



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

др сци. мед. Оливера Милошевић Ђорђевић

Крагујевац, 2020. година

Захвалница

Библиографија

Радови у часописима на SCI листи који су део 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)**

Сажетак

Увод. У готово 90% одрасле популације присутна су антитела према типу 1 *Herpes simplex* (HSV-1) вируса. Интерферони типа III (IFN- λ) 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- λ) 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.

САДРЖАЈ:

1. УВОД.....	11
1.1. Анатомија и функција рожњаче.....	11
1.2. Општи патолошки процеси у рожњачи.....	13
1.3. Херпетични кератитис	15
1.3.1. Патогенеза херпетичног кератитиса.....	15
1.3.2. Имуно-патологија херпетичног кератитиса	17
1.3.3. Улога Th1, Th17, и CD8 T-ћелија у настанку херпетичних кератитис лезија	19
1.3.4. Облици херпетичног кератитиса.....	22
1.3.5. Епидемиолошке карактеристике херпетичног кератитиса	25
1.4. Херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1).....	26
1.5. Механизми реактивације HSV-1 вируса	28
1.5.1. Вирусни утицај на имунски систем домаћина	29
1.5.2. Спољни фактори који су укључени у реактивацију HSV-1 вируса	30
1.5.3. Епигенетска регулација реактивације HSV-1 вируса	33
1.5.4. Фолна киселина	34
1.5.5. Витамин B12.....	35
1.6. Интерлеукин IL28B.....	36
1.6.1. Структура гена који кодира интерлеукин IL28B	39

2. Циљеви, хипотезе и значај истраживања	41
2.1. Циљеви истраживања	41
2.2. Хипотезе истраживања	41
2.3. Значај истраживачког питања	42
3. Материјал и методе	43
3.1. Врста студије.....	43
3.2. Популација која се истражује.....	43
3.2.1. Величина узорка	45
3.3. Узорковање и методе анализе	45
3.3.1. Иmunске анализе	45
3.3.2. Ниво фолне киселине и витамина В12.....	46
3.3.3. Генотипизација <i>IL28B</i>	46
3.4. Статистичка обрада података.....	48
4. Резултати	49
4.1. Одређивање <i>IL28B</i> rs12979860 генотипова и њихова дистрибуција	51
4.2. Фолна киселина, витамин В12 и број рецидива	56
5. Дискусија.....	60
6. Закључци	70
7. Попис ознака и скраћеница	72
8. Списак слика, табела и графикана.....	74

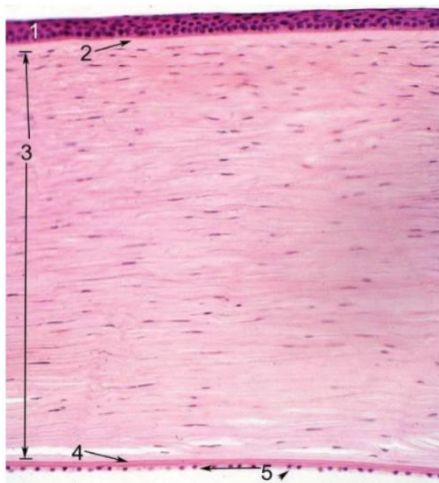
9. ЛИТЕРАТУРА	76
Библиографија научних радова	90

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.images.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 μm 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 остелјивост 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 *rampis* (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*), Фуксова 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. *Leucoma* 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 иреверзибилних 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 Десцететовој мембрани), или током дистрофије и дегенерације рожњаче (нпр. вишак гликозаминогликана у строми и ендотелу у макуларној дистрофији) (1).

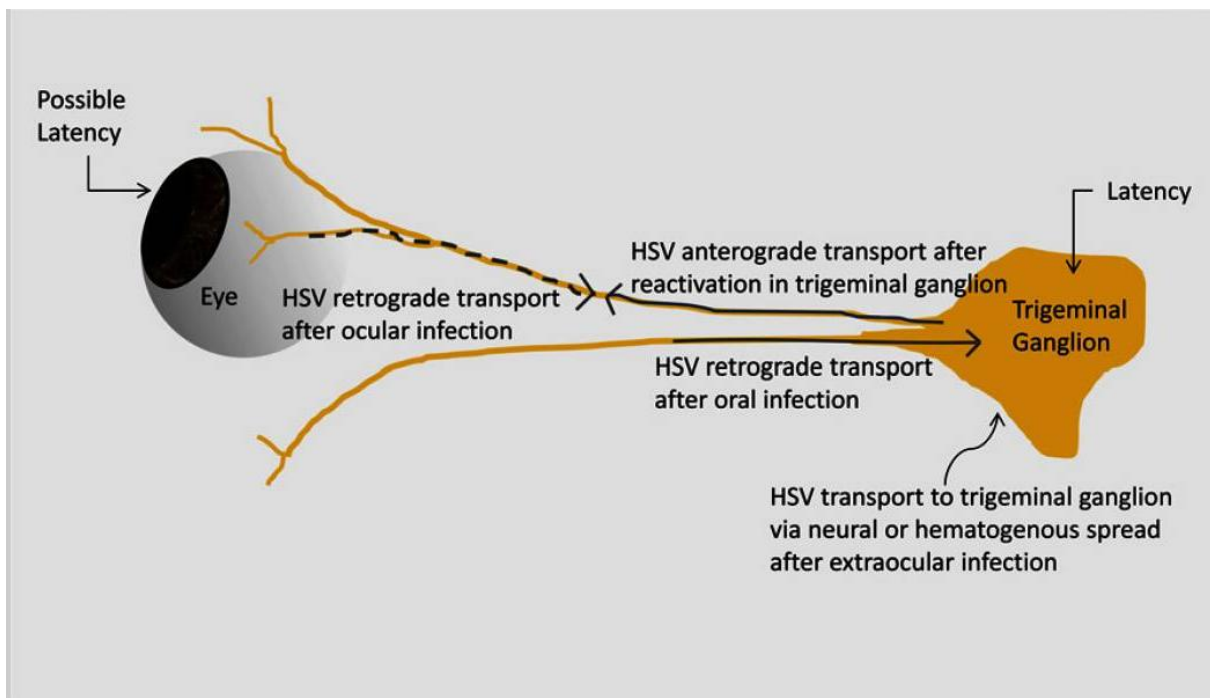
Депозити егзогеног порекла су у највећој мери резултат таложења лекова, и то више од 50 врста лекова (1).

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*).

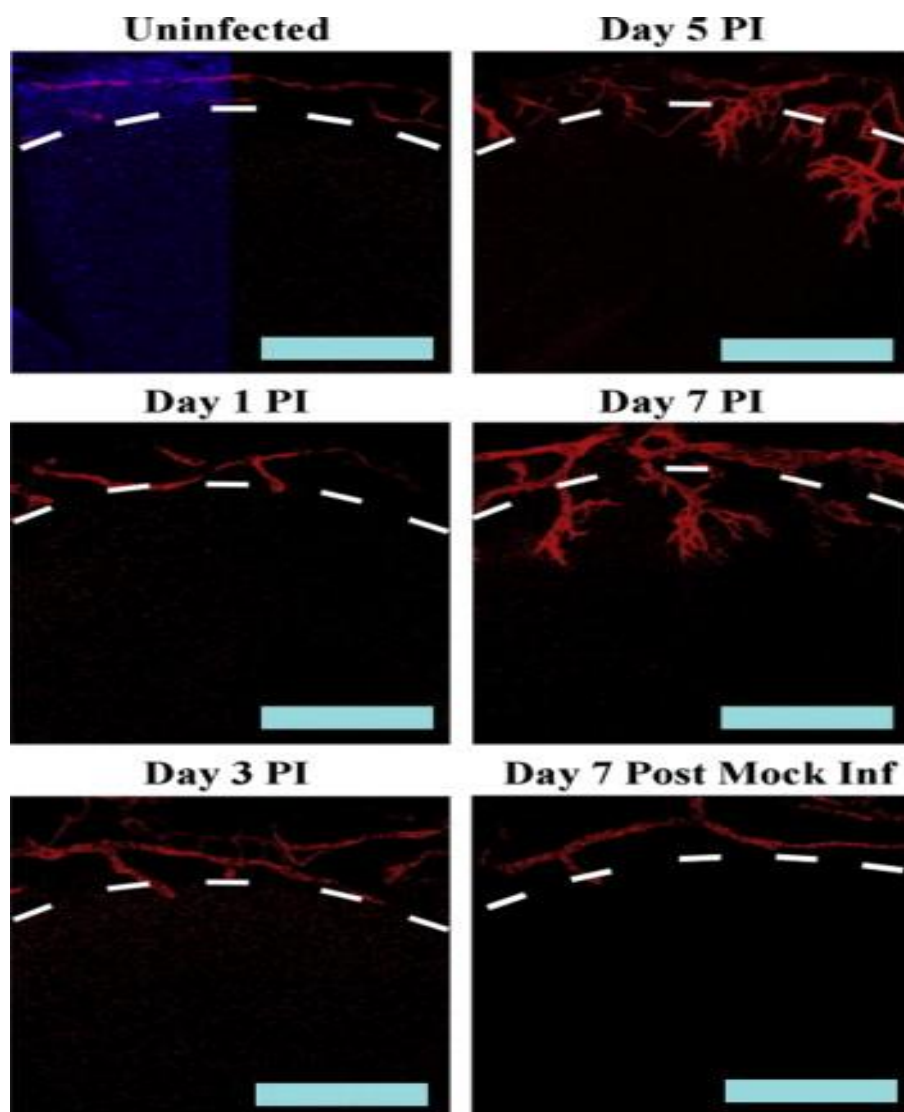
Латентна фаза HSV-1 вируса у рожњачи домаћина је контроверзна тема, пре свега, због неразумевања начина одржавања исте (22).

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*).

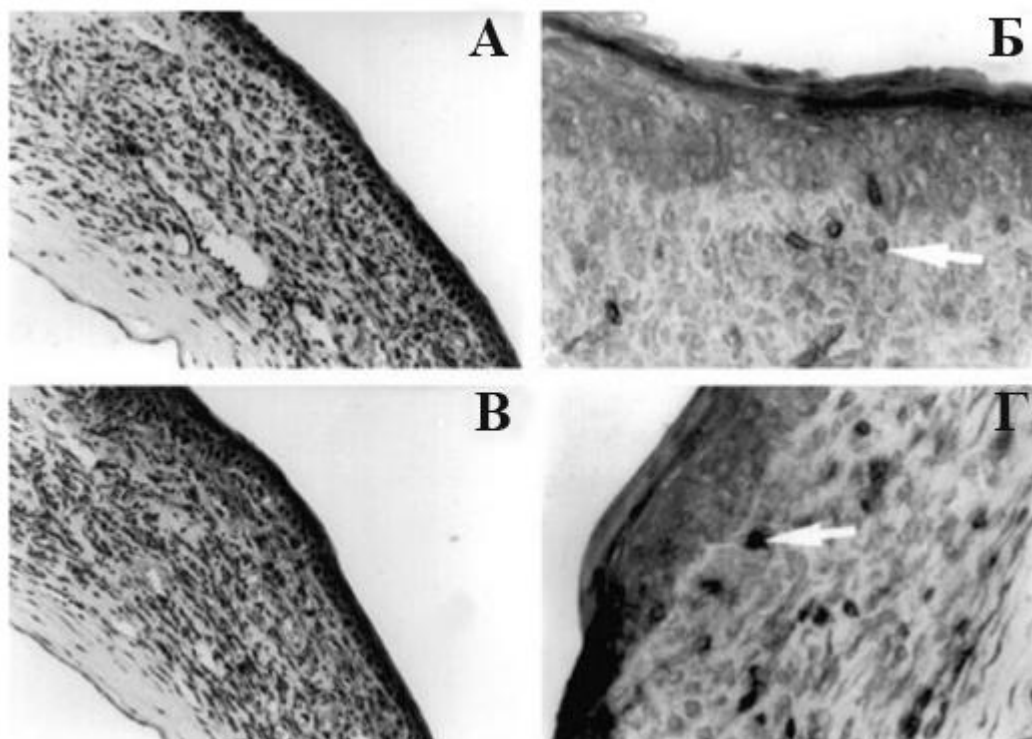
Велико ограничење коришћења мишева у експерименту настаје због тога што се углавном ради о примарној инфекцији, али не и рекурентној болести, што је у већини случајева код људи. Ако се посматра имуни одговор на HSV-1 окуларну инфекцију он укључује две фазе, урођене и адаптивне компоненте имуног система (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- γ 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- γ 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 подскупине 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).

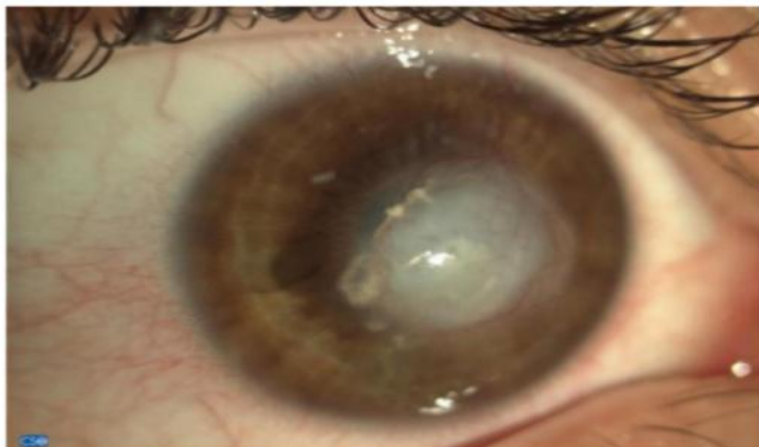
HSV-2 инфекција се ретко може јавити на оку и у већини случајева се ради о неонаталном конјунктивитису (53).

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).

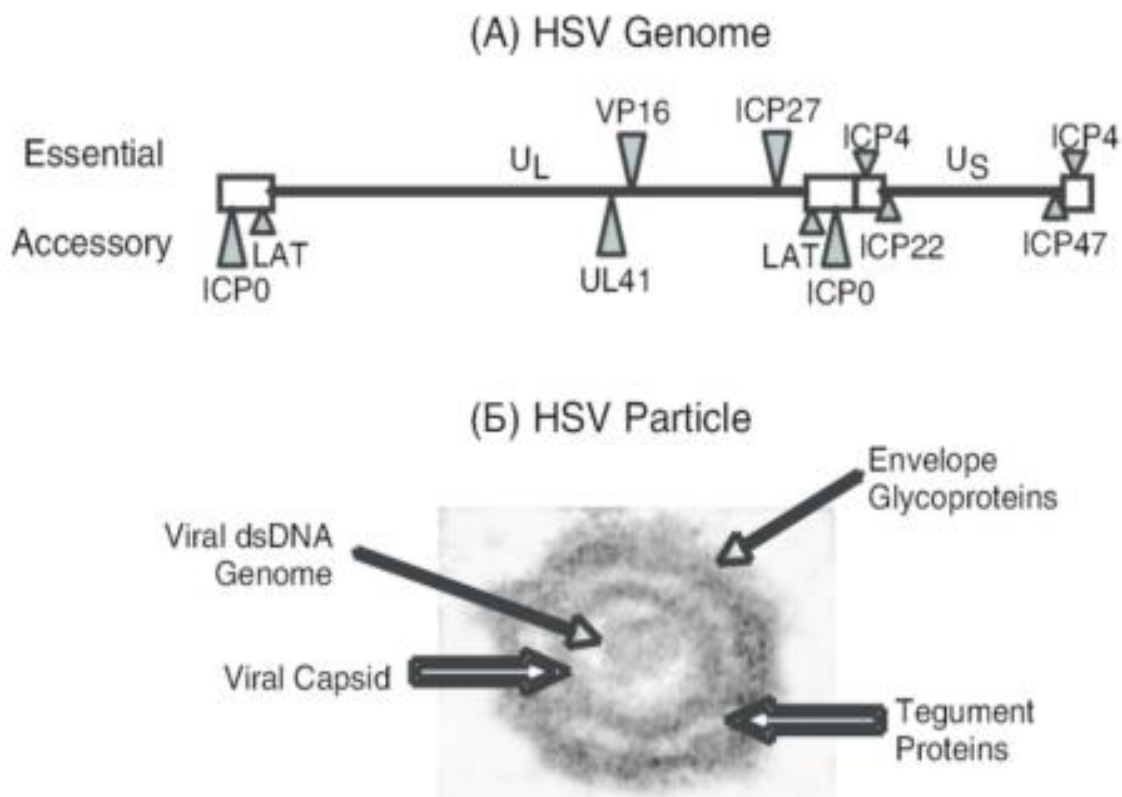
Шире епидемиолошке студије у нашој земљи за рекуретни херпетични кератитис нису рађене. Прецизне податке о глобалном утицају херпетичког кератитиса је тешко утврдити због недостатка свеобухватних епидемиолошких студија.

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 варицела 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 ендеогеном 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. (A) 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. (B) 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 мутирали 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).

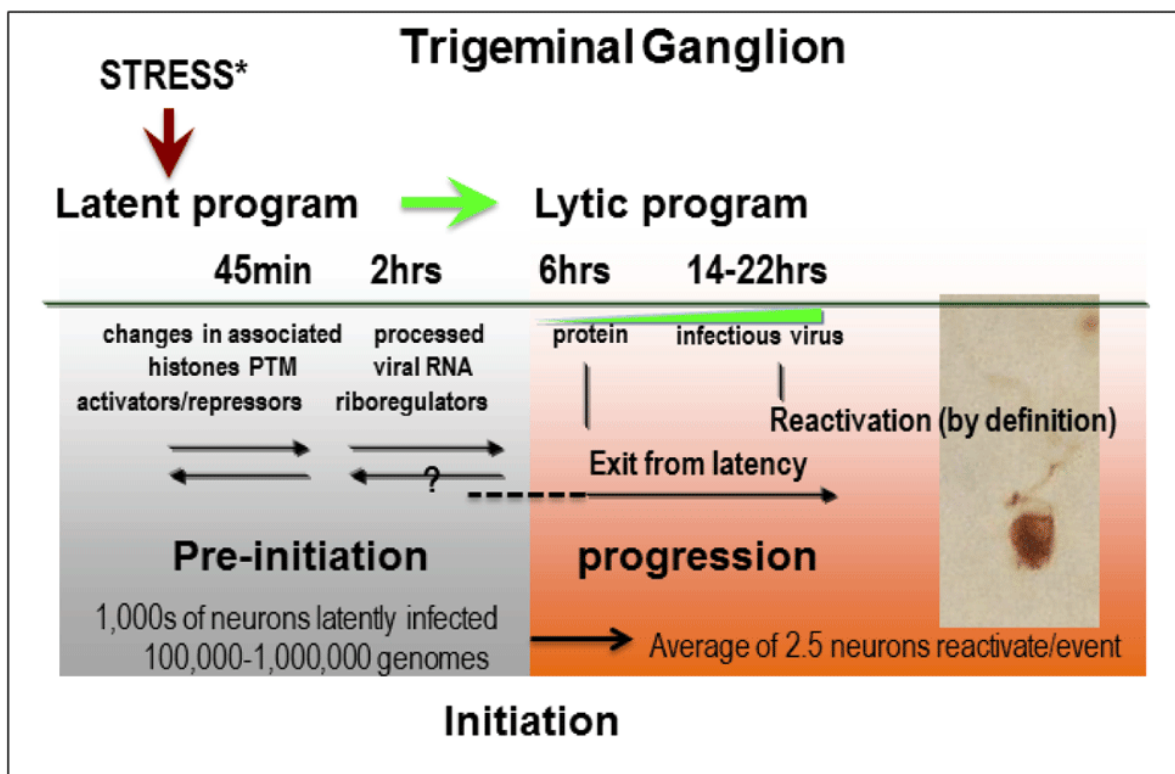
Манипулација имунским системом домаћина нуди реактивираним вирусима делимично олакшање од имунског надзора домаћина. Еволуција је очигледно избалансирала ову могућност на тај начин да ипак имуни систем домаћина контролише репликацију самог вируса тако да постоји равнотежа.

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- γ 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).

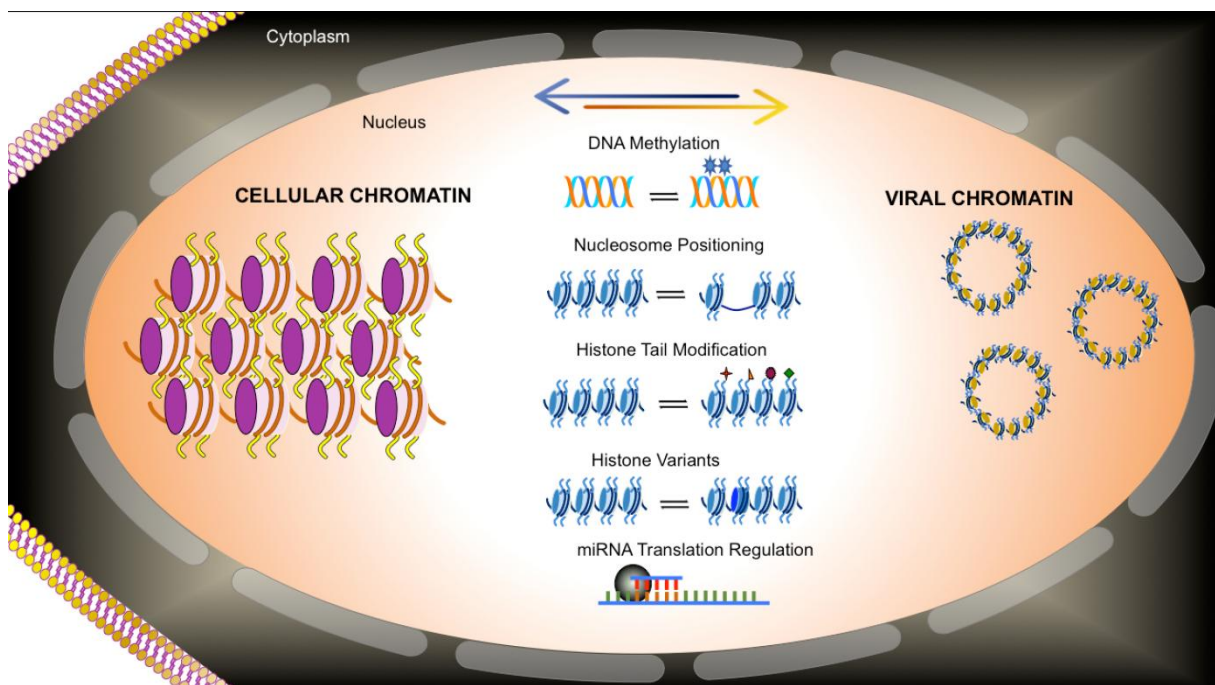
Познато је да психички и физички стресори утичу на активност CD8 Т-ћелија ослобађањем неуроендокриних фактора, то је механизам који може повезати контролу латенције HSV са активношћу симпатичког нервног система (84).

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 додатак 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-хидроксиптеридинског 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).

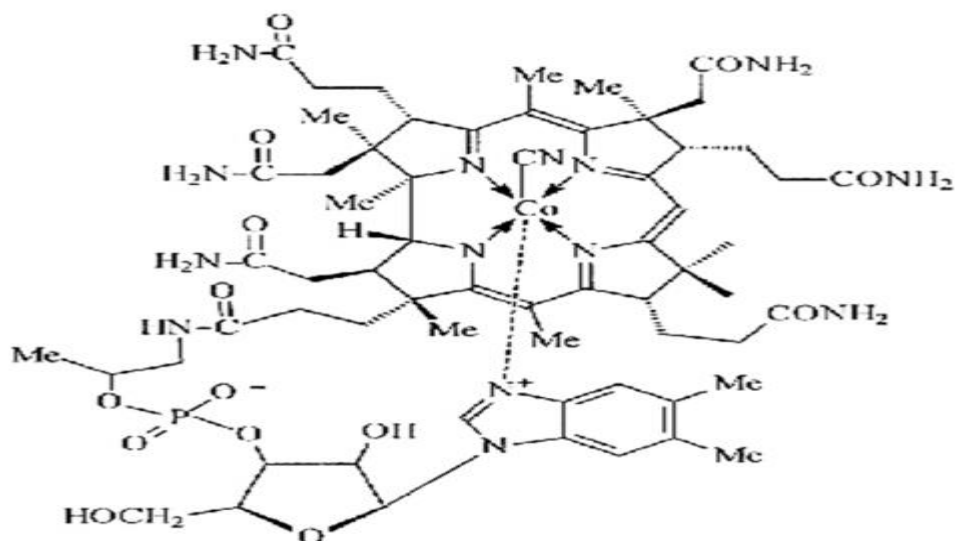


Слика 9. Хемијска структура фолне киселине (извор, Живановић В. и Костић Д. 2008).

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-λ3), заједно са IL-28A и IL-29 (који се такође називају и интерферони IFN-λ1, IFN-λ2) чине нову удружену породицу унутар интерферона IL-10 (95).

Интерферони ламбда (IFN-λ) показују бројне биолошке карактеристике сличне онима које имају IFN-α/β, укључујући антивирусну активност, антипролиферативну активност као и *in vivo* антитуморско деловање. Сигнализацијом и проласком кроз хетеродимерни комплекс 28Rα/IL-10Rβ интерферони ламбда IFN-λ врше своје антивирусне и имунорегулационе активности (96, 97). Доказана је антивирусна активност која је повезана са интерферонима ламбда IFN-λ и са активирањем интерфероном стимулираних гена (од. енгл. *interferon-stimulated gene ISG*) (98). Овај облик деловања је основни механизам за инхибиторни ефекат IFN-λ 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-λ у серуму и исходом лечења код инфекције вирусом хепатитиса C (100, 101).

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

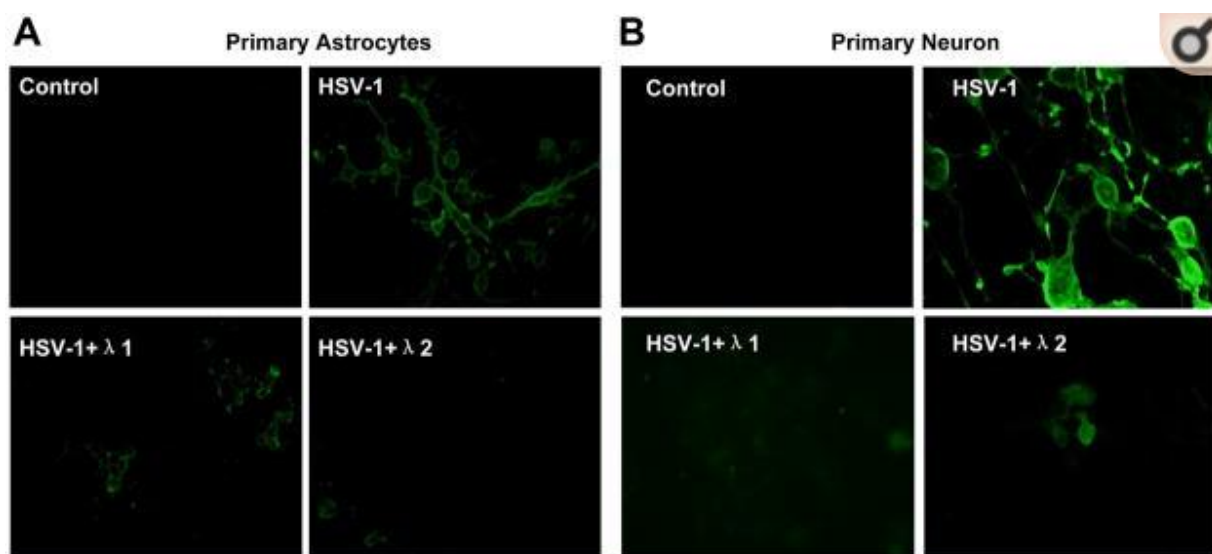
Интерферони-α/β имају основну улогу у урођеном имунитету ћелија домаћина против свих вирусних инфекција. Поставља се важно питање да ли интерферони IFN-λ имају способност активирања путева који индукују експресију IFN-α/β и IFN-стимулисаних гена (ISG)?

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

Интерферон- λ има релативно широку дистрибуцију у ткивима, што сугерише да многа ткива садрже ћелије које реагују активно на IFN- λ . 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).

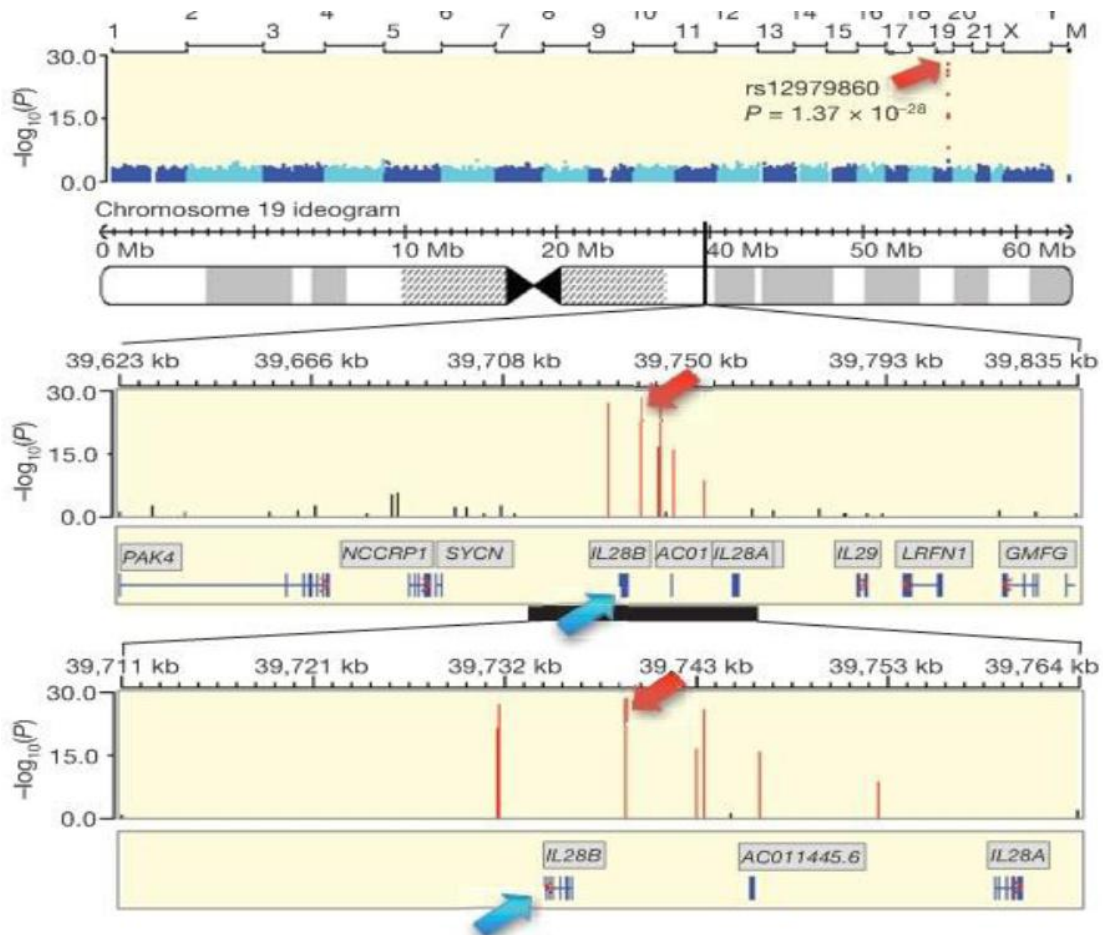
Способност IFN- λ да модулира имунски одговор *in vitro* је проучаван одвојено од његових антивирусних имунских одговора (106). Доказано је да IFN- λ може да регулише експресију хемокина различитих ћелија (107).



Слика 11. IFN- λ 1 и IFN- λ 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- λ 1 и IFN- λ 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 kbp 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 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 генотипирању испитаника са рекурентним херпетичним стромалним кератитисом за *IL28B* и могућем утицају генотипа на настанак рекурентног 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 рекурентним херпетичним кератитисом. Витамин В12 и фолна киселина се први пут доводе у везу са рекурентним херпетичним кератитисом као доказани модулатори ДНК молекула.

Досадашња истраживања приказана у уводном делу показују да вирусне инфекције које могу индуковати експресију *IFN- α/β* такође стимулишу експресију *IFN- λ* . 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*)- λ 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 сертификована 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 В12. Рецидиви су дефинисани као епителни кератитис, стромални кератитис, ендотелитис, иридоциклитис или као комбинација наведених облика.
6. Дванаест месеци пре одређивања нивоа витамина В12 и фолне киселине испитаници нису користили суплементацију комплекса витамина В 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 χ^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. Имуњске 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 киселне 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.

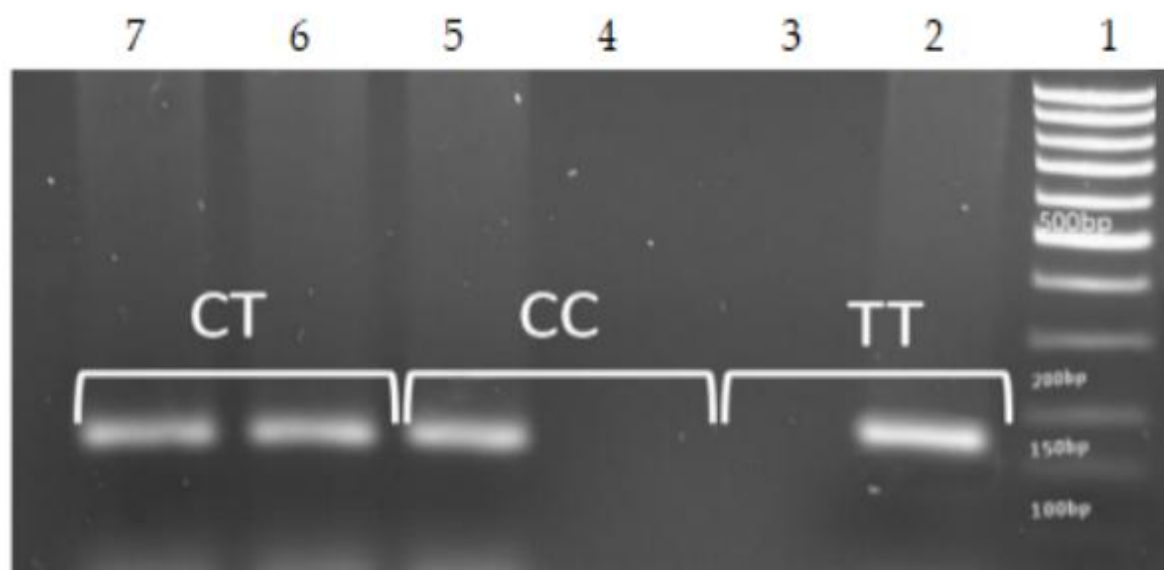
За испитивање полиморфизма коришћен је SSP-PCR (Specific Primer-Polymerase Chain Reaction) која умножава кратко ДНК подручје узводно или низводно од полиморфизма помоћу специфичног прајмера за алел (Табела 1) (110). PCR производи су анализирани у 2% агарозном гелу уз бојење етидијум бромидом (Слика 13). 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). Ланија 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 рекурентног стромалног херпетичког кератитиса анализирани су применом χ^2 теста, уз праг значајности од 0,05.

Илустрација асоцијације између генотипова и ризика за настанак рекурентног 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 рекурентног 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%)

\bar{x} - аритметичка средина \pm С.Д.- стандардна девијација, М, мушки пол ; Ж, женски пол.

4.1. Одређивање *IL28B* rs12979860 генотипова и њихова дистрибуција

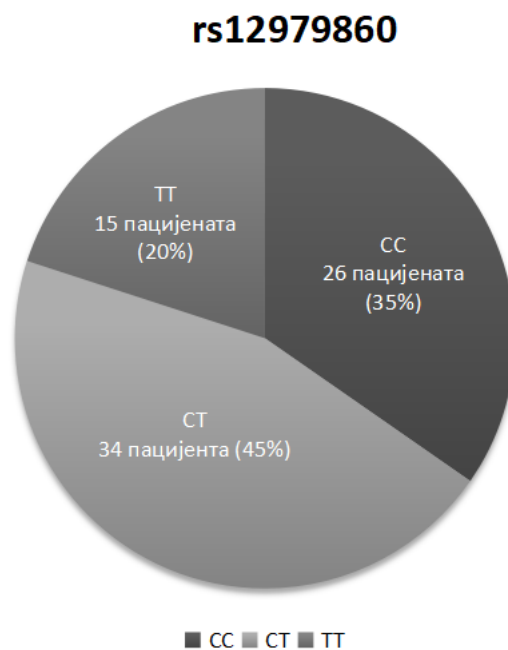
Дистрибуција *IL28B* rs12979860 генотипова за испитивани полиморфизам је у складу са Hardy-Weinberg еквилибријумом (HWE) (Табела 3).

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

<i>IL28B</i> полиморфизам	Генотип %	χ^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.



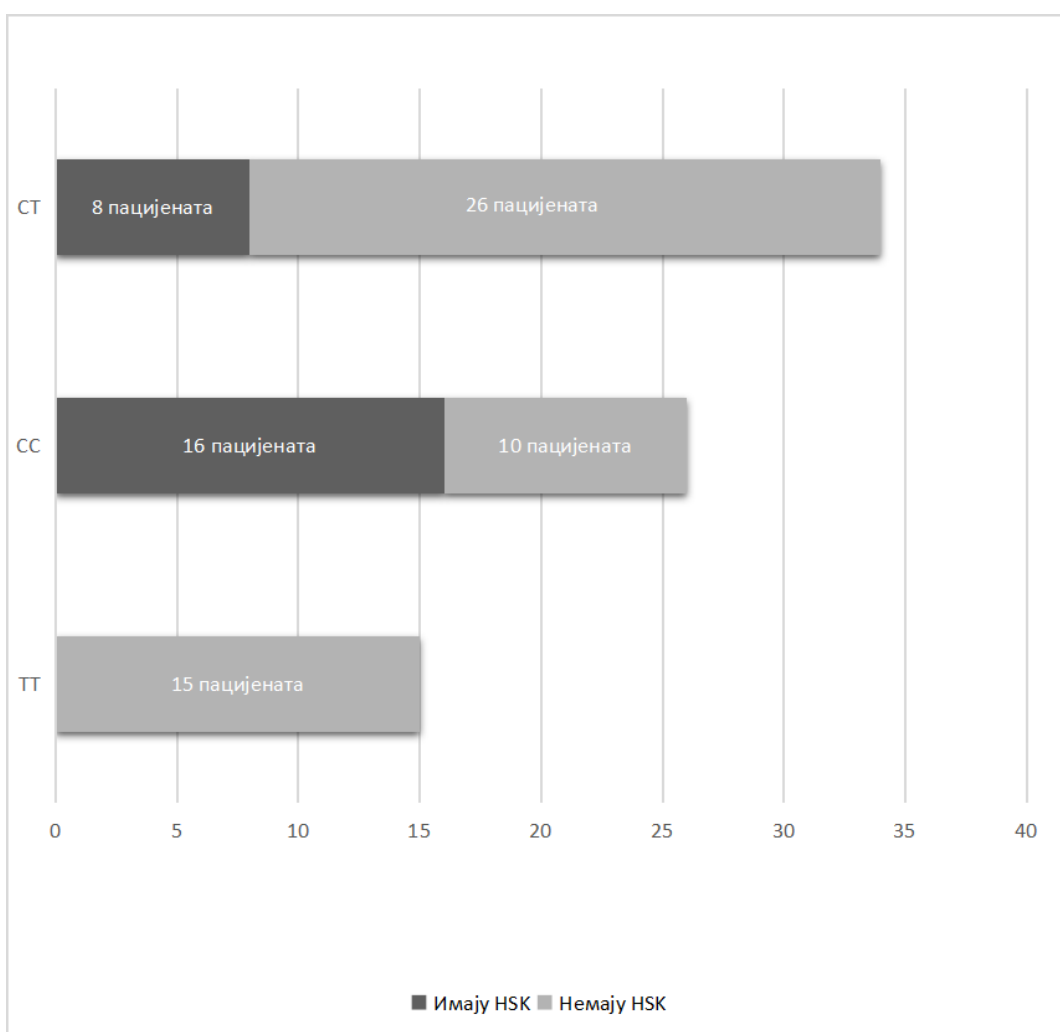
Слика 14. Дистрибуција *IL28B* rs12979860 генотипа у целокупној студијској популацији. Процентуална дистрибуција за *IL28B* rs12979860. CC: CCrs1279860, CT: CTrs1279860, TT: TTrs1279860.

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 рекурентни стромални херпетични кератитис.



Слика 15. Дистрибуција генотипова *IL28B* према клиничкој манифестацији рекурентног 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.

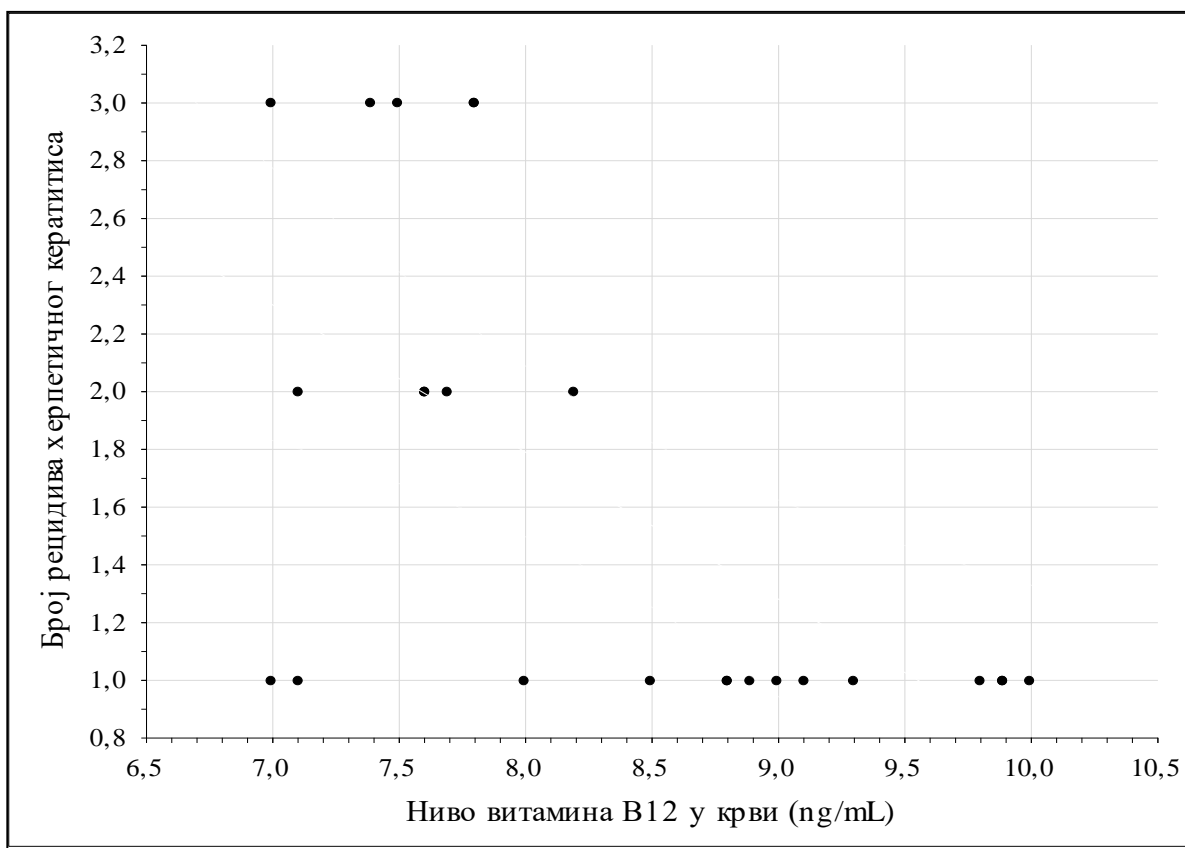
Код испитиваних пацијената ниво витамина В12 у крви кретао се у оквиру референтних вредности (6,9 - 44,4 ng/mL) и на основу коефицијента варијације ($c_v < 30\%$) био је хомоген, табела 6. Такође, ниво фолне киселине у крви посматраних пацијената кретао се у оквиру референтних вредности (4,6 - 18,7 ng/mL) 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 χ^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 ($p < 0,01$).

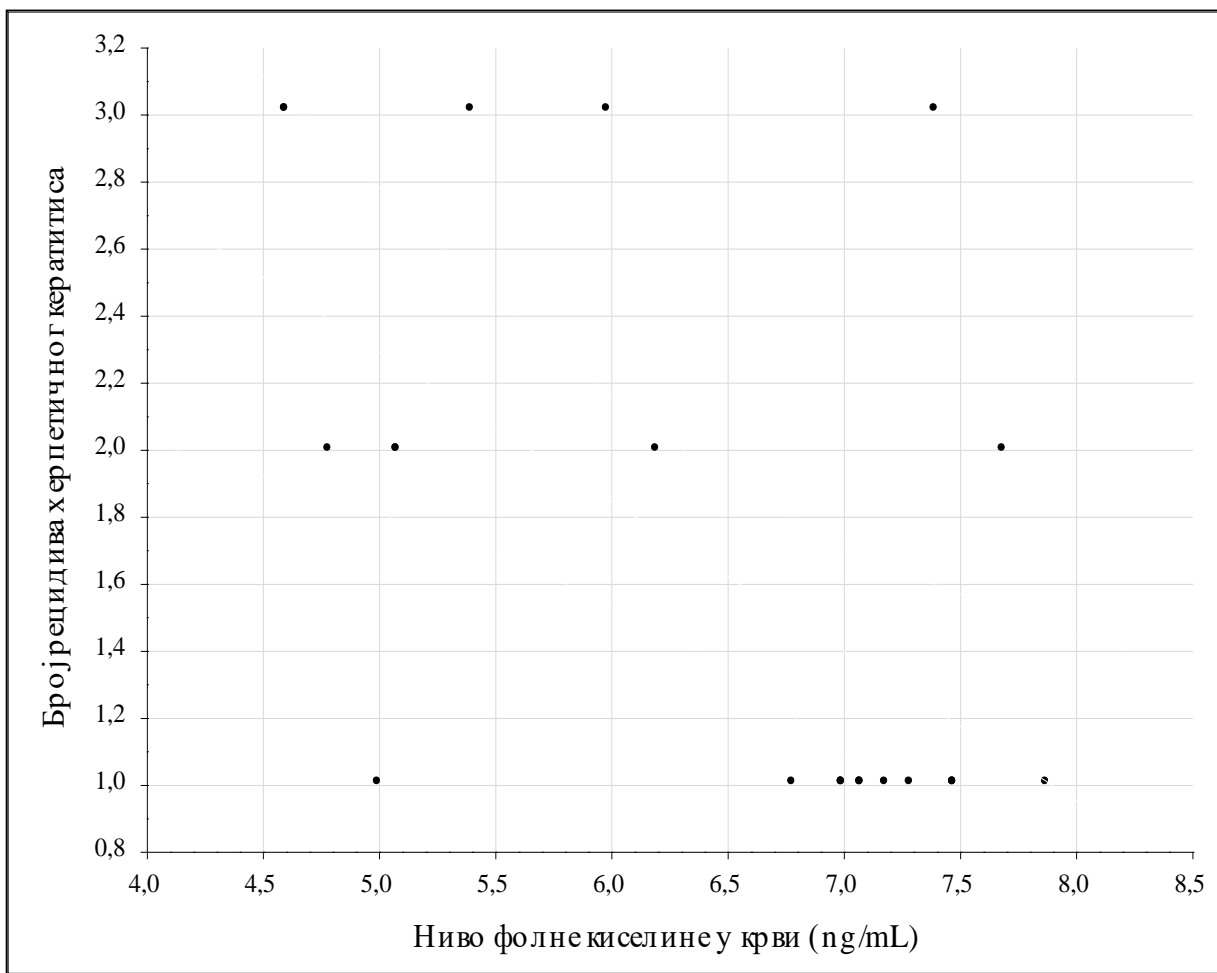
Табела 6. Статистички показатељи за анализирание карактеристике крви и број рецидива херпетичног кератитиса

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 ($p=-0,619$; $t=3,694$; $p=0,001$) и нивоа фолне киселине у крви ($p=-0,518$; $t=2,843$; $p=0,009$). 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- λ повезана са рецидивом и озбиљношћу рекурентне HSV-1 болести (99).

Откривено је да интерферони типа III (IFN- λ) 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- λ резултирало значајним сузбијањем репликације HSV-1 у астроцитима и у неуронима. Ово истраживање је повезано са регулацијом ендogene функције интерферона- α/β и неколико интерферон стимулираних гена (ISG) (98). Ови налази показују да интерферон- λ 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 B12 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 додатак витамина B12 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 B12 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 B12 на ризик за настанак карцинома грлића материце. Закључили су да фолати и витамин B12 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 B12 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 малигнућ 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 завистан 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 TTrs12979860.
4. Иако су генотипови CTrs12979860 и TTrs12979860 чешће изоловани код појединаца са лабијалним херпесом, HSV-серопозитивни појединци који изражавају CCrs12979860 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 В12 у крви и фолне киселине у акутној фази болести.

8. 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.

7. Попис ознака и скраћеница

HSV-1 - херпес симплекс вирус тип 1

CD4 T - помоћне T ћелије имуног система

PCR - ланчана реакција полимеразе

Th1 - помоћне T ћелије имуног система

IFN- γ - интерферон гама

IL-2 - интерлеукин 2

T-bet - фактор транскрипције

Th17 - помоћне T ћелије имуног система

ROR- γ - транскрипциски 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 T ћелије имуног система

HSK - херпес симплекс кератитис

VZV - варицела зостер вирус

HSV-2 - херпес симплекс вирус тип 2

CMV - цитомегаловирус

EBV - Epstein-Barrov 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- λ 1 - интерферон λ 1

IFN- λ 2 - интерферон λ 2

IL-10 - интерлеукин 10

IFN- α/β интерферон α/β

28R α /IL-10R β хетеродимерни комплекс

IFN- λ - 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	11
Слика 2. Шема транспорта HSV-1 вируса из латентне фазе у рецидив.	16
Слика 3. HSV-1 инфекција рожњаче код мишева	18
Слика 4 . Хистопатолошки пресек рожњаче зараженог миша.....	20
Слика 5. Рекурентни херпетични кератитис са васкуларизованим променама на рожњачи.....	23
Слика 6. HSV-1 организација генома	27
Слика 7. Тригеминални ганглион (TG) латентно инфицираних мишева садржи вирусни геном	30
Слика 8. Вирусна епигенетска регулација реактивације	34
Слика 9. Хемијска структура фолне киселине	35
Слика 10. Хемијска структура витамина B12.....	36
Слика 11. IFN-λ1 и IFN-λ2 инхибирају експресију протеина HSV-1 вируса у хуманим астроцитима и неуронима.....	39
Слика 12. Садржај и структура <i>IL28B</i> гена, rs12979860 3 kbp узводно од <i>IL28B</i> гена	40
Слика 13. Полиморфизам rs12979860.....	48

Слика 14. Дистрибуција <i>IL28B</i> rs12979860 генотипа у целокупној студијској популацији.....	52
---	----

Слика 15. Дистрибуција генотипова <i>IL28B</i> према клиничкој манифестацији рекурентног стромалног HSV кератитиса.....	54
---	----

Табеле:

Табела 1. Нуклеотидне секвенце прајмера коришћених у нашој студији за <i>IL28B</i>	47
--	----

Табела 2. Демографске карактеристике популације.....	50
--	----

Табела 3. Дистрибуција генотипа за испитивани полиморфизам и Hardy-Weinberg еквилибријум.....	51
---	----

Табела 4. Дистрибуција <i>IL28B</i> rs12979860 генотипа у целој студијској групи.....	53
---	----

Табела 5. Јачина асоцијације генотипа СС, ТТ и појаве рекурентног стромалног херпетичног кератитиса.....	55
--	----

Табела 6. Статистички показатељи за анализиране карактеристике крви и број рецидива херпетичног кератитиса.....	57
---	----

Графикони:

Графикон 1. Однос нивоа витамина В12 у крви и броја рецидива херпетичног кератитиса.....	58
--	----

Графикон 2. Однос нивоа фолне киселине у крви и броја рецидива херпетичног кератитиса.....	59
--	----

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, Urbieta 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+ 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+ 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 1-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 α α ⁺ 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, Charukamnoetkanok 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- α 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- λ 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- λ 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- λ 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+ 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, Toyooka 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- λ), 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- κ 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.

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, **Savić 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 Bracyspira 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, **Savić 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)