis.

Several studies have also found similar results with other viruses. Interesting, Piyathilake CJ et al. evaluated the influence of plasma folate and vitamin B12 concentrations on cervical cancer risk. Folate and vitamin B12 may play a critical role in lowering the HPV 16 methylation-associated risk of developing higher grades of cervical intraepithelial neoplasia <sup>16</sup>. Likewise, Lopes et al. revealed that vitamin B12 intake was inversely associated with non oncogenic HPV persistence <sup>17</sup>. Recently, it has been observed that recurrent aphthous stomatitis, including herpetic etiology was also related with iron and vitamin B12 deficiency <sup>18</sup>.

Herpes simplex virus establishes a latent infection in sensory neurons. The fact that the latent viral genome has a transcriptionally active LAT region that encodes the protein and transcriptionally inactive lytic gene regions suggests epigenetic regulation. The LAT region itself records various forms of histone arrangement <sup>19</sup>.

Immunological control of virus reactivation should be also considered. The environmental and physiologic factors that induce HSV-1 reactivation from latency include exposure to UV light, stress, immune suppression suggesting a possible role for T cells in preventing viral reactivation <sup>20,21</sup>. Studies in rabbits and mice also demonstrated that T cells infiltrate sensory neuron of the eye region around 8–10 days after corneal infection and remain there <sup>22</sup>.

The virus does not produce proteins in the latency period and in that way it “hides” from the immune system. Therefore, it was unclear what maintained the attraction of CD8+ T cells for latently infected neurons. At this juncture a definition of the terms “latency” and “reactivation” is important. The virus is able to hide from the host immune system during latency since the immune system can only respond to viral protein synthesis.

As recently postulated, asymptomatic virus latency may be related to the epigenetic nature of the virus, as well. In our study, lower blood reference values of both, folic acid and vitamin B12 were associated with reduced rate of recurrent herpetic keratitis. Future clinical and molecular epigenetic studies are necessary to further clarify this.

### **Conclusion**

Our study showed that all patients in the acute phase of the disease had lower reference values of vitamin B12 and folic acid. Moreover, recurrence rate of herpetic keratitis was lower in patients with higher blood level of vitamin B12 and folic acid during follow-up period.

Here, we assume that reactivation of the HSV virus may be related with the minimal deficiency of vitamin B12 and folic acid during latent phase of disease.

Therefore, additional supplementation with vitamin B12 and folic acid may be helpful in the prevention of reactivation of herpetic keratitis, potentially due to the epigenetic nature of virus reactivation. Further molecular epigenetic research and clinical studies may contribute in understanding and application of the epigenetic therapy in herpetic eye disease.

### **References**

1. Rabenau HF, Buxbaum S, Preiser W, Weber B, Doerr HW. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and type 2 in the Frankfurt am Main area, Germany. *Med Microbiol Immunol.* 2002;190:153–160
2. Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, McQuillan GM, Lee FK, Nahmias AJ, Berman SM, Markowitz LE. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. *Jama.* 2006;296:964–973
3. Young RC, Hodge DO, Liesegang TJ, Baratz KH. Incidence, recurrence, and outcomes of herpes simplex virus eye disease in Olmsted County, Minnesota, 1976–2007: the effect of oral antiviral prophylaxis. *Arch Ophthalmol.* 2010;128:1178–1183



4. *Labetoulle M, Auquier P, Conrad H, Crochard A, Daniloski M, Bouee S, El Hasnaoui A, Colin J.* Incidence of herpes simplex virus keratitis in France. *Ophthalmology.* 2005;112:888–895.
5. *Darougar S, Wishart MS, Viswalingam ND.* Epidemiological and clinical features of primary herpes simplex virus ocular infection. *Br J Ophthalmol.* 1985;69:2–6.
6. *Shimeld C, Hill TJ, Blyth WA, Easty DL.* Passive immunization protects the mouse eye from damage after herpes simplex virus infection by limiting spread of virus in the nervous system. *J Gen Virol.* 1990a;71(Pt 3):681–687.
7. *Shimeld C, Hill TJ, Blyth WA, Easty DL.* Reactivation of latent infection and induction of recurrent herpetic eye disease in mice. *J Gen Virol.* 1990b;71(Pt 2):397–404.
8. *Jones BR.* The clinical features of viral keratitis and a concept of their pathogenesis. *Proc R Soc Med.* 1958;51:917–924.
9. *Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR.* MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature.* 2008;454:780–783.
10. *Bertke AS, Swanson SM, Chen J, Imai Y, Kinchington PR, Margolis TP.* A5-positive primary sensory neurons are nonpermissive for productive infection with herpes simplex virus 1 in vitro. *J Virol.* 2011;85:6669–6677
11. *Yang L, Voytek CC, Margolis TP.* Immunohistochemical analysis of primary sensory neurons latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2000;74:209–217
12. *Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC,* Nutrition and epigenetic: An interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism, and DNA methylation. *J Nutr Biochem.* 2012 Aug; 23(8): 853–859.
13. *Maclatchy, R. S.* Herpes ophthalmicus. *Br J Ophthalmol.* 1956 Dec; 40(12): 762–764
14. *Rosler, H.* *Klin. Mbl. Augenheilk.,* 1956; 128,727
15. *Piyathilake CJ, Macaluso M, Chambers MM, Badiga S, Siddiqui NR, Bell WC, Edberg JC, Partridge EE, Alvarez RD, Johanning GL.* Folate and vitamin B12 may play a critical role in lowering the HPV 16 methylation-associated risk of

- developing higher grades of CIN. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014 Nov;7(11):1128-37.
16. *Lopes RDVC, Teixeira JA, Marchioni D, Villa LL, Giuliano AR, Luiza Baggio M, Fisberg RM*. Dietary intake of selected nutrients and persistence of HPV infection in men. *Int J Cancer*. 2017 Aug 15;141(4):757-765
  17. *Zuzanna Ślebioda, Ewa Krawiecka, Elżbieta, Szponar Barbara, Dorocka Bobkowska*, Haematinic deficiencies and patient clinical profiles in Polish patients with recurrent aphthous stomatitis (RAS). *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2018 May;47(5):531-537.
  18. *Bloom DC, Giordani NV, Kwiatkowski DL*. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799:246–256.
  19. *Cliffe AR, Garber DA, Knipe DM*. Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *J Virol*. 2009; 83: 8182–8190.
  20. *Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR*. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature*. 2008; 454: 780–783.
  21. *Blyth WA, Hill TJ, Field HJ, Harbour DA*. Reactivation of herpes simplex virus infection by ultraviolet light and possible involvement of prostaglandins. *J Gen Virol*. 1976; 33: 547–550.
  22. *Bonneau RH, Sheridan JF, Feng N, Glaser R*. Stress-induced modulation of the primary cellular immune response to herpes simplex virus infection is mediated by both adrenal-dependent and independent mechanisms. *J Neuroimmunol*. 1993; 42: 167–176.
  23. *Sainz B, Loutsch JM, Marquart ME, Hill JM*. Stress-associated immunomodulation and herpes simplex virus infections. *Med Hypotheses*. 2001; 56: 348–356.
  24. *Vicetti Miguel RD, Sheridan BS, Harvey SA, Schreiner RS, Hendricks RL, Cherpes TL*. 17-beta estradiol promotion of herpes simplex virus type 1 reactivation is estrogen receptor dependent. *J Virol*. 2010; 84: 565–572.
  25. *Gebhardt BM, Hill JM*. T lymphocytes in the trigeminal ganglia of rabbits during corneal HSV infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988; 29: 1683–1691.

26. *Liu T, Tang Q, Hendricks RL*. Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection. *J Virol*. 1996; 70: 264–271.

Received on October 1, 2018.

Revised on March 5, 2019.

Accepted March 11, 2019.

Online First March, 2019.

PAPER ACCEPTED

**VOJNOSANITETSKI PREGLED**

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)**ACCEPTED MANUSCRIPT**

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article **CATARACT SURGERY IN A PATIENT WITH BILATERAL NECROTISING SCLERITIS AND PERIPHERAL ULCERATIVE KERATITIS ASSOCIATED WITH GRANULOMATOSIS WITH POLYANGIITIS (WEGENER'S GRANULOMATOSIS)**

**OPERACIJA KATARAKTE KOD PACIJENTA SA OBOSTRANIM NEKROTIZUJUĆIM SKLERITISOM I PERIFERNIM ULCEROZNI KERATITISOM U SKLOPU GRANULOMATOZE SA POLIANGITISOM (WEGENEROVA GRANULOMATOZA)**

Authors Svetlana Stanojlović, MD, PhD\*,†, Selimir Glišić, MD†, Snežana Arandjelović, MD, PhD\*,‡, Tanja Kalezić, MD, PhD\*,†, Bojana Dačić Krnjaja, MD, PhD\*,†, Borivoje Savić, PhD†, *Vojnosanitetski pregled* (2019); Online First January, 2019.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP181029013S>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published

volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

**CATARACT SURGERY IN A PATIENT WITH BILATERAL NECROTISING  
SCLERITIS AND PERIPHERAL ULCERATIVE KERATITIS ASSOCIATED  
WITH GRANULOMATOSIS WITH POLYANGIITIS (WEGENER'S  
GRANULOMATOSIS)**

**OPERACIJA KATARAKTE KOD PACIJENTA SA OBOSTRANIM  
NEKROTIZUJUĆIM SKLERITISOM I PERIFERNIM ULCEROZNYM  
KERATITISOM U SKLOPU GRANULOMATOZE SA POLIANGITISOM  
(WEGENEROVA GRANULOMATOZA)**

**Authors:** Svetlana Stanojlović, MD, PhD\*†, Selimir Glišić, MD†, Snežana Arandjelović, MD, PhD\*‡, Tanja Kalezić, MD, PhD\*†, Bojana Dačić Krnjaja, MD, PhD\*†, Borivoje Savić, PhD†

\*University of Belgrade, Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia;

†Clinic for Eye Diseases, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

‡Institute for Allergology and Immunology, Clinical Centre of Serbia, Belgrade, Serbia

This work was presented in part at the 20th ESCRS Winter Meeting in Athens, Greece, February, 2016.

**Consent:** Written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal on request.

**Correspondence to:**

Svetlana Stanojlović, Clinic for Eye Diseases, Clinical Centre of Serbia, Pasterova street, No 2, 11000 Belgrade, Serbia, E-mail: stanojlovic.svetlana@gmail.com, Phone: +381 63 859756

**Running title:** Phacoemulsification in a patient with coexisting uveitic cataract and extreme staphyloma

**Abstract**

**Inroduction.** To describe a rare case of cataract surgery in a patient with an extreme, widespread anterior staphyloma following severe bilateral necrotising anterior scleritis associated with granulomatosis with polyangiitis (GPA). **Case report.** A 61-year-old man with a history of GPA developed bilateral rapidly progressive necrotising scleritis and peripheral ulcerative keratitis (PUK). Inflammation compromised the entire anterior globe and peripheral cornea in both eyes. More than 90% of the surface area healed within 8 weeks following treatment with 3 pulsed doses of methylprednisolone in addition to cyclophosphamide treatment. Systemic steroid therapy was slowly tapered over 6 months. Extraordinary scleral loss with a uveal bulge developed following severe necrotising anterior scleritis associated with PUK. Once full remission had been achieved for 6 months, uncomplicated phacoemulsification was performed in his left eye; only the left eye was functional. **Conclusion.** Preoperative and postoperative control of inflammation, careful surgical planning and meticulous surgical techniques are critically important for optimal surgical outcomes. To our knowledge, phacoemulsification in a patient with coexisting uveitic cataract and severe anterior staphyloma has not been previously reported.

**Key words:**

**scleritis, peripheral ulcerative keratitis (PUK), staphyloma, cataract surgery granulomatosis with polyangiitis.**

**Apstrakt**

**Uvod.** Prikazujemo veoma redak slučaj operacije katarakte kod pacijenta sa ekstremnim, opsežnim prednjim stafilomom sklere koji je nastao nakon bilateralnog nekrotizujućeg skleritisa u sklopu granulomatoze sa poliangitisom (GPA). **Prikaz bolesnika.** Muškarac, starosti 61 godinu razvio je obostrani, progresivni nekrotizujući skleritis i periferni ulcerozni keratitis (PUK). Inflamacija je obuhvatila celu prednju polovinu bulbusa i periferiju rožnjače na oba oka. Nakon primene 3 pulsne doze metilprednizolona uz povećanje doze održavanja ciklofosfamida, inflamacije je sanirana u više od 90% površine nekrotične sklere u periodu od 8 nedelja. Sistemska steroidna terapija postepeno je redukovana tokom 6 meseci. Kao posledica teškog oblika nekrotizujućeg skleritisa i PUKa došlo je ekstremnog istanjenja sklere sa prolabiranjem uvealnog tkiva. Šest meseci nakon potpune remisije bolesti uradjena je nekomplikovana operacija katarakte na levom, jedinom funkcionalnom oku. **Zaključak.** Preoperativna i postoperativna kontrola inflamacije, pažljivo planiranje operacije i izbor hirurške tehnike od kritičnog su značaja za optimalan ishod operacije. Prema našem saznanju, fakoemulzifikacija kod pacijenta sa uveičnom kataraktom i ekstremnim prednjim stafilomom do sada nije publikovana.

**Ključne reči:**

**skleritis, periferni ulcerozni keratitis (PUK), stafilom, operacija katarakte, granulomatoza sa poliangitisom.**

## Introduction

Granulomatosis with polyangiitis (GPA), formerly known as Wegener's granulomatosis, is proteinase-3-ANCA-associated vasculitis with a presumed autoimmune aetiology. Necrotising scleritis is an uncommon inflammatory disorder of the sclera. This severe form of scleritis is almost always extremely painful and can lead to vision-threatening complications and visual loss. The presence of necrotising changes and inflammation of the adjacent cornea is highly suggestive of underlying systemic vasculitis, and GPA is the most common form (1). Here, we report a rare case of severe necrotising scleritis associated with peripheral ulcerative keratitis (PUK) that simultaneously occurred in both eyes of a patient with GPA. Recently, uncomplicated cataract surgery was reported in a patient with refractory GPA presented with scleral thinning; however, this was without any signs of associated inflammation or active necrosis (2). To our knowledge, here presented case is the first report of uneventful cataract surgery in a patient with extreme, widespread staphyloma following inflammation that compromised the entire anterior globe and peripheral cornea.

## Case report

A 61-year-old man with a one-year history of GPA developed bilateral rapidly progressive necrotising scleritis and PUK. Acute exacerbation of ocular inflammation occurred during maintenance treatment with oral cyclophosphamide (CYP) (100 mg per day) and 3 months after the induction regimen with 6 CYP pulsed was given (1000mg monthly). The patient presented with extreme discomfort and visual loss. Upon admission, visual acuity was light perception with projection (L+P+) in the right eye and 20/200 (Snellen) in the left eye. An examination revealed white, thinned avascular areas of the sclera and conjunctiva. The area of inflammation involved the entire anterior globe and peripheral cornea of both eyes (Figures 1A and 1B). However, PUK was slightly less severe on his left eye, and a small part of the limbus was uninfamed in the upper temporal quadrant (Figure 1B). Slit-lamp biomicroscopy finding also included anterior chamber inflammation. There were no visible lental opacities in the left eye; however, dense vitreous opacification was observed (vitritis). Fundus examination revealed no clinically significant abnormalities at the posterior pole. Progressive ocular inflammation was associated with a significant increase in serum levels of anti-proteinase-3 (anti-PR3) antibody titre, as well as inflammatory markers. Nonetheless, pulmonary and renal diseases were clinically stable.

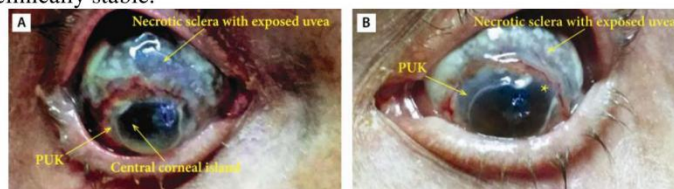


Figure 1.

More than 90% of the surface area healed within 8 weeks following treatment with 3 pulsed doses of methylprednisolone (1000 mg per day) in addition to oral CYP. Systemic steroid therapy was slowly tapered over 6 months. During this time, the patient's visual acuity further declined to L+P- in the right eye and L+P+ in the left eye. Although inflammation was halted in both eyes, advanced prolonged scleral necrosis associated with PUK led to vision loss in his right eye (no light perception) over a period of 12 months after disease onset. B-scan ultrasonography of the right eye revealed a large optic disc cup. Flat anterior chamber in this eye was caused by both extensive posterior synechiae that involved the entire lens surface and anterior peripheral ring-shaped iris synechiae (Figure 2). Pupillary block glaucoma and secondary angle closure may coexist in the eye as a consequence of severe anterior segment inflammation with uveitis.



Figure 2.

In the left eye, following resolution of PUK, the area of contiguous scleral necrosis developed into furrow-like corneal thinning with adjacent widespread anterior staphyloma (Figure 3). Corneal guttering extended circumferentially, leaving central corneal tissue unaffected. Mature cataract with extensive posterior iris synechiae precluded fundus examination (Figure 3D). Visual acuity in the left eye was L+P+. B-scan ultrasound showed a relatively smaller optic disc cup in the left eye than in the fellow eye. Intraocular pressure was within the normal range in both eyes (up to 21 mmHg) during the follow-up of the patient. Active inflammation may suppress ciliary body function, whereas scleral necrosis and consequent scleral thinning may lead to increased aqueous outflow and decreased pressure.



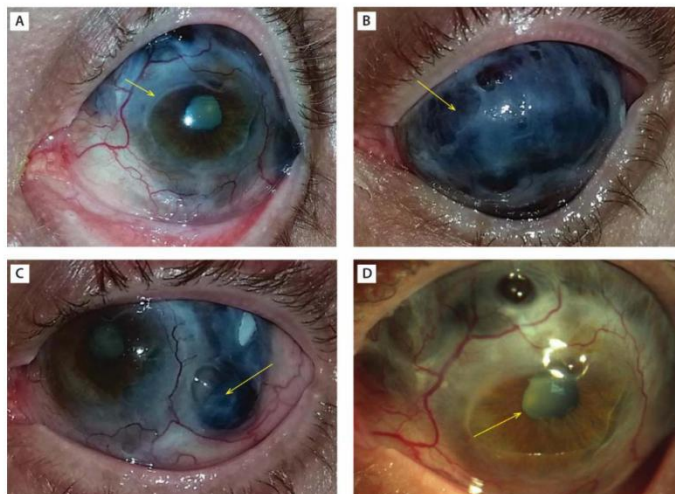


Figure 3.

Once full remission had been achieved for 6 months, cataract surgery was performed in his left eye; only the left eye was functional. We adopted a perioperative immunomodulatory drug regimen from Foster et al. (3) that has been proposed to control inflammation when cataract surgery is performed in uveitic eyes. Oral steroid prophylaxis (0.5 mg /kg/day) was started 1 day before surgery and continued with tapering to the preoperative level over the following month (10 mg/day) while maintaining the dose of concurrent immunosuppressive therapy (CYP, 50 mg per day). In addition, topical dexamethasone 0.1% drops were frequently administered 1 day prior to surgery. Topical steroids were continued with tapering 2 months postoperatively.

Surgery was performed under topical anaesthesia using the Infiniti Vision Phaco System (Alcon, Inc. ). A nearly square clear corneal incision of 2.4 mm width was made at the 10 o'clock meridian with a stainless steel keratome. Corneal incision entry was placed at the inner edge of the peripheral corneal gutter in the nasal eye quadrant corresponding to the area of less severe adjacent anterior staphyloma (Figures 3A and 4). Another 0.6 mm side incision was created in the clear cornea, nearly 90 degrees from the main incision, and the anterior chamber was expanded with a viscoelastic substance comprising sodium hyaluronate 1% (Healon, AMO, Santa Ana, California, USA). Massive posterior iris synechiae were gently loosened by a conventional iris spatula. Next, additional viscoelastic substance was injected to achieve adequate mydriasis. Trypan blue was used to enhance visualisation of the anterior lens capsule. Continuous curvilinear capsulorhexis measuring approximately 5.5 mm in diameter was performed with microforceps. After hydrodissection, phacoemulsification of the nucleus was performed in torsional mode using a 0.9 mm mini/flared aspiration by-pass system (ABS; Alcon, Inc.) with a 45° Kelman tip with an ultrasleeve on an Infiniti Vision System (Alcon, Inc.). Torsional ultrasound amplitude was set at a maximum of 100% with linear control. Longitudinal phaco was off, and Intelligent Phaco was turned on. Surgery was performed with low fluidic parameters (aspiration flow rate 25 cc/min, bottle height 60 cm and vacuum 350 mm Hg). The same parameters were used for direct chopping and quadrant removal. Following unimanual aspiration of the residual cortex, a foldable hydrophilic IOL (LEDaphil IOL, Optix) was

6

implanted in the capsular bag with an injector through the main incision. The method for IOL implantation was strictly consistent with product manuals. Additional 10-0 nylon interrupted sutures were placed along the corneal guttering to provide adequate wound closure (Figure 4). Following cataract surgery, visual acuity slightly improved from L+P+ to 20/400 (Snellen). Fundus examination revealed untreatable findings, including a pale, atrophic optic disc and retinal gliosis.

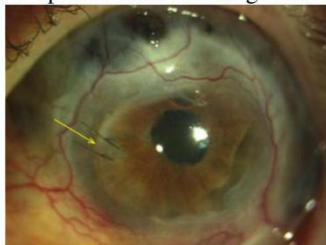


Figure 4.

The patient underwent regular clinical, serological, and immunologic examinations for disease activity and extent, as well as for treatment-related side effects. Serum anti-PR3 antibody titres and inflammatory markers were within the normal range before cataract surgery and during the 1-year follow-up after cataract surgery. Two years after the initial presentation and one year following cataract surgery, the patient remained in remission with an uncorrected visual acuity of 20/400. The mechanisms contributing to vision loss in the right eye and restricted vision in his left eye most likely included vascular occlusion and inflammatory destruction of the retina and optic nerve, as well as retinal findings related to the underlying GPA disease associated with prolonged inflammation, loss of structural tissue and secondary glaucoma.

## Discussion

The management of GPA-associated PUK is challenging and lacks definitive guidelines. Rituximab and CYP, either alone or in combination with other agents, are the most successful agents in controlling inflammation (1). In our patient, the introduction of high-dose pulsed methylprednisolone in addition to maintenance doses of prednisone and increased oral CYP treatment arrested bilateral necrotising scleritis and PUK with generalised GPA associated with ophthalmic inflammation refractory to CYP induction regimen.

Presence of long-standing anterior uveitis associated with severe scleral tissue necrosis as well as chronic corticosteroid usage may lead to the formation of a cataract. Uneventful cataract extraction or any other surgical procedure can precipitate necrotising scleritis in patients with an underlying autoimmune vasculitic systemic disease (4, 5). Therefore, surgery should be attempted only in the absence of scleral inflammation and during remission of systemic disease.

Although the diagnostic value of a positive PR-3 ANCA (c-ANCA) for GPA is well established, the usefulness of measuring ANCA titres in assessing disease activity and guiding therapy is somewhat controversial. In one study of 20 patients with refractory ophthalmic GPA, disease relapse seemed to be predicted by rising anti-PR3 titres (6). However, this finding was not confirmed in another similar study on ocular GPA (7).

Nevertheless, since increases in ANCA occur in some patients prior to relapse, serial measurement of the cANCA titre was performed in our patient. Serum anti-PR3 antibody titres were within the normal range before cataract surgery and during the follow-up period after cataract surgery, which lasted 12 months.

Successful surgery generally requires a quiet eye devoid of active inflammation for at least 3 months (1). In our patient, phacoemulsification was performed 6 months after full remission of ocular disease activity had been achieved. Preoperative addition or increase in systemic therapy, mainly corticosteroids, seems to be mandatory in eyes at risk of developing disease recurrence, such as necrotising scleritis or PUK. In a study by O'Donoghue (8), patients who had recovered from SINS and required further ocular surgical procedures were given perioperative pulsed methylprednisolone to protect against the recurrence of necrotising disease. Here, we demonstrated that standard perioperative oral steroid prophylaxis that is currently proposed to control inflammation for cataract surgery in uveitic eyes was also sufficient to prevent SINS.

Phacoemulsification using a clear corneal approach is generally preferred in patients in remission from PUK (1). O'Donoghue et al. (8) showed that surgically induced necrotising scleritis usually occurred after cataract surgery and that the disease site was closely related to the wound site; 80% of these sites were limbal. This finding suggests that greater relative vascular disruption associated with the limbal approach may be a contributing factor in scleral disease development (8). Dick et al. (9) also demonstrated that compared to surgery through a sclerocorneal incision, cataract extraction through a clear corneal incision results in less inflammation in the immediate postoperative period. Generally, we make a clear corneal incision temporally. Here, a clear corneal incision was rotated to the nasal eye quadrant. In this area, the adjacent anterior staphyloma was slightly less severe than the extreme scleral thinning in both superior and temporal eye quadrants (Figures 3B and 3C). A corneal incision was made on the corneal guttering; thus, single corneal sutures with 10-0 nylon were required to ensure adequate wound closure (Figure 4). Interestingly, although necrotising scleritis after ocular surgery has been described in patients after cataract surgery via a corneal incision, O'Donoghue and coauthors found that sutures used to close the wound had entered the sclera (8).

To increase the safety of cataract surgery, reduce trauma to the surrounding tissue, and particularly to avoid rupture of the ciliary staphyloma, we combined lower fluidic parameters and a low bottle height with a torsional ultrasound setting. For uncomplicated cataract surgery, we generally prefer to use higher fluidic parameters, such as flow rate 35 cc/min, bottle height 100 cm, and vacuum limit 550 mmHg. Vasada et al. (10) evaluated the impact of different flow rates on corneal thickness (CCT), anterior segment inflammation, and endothelial cell density (ECD) using longitudinal ultrasound. These authors found that compared with high flow parameters, lower aspiration flow rates resulted in a reduced rate of increased CCT in the initial week after surgery and decreased anterior segment inflammation. Another important benefit of low aspiration flow rates and low bottle height is lower intraoperative IOP associated with these parameters (10,11). Although relevant in all eyes, this benefit is particularly important in eyes with glaucoma or other vascular compromise (10), as well as in patients with extensive anterior staphyloma.

**In conclusion,** phacoemulsification can be successfully performed in a patient with coexisting uveitic cataract and staphyloma of the entire anterior globe following necrotising scleritis with PUK. Preoperative and postoperative control of inflammation, careful surgical planning and meticulous surgical techniques are critically important for optimal surgical outcomes. The final visual outcome depends on the posterior segment complications of necrotising scleritis associated with GPA.

#### FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Clinical pictures of the right (A) and left eye (B) showing severe bilateral necrotising scleritis associated with PUK. Inflammation affected the entire anterior hemisphere of the sclera and peripheral cornea, leaving a central corneal island uninvolved in both eyes.

Slightly less severe PUK on his left eye with a small part of the unaffected limbus (asterisk) in the upper temporal quadrant (Figure 1B).

**Figure 2.** Slitlamp examination of the patient's right eye showing flat anterior chamber (arrow) associated with corneal scarring following resolution of a severe anterior segment inflammation.

**Figure 3.** Clinical photograph of the patient's left eye, examined in daylight, showing the extensive area of anterior staphyloma and an inactive corneal gutter (arrow) following resolution of a severe sclerokeratitis episode (A). Clinical pictures of the upper scleral hemisphere of the left eye (B) and temporal scleral region in the same eye (C). Of note is the extraordinary degree of scleral loss with a uveal bulge (arrows). This uvea is covered by remaining scleral fibres and a thin layer of conjunctival epithelium only (B and C). Slit-lamp examination showing uveitic cataract with extensive posterior synechiae (D).

**Figure 4.** Slit-lamp examination of the patient's left eye one week after uneventful cataract surgery. A clear corneal incision was made in the nasal eye quadrant at the edge of the remaining central corneal island (arrow).

#### REFERENCES

1. *Ebrahimiadib N, Modjtahedi BS, Roohipoor R, Anesi SD, Foster CS.* Successful treatment strategies in granulomatosis with polyangiitis-associated peripheral ulcerative keratitis. *Cornea* 2016; 35:1459-1465
2. *Alfawaz AM.* Successful cataract surgery in a patient with refractory Wegener's granulomatosis effectively treated with rituximab: A case report. *Saudi J Ophthalmol* 2016; 30:194-197
3. *Foster CS, Kothari S, Anesi SD, Vitale AT, Chu D, Metzinger JL, Cerón O.* The Ocular Immunology and Uveitis Foundation preferred practice patterns of uveitis management. *Surv Ophthalmol* 2016; 61:1-17
4. *Solebo AL, Ahmadi-Lari S, Petrou P, Westcott M.* Bilateral surgically induced scleritis following phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33:1485-1487
5. *Stokes J, Wright M, Ramaesh K, Smith C, Dhillon B.* Necrotizing scleritis after intraocular surgery associated with the use of polyester nonabsorbable sutures. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29:1827-1830
6. *Joshi L, Lightman SL, Salama AD, Shirodkar AL, Pusey CD, Taylor SR.* Rituximab in refractory ophthalmic Wegener's granulomatosis: PR3 titers may predict relapse, but repeat treatment can be effective. *Ophthalmology* 2011; 118:2498-503
7. *Joshi L, Tanna A, McAdoo SP, Medjeral-Thomas N, Taylor SR, Sandhu G, Tarzi RM, Pusey CD, Lightman S.* Long-term outcomes of rituximab therapy in ocular granulomatosis with polyangiitis: Impact on localized and nonlocalized disease. *Ophthalmology* 2015; 122:1262-8
8. *O'Donoghue E, Lightman S, Tuft S, Watson P.* Surgically induced necrotising sclerokeratitis (SINS)-precipitating factors and response to treatment. *Br J Ophthalmol* 1992; 76:17-21
9. *Dick HB, Schwenn O, Kruppenauer F, Krist R, Pfeiffer N.* Inflammation after sclerocorneal versus clear corneal tunnel phacoemulsification. *Ophthalmology* 2000; 107:241-7
10. *Vasavada AR, Praveen MR, Vasavada VA, Raj SM, Asnani PK, Garg VS.* Impact of high and low aspiration parameters on postoperative outcomes of phacoemulsification: randomized clinical trial. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36:588-93
11. *Vasavada V, Raj SM, Praveen MR, Vasavada AR, Henderson BA, Asnani PK.* Real-time dynamic intraocular pressure fluctuations during microcoaxial phacoemulsification using different aspiration flow rates and their impact on early postoperative outcomes: a randomized clinical trial. *J Refract Surg* 2014; 30:534-40

Received on October 29, 2018.

Revised on January 12, 2019.

Accepted on January 23, 2019.

Online First January, 2019.