

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE

**CILVĒKA HERPESVĪRUSU INFEKCIJAS, IMŪNĀS
AKTIVĀCIJAS UN NEIRODEĢENERĀCIJAS
MARĶIERU SASTOPAMĪBAS BIEŽUMS
PACIENTIEM AR RECIDIVĒJOŠI REMITĒJOŠU
MULTIPLO SKLEROZI**

BAKALaura DARBS

Autors: Haralds Jakštāns
Stud. apl. Nr. hj21008
Darba vadītāja: MSc biol. Anda Vilmane

RĪGA 2024

KOPSAVILKUMS

Multiplā skleroze (MS) ir hroniska, progresējoša, autoimūna slimība, ko izraisa galvas un muguras smadzeņu demielinizācija. Tā visā pasaulē skar ~2,8 miljonus cilvēku, visbiežāk vecumā no 20 līdz 40 gadiem, divas reizes biežāk skarot sievietes. Slimībai raksturīgi dažādi simptomi kā redzes un dzirdes traucējumi, atmiņas zudumi, muskuļu spazmas un vājums, kas var ietekmēt pārvietošanos, kā arī, retos gadījumos MS var izraisīt daļēju vai pilnīgu paralīzi (Koskie 2022, Mayo Clinic Staff 2022, Walton *et al.* 2020).

Neskatoties uz to, ka Amerikas Savienoto Valstu Pārtikas un Zāļu Pārvalde ir apstiprinājusi vairākus medikamentus pret MS, tie galvenokārt nodrošina tikai slimības progresijas palēnināšanu, samazinot slimības epizožu biežumu un nopietnību. Taču pašlaik nepastāv līdzekļi, kas izārstētu MS (Carey & Halper 2022). Šobrīd arī nav pieejamas MS specifiskas diagnostikas metodes, bet gan tiek izmantotas dažādas vispārīgas analīzes, lai izslēgtu citu, ar simptomiem līdzīgu, slimību esamību (Mayo Clinic Staff 2022). Ņemot vērā, ka izārstēt jau esošus MS radītos bojājumus nav iespējams, ir nepieciešama metode precīzai un laicīgai slimības diagnosticēšanai, ko, iespējams, varētu sasniegt analizējot dažādus potenciālos biomarkierus un faktorus, kas korelē ar MS iestāšanos un progresiju (Lovering 2020).

Šajā pētījumā novērtēts cilvēka herpesvīrusu sastopamības biežums pacientiem ar recidivējoši remitējošu multiplo sklerozi (RRMS), nosakot vīrusu genoma secības un cilvēka herpesvīrusu specifisko antivielu klātbūtni, pielietojot reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas (PCR) un ELISA metodes. Kā arī noteikta citokīna interferons-gamma (IFN- γ), receptoru - brīva diferenciacijas klāstera 14 (sCD14) un tumora nekrozes faktoru receptoru dzimtas pārstāvja 17 (TNFRSF17) un lipopolisaharīdus saistošā proteīna (LBP) līmenis plazmas paraugos.

RRMS pacientu un veselu indivīdu grupās tika novērota EBV, HHV-6 un HHV-7 DNS kur visiem šiem vīrusiem augstāks sastopamības biežums novērots kontroles grupai, taču būtiski atšķirīgs rezultāts novērots tikai HHV-6 ($p=0,0260$). RRMS pacientiem, salīdzinot ar veselīgiem indivīdiem, novērota būtiski augstāka sastopamība HHV-2 ($p=0,0194$) un HHV-6 ($p<0,0001$) specifiskiem IgG un HHV-6 specifiskam IgM ($p<0,0001$). RRMS pacientiem, salīdzinot ar kontrolēm, plazmas paraugos konstatēts būtiski augstāks VZV un CMV specifisks IgG līmenis. RRMS grupai, salīdzinot ar kontrolēm, plazmas paraugos IFN- γ un sCD14 līmeņi bija būtiski augstāki, taču TNFRSF17 bija būtiski zemāks.

Atslēgvārdi: Multiplā skleroze, RRMS, herpesvīrusi, biomarkieri, citokīni, receptori.

SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, progressive, autoimmune disease, which is caused by the demyelination of the brain and spine. The disease affects ~2.8 million people, most commonly a age of 20-40 years, affecting women twice as often. The disease is characterised by symptoms like vision, hearing and memory loss, muscle weakness and spasms, which can affect movement and in rare cases MS can cause partial or complete paralysis (Koskie 2022, Mayo Clinic Staff 2022, Walton *et al.* 2020).

Even though the U.S. Food and Drug Administration has approved several drugs for MS, they mainly act to slow down the progression of the disease by reducing the frequency and severity of the diseases' episodes. Though there is no cure for the MS (Carey & Halper 2022). Currently there are no specific methods to diagnose MS, but different general tests are used to rule out other conditions which produce similar symptoms (Mayo Clinic Staff 2022). Since it's not possible to repair the damage already caused by MS, a method for precise and early diagnosis of the disease is necessary, which might be achieved by analyzing different possible biomarkers and factors which correlate with the onset and progression of MS (Lovering 2020).

In this study we assessed the prevalence of human herpesviruses in patients of relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS), determining the presence of herpes viruses genomic sequences and human herpesviruses specific antibodies using the real-time PCR and ELISA methods, respectively. We also determined cytokine - interferon gamma (IFN- γ) and receptor - soluble cluster of differentiation 14 (sCD14), tumor necrosis factor receptor superfamily member 17 (TNFRSF17) and lipopolysaccharide binding protein (LBP) levels in plazma samples.

EBV, HHV-7 and HHV-7 DNA was observed in the RRMS patient and the healthy control group samples, in which all of these viruses had a higher prevalence in the control group, though only HHV-6 prevalence was significantly higher ($p=0.0260$). RRMS patients, compared to the healthy individuals, had a significantly higher prevalence of HHV-2 ($p=0.0194$) and HHV-6 ($p<0,0001$) specific IgG and HHV-6 specific IgM ($p<0,0001$). RRMS patients, compared to the controls were observed to have a significantly higher VZV and CMV specific IgG level in plazma samples. The RRMS group, compared to the controls, had significantly higher IFN- γ and sCD14 levels and significantly lower levels of TNFRSF17 in the plazma samples.

Keywords: Multiple sclerosis, RRMS, herpesviruses, biomarkers, cytokines, receptors.

SAĪSINĀJUMI

1. tabula.

Darbā izmantoto saīsinājumu saraksts un to atšifrējumi latviešu un angļu valodā

Table 1.

List of used abbreviation in Latvian and English

Saīsinājums / Abbreviation	Latviski / Latvian	Angliski / English
Bp	Bāzu pāri	Base pairs
CD	Diferenciācijas klāsteris	Cluster of differentiation
CIS	Klīniski izolēts sindroms	Clinically isolated syndrome
CMV	Citomegalovīruss	Cytomegalovirus
CNS	Centrālā nervu sistēma	Central nervous system
CSF	Cerebrospinālais šķidrums	Cerebrospinal fluid
dH ₂ O	Destilēts ūdens	Distilled water
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe	Deoxyribonucleic acid
EBV	Epšteina-Barra vīruss	Epstein-Barr virus
HHV	Cilvēka herpesvīruss	Human herpesvirus
HRP	Mārrutku peroksidāze	Horseradish peroxidase
HSV	Herpes simplekss vīruss	Herpes simplex virus
IFN- γ	Interferons gamma	Interferon gamma
IFN- γ R	Interferona gamma receptors	Interferon-gamma receptor
Ig	Imūnglobulīns	Immunoglobulin
IL	Interleikīns	Interleukin
KSHV	Ar Kaposi sarkomu saistītais herpesvīruss	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
LBP	Lipopolisaharīda saistītājproteīns	Lipopolysaccharide binding protein

LPS	Lipopopisaharīdi	Lipopolysaccharides
MHC	Galvenais audu saderības komplekss	Major histocompatibility complex
MS	Multiplā skleroze	Multiple sclerosis
OD	Optiskais blīvums	Optical density
PBMC	Perifēro asiņu mononukleārās šūnās	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polimerāzes ķēdes reakcija	Polymerase chain reaction
PPMS	Primāri progresējoša multiplā skleroze	Primary progressive multiple sclerosis
RIS	Radioloģiski izolēts sindroms	Radiologically isolated syndrome
RNS	Ribonukleīnskābe	Ribonucleic acid
rpm	Apgriezieni minūtē	Revolutions per minute
RRMS	Recidivējoši remitējoša multiplā skleroze	Relapsing remitting multiple sclerosis
RU	Relatīvās vienības	Relative units
sBCMA	Brīvs B šūnu nobiešanas antigēns	Soluble B cell maturation antigen
SPMS	Sekundāri progresējoša multiplā skleroze	Secondary progressive multiple sclerosis
TMB	Tetrametilbenzidīns	Tetramethylbenzidine
TNFRSF17	Tumora nekrozes faktoru receptoru dzimtas pārstāvis 17	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 17
VZV	Varicella zoster vīruss	Varicella zoster virus

SATURA RĀDĪTĀJS

Saīsinājumi	4
Ievads	8
1. Literatūras apskats	9
1.1. Multiplā skleroze	9
1.2 Herpesvīrusi	10
1.2.1 <i>Alphaherpesvirinae</i>	11
1.2.2 <i>Betaherpesvirinae</i>	12
1.2.3 <i>Gammaherpesvirinae</i>	13
1.3 Herpesvīrusu saistība ar MS	13
1.4 Potenciālie MS biomarkķieri	14
1.4.1 LBP	14
1.4.2 CD14	15
1.4.3 IFN- γ	15
1.4.4 TNFRSF17	16
2. Materiāli un metodes	17
2.1 Materiāli	17
2.2 Pētījuma grupas	20
2.3. Paraugu ievākšana un sagatavošana	20
2.4. DNS izdalīšana no PBMC un no šūnām brīvas asins plazmas	21
2.5 DNS izdalīšana no perifērajām asinīm	21
2.6 DNS koncentrācijas noteikšana	22
2.7 DNS kvalitātes pārbaude	23
2.8 Cilvēka herpesvīrusu klātbūtnes noteikšana ar multiplex reāla laika PCR	24
2.9 EBV specifisko antivielu noteikšana	25
2.10 HHV-6 specifisko antivielu noteikšana	26
2.11 CMV specifisko antivielu noteikšana	27
2.12 HSV-1 specifisko antivielu noteikšana	28
2.13 HSV-2 specifisko antivielu noteikšana	29
2.14 VZV specifisko antivielu noteikšana	31
2.15 sCD14 koncentrācijas noteikšana	32
2.16 IFN- γ koncentrācijas noteikšana	33
2.17 TNFRSF17 koncentrācijas noteikšana	33
2.18 LBP koncentrācijas noteikšana	34

2.19 Statistiskā apstrāde	35
3. Rezultāti	36
3.1 DNS kvalitātes analīze.....	36
3.2 Herpesvīrusu infekcijas sastopamība.....	37
3.3 Cilvēka herpesvīrusu specifisko antivielu sastopamība	39
3.4 Potenciālo biomarkieru sastopamība	40
4. Diskusija.....	42
5. Secinājumi.....	44
Pateicības.....	45
Izmantotās literatūras saraksts.....	46

IEVADS

Multiplā skleroze (MS) ir hroniska autoimūna slimība, kas skar centrālo nervu sistēmu (CNS), bojājot nervu šķiedru mielīna apvalku. Visizplatītākais slimības simptoms ir nespēks, kas var ietekmēt cilvēka miega un dzīves kvalitāti, bieži rodas arī kustību un redzes traucējumi, kas, slimībai progresējot, var radīt paralīzi, īslaicīgu aklumu un atmiņas zudumu. (Induruwa *et al.* 2012). Ticams, ka vides faktoru ietekme uz ģenētiski uzņēmīgu organismu ir slimības cēlonis, kas ietekmē T šūnu autoimūno reakciju pret CNS. Pētījumi liecina, ka konkrēti gēni, kā interleikīna (IL)-2 un IL-7, sekmē MS attīstību, kā arī, ka galvenajam audu saderības kompleksam (MHC) ir ievērojama ietekme MS izraisīšanā. Taču, iespējams, arī vīrusi spēj ietekmēt slimības norisi, jo vairāk kā 90% slimnieku noteikta augsta imūnglobulīna (Ig)G koncentrācija smadzenēs un cerebrospinālajā šķidrumā (CSF) (Weiner 2009, Gilden 2005). Tiek uzskatīts, ka pasaulē MS skar ~2,8 miljonus cilvēku un Latvijā saslimušo skaits pārsniedz 2100 cilvēku (Walton *et al.* 2020, Paudere–Logina un Pastare 2023). Globāli slimība divas reizes vairāk skar sievietes, taču dažās valstīs šī attiecība ir vēl augstāka. (Walton *et al.* 2020). MS sekmējot aksonu funkcijas zudumu, tiek sasniegta neatgriezeniska slimības fāze, kuras ārstēšanai nav pieejami efektīvi terapijas līdzekļi (Criste *et al.* 2014). Tieša, MS radīta, nāve ir reti sastopama, taču dzīves ilguma saīsināšanos rada MS esamība līdztekus citām slimībām, kā asinsvadu slimības, vēzis, elpošanas sistēmas problēmas un diabēts (Harding *et al.* 2020). Tādēļ potenciālu MS diagnostisko biomarķieru atklāšana ir ļoti būtiska, lai uzlabotu personalizētas terapijas iespējas un precizētu slimības progresijas un aktivitātes prognozes.

Darba mērķis: noteikt cilvēka herpesvīrusu 1-7 infekcijas, imūnās aktivācijas, kā arī neurodeģenerācijas marķieru klātbūtni pacientiem ar recidivējoši remitējošu multiplo sklerozi.

Darba uzdevumi:

1. Izdalīt DNS no perifēro asiņu, PBMC un plazmas paraugiem;
2. Pārbaudīt DNS kvantitāti un kvalitāti;
3. Noteikt cilvēka herpesvīrusu 1-7 genoma sekvenču klātbūtni DNS paraugos;
4. Noteikt cilvēka herpesvīrusu 1-6 specifisko antivielu klātbūtni plazmas paraugos;
5. Noteikt citokīna IFN- γ līmeni plazmas paraugos;
6. Noteikt receptora sCD14 līmeni plazmas paraugos;
7. Noteikt LBP līmeni plazmas paraugos;
8. Noteikt receptora TNFRSF17 līmeni plazmas paraugos.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Multiplā skleroze

Klīniski izolēts sindroms (CIS) ir centrālās nervu sistēmas (CNS) iekaisums un demielinizācija, kam raksturīgi multiplai sklerozei (MS) līdzīgi simptomi, taču pēc CIS epizodes pacientiem vienmēr MS neattīstās. CIS progresiju MS ievērojami neietekmē sindroma tips, piemēram, mugurkaula CIS pacientiem MS attīstās vidēji 51% gadījumu, sindromam skarot iegarenās smadzenes – vidēji 56%, taču optiskā neirīta gadījumā novērojama variabla MS progresijas iespējamība – no 10-85% pacientu. Līdzīgi kā MS, CIS parasti skar cilvēkus vecumā no 20 līdz 45 gadiem un 2,5 reizes biežāk skar sievietes. Taču CIS simptomu esamība nav vienīgā liecība par iespējamu neurodeģeneratīvu slimību un potenciālas MS attīstības sākuma stadija var izpausties ne tikai ar CNS iekaisumu un demielinizāciju, bet arī ar simptomiem kā lēkme un encefalopātija (Miller *et al.* 2012).

Kā radioloģiski izolēts sindroms (RIS) tiek klasificēti gadījumi, kad magnētiskās rezonanses izmeklējumos personai tiek novēroti demielinizācijas rezultātā veidojošies perēkļi uz galvas vai muguras smadzenēm, taču MS tipiskie simptomi netiek novēroti. Nereti šo perēkļu veidojumi novēroti gan veseliem cilvēkiem, gan indivīdiem, kuriem raksturīgi vispārīgi simptomi kā galvassāpes un reiboņi. Neskatoties uz nespecifiskajiem simptomiem, personām ar RIS, veicot atkārtotas izmeklēšanas, 2-5 gadu laikā 30-40% tiek diagnosticēta progresija līdz CIS vai MS. RIS nopietnības pakāpi nosaka veidojošo perēkļu skaits, lokalizācija un aktivitāte, tādēļ nelieli, zem smadzeņu garozas veidoti, perēkļi nereti izskaidrojami ar asinsvadu slimībām (Miller *et al.* 2012).

Recidivējoši remitējoša multiplā skleroze (RRMS) ir visizplatītākais MS tips, skarot apmēram 85% MS slimnieku. Slimības formai raksturīgi periodiski simptomu paasinājumi (relapses), kuriem seko remisija - simptomu pilnīga vai daļēja izzušana (Goldenberg 2012). 15-20 gadu laikā 50-60% RRMS pacientu novērojama slimības pāreja uz sekundāri progresējošu multiplo sklerozi (SPMS), kurai raksturīga vienmērīga slimības progresija un simptomu pasliktināšanās ar/bez relapsēm (Boyko *et al.* 2021). Neviennozīmīgais RRMS pārejas periods nereti mēdz apgrūtināt SPMS diagnozi. Apmēram 15% MS slimnieku novērojama primāri progresējoša multiplā skleroze (PPMS), kurai raksturīga vienmērīga progresija kopš slimības sākuma, bieži bez relapsēm. Dēļ konstantās progresijas, PPMS diagnozei nereti nepieciešami vairāki ārsta apmeklējumi (Pozzilli *et al.* 2023).

Pašlaik nepastāv specifiskas metodes MS diagnozei, taču veicot dažādas pārbaudes kā asins un CSF analīzes ir iespējams izslēgt citu slimību esamību, kurām raksturīgi līdzīgi simptomi, kā arī magnētiskās rezonanses izmeklējumi var tikt veikti, lai novērotu potenciālu MS izraisītu perēkļu esamību. Specifisku biomarkieru atklāšana uzlabotu MS diagnostikas un personalizētas terapijas iespējas un precizētu slimības progresijas un aktivitātes prognozes (Kuhle & Sati 2024, Mayo Clinic Staff 2022).

1.2 Herpesvīrusi

Herpesvirales kārtā tiek iedalītas trīs dzimtas, atkarībā pēc to saimniekorganisma loka. *Alloherpesviridae*, inficē abiniekus un zivis, *Malacoherpesviridae* – moluskus un *Herpesviridae* – putnus, rāpuļus un zīdītājus (Louten 2023a).

Herpesviridae dzimtu iedala vairākās apakšdzimtās, atkarībā no to replikācijas cikla ilguma, šūnu tropisma, genoma garuma un sarežģītības, kā arī pēc šūnu tipa, kurā vīruss pāriet latentā fāzē (Wofford *et al.* 2020). Šobrīd atklāti deviņi cilvēkus inficējoši herpesvīrusi, kas nosaukti to atklāšanas secībā. Tiem raksturīga latence, norādot uz to, ka vīruss nekad pilnīgi neizzūd no saimniekorganisma, bet gan spēj šūnās saglabāties neaktīvā fāzē (Louten 2023a).

Herpesviridae ir sfēriski, ar apvalku norobežoti virioni, kā diametrs, atkarībā no sugas, sasniedz apmēram 200 nm. Tie satur lineāru, divpavediena DNS, garumā no 125-240 kbp. Ģenētisko materiālu ieskauj vīrusa kapsīds, kam piemīt ikosaedriskā, T=16, forma, diametrā no 125-130 nm, ko veido 162 kapsomeri – 12 pentoni un 150 heksoni. Kapsīdu ietver matrikss, jeb teguments, ko veido 17-38 proteīni. Viriona apvalku veido lipīda dubultslānis, uz kā lokalizēti inficētspēju nodrošinoši glikoproteīni, kas atšķiras starp sugām. (Davison 2007, Fàbrega-Ferrer and Coll 2021).

Visiem herpesvīrusiem raksturīga latentā persistence. Persistenta infekcija rodas pēc primāras infekcijas, saimniekorganisma imūnsistēmai nespējot pilnīgi atbrīvoties no patogēna. Persistenta infekcija var rasties nefunkcionējošu vīrusu daļiņu izveides dēļ, kur virioni ir zaudējuši replikācijas ciklam nepieciešamos gēnus. Neskatoties uz to, ka tie nav spējīgi replicēties, tie akumulē imūnsistēmas sekretētās antivielas, nodrošinot augstāku iespēju izdzīvot funkcionāliem virioniem, kā arī, lai gan to darbības mehānisms nav noskaidrots, ir novērots, ka nefunkcionējošās vīrusa daļiņas spēj ierobežot inficētu šūnu apoptozi, nodrošinot vīrusa saglabāšanos. Latenta persistence rodas vīrusam nostiprinoties saimniekorganisma šūnās, kur nenotiek tā replikācija un proteīnu sintēze, kā rezultātā saimniekorganisma imūnsistēma netiek aktivēta un vīrusa genoms saglabājas (Louten J. 2023b, Louten J. 2023b).

Imūnsistēmas novājināšanās var izraisīt latentu vīrusu reaktivāciju, tiem atsākot savu replikācijas ciklu un izraisot dažādas slimības un simptomus, kas var atšķirties no primāras infekcijas (Louten J. 2023b).

1.2.1 *Alphaherpesvirinae*

Pie *Alphaherpesvirinae* apakšdzimtas pieder herpes simplekss 1-2 (HSV-1, HSV-2) un varicella zoster vīruss (VZV), kas bieži inficē epitēlija šūnas. Tiem raksturīgi salīdzinoši īsi replikācijas cikli. Jaunu, inficētspējīgu virionu izveide HSV-1 un HSV-2 gadījumā aizņem 4-8 stundas, un novērots, ka VZV cikls aizņem 9-12 stundas (Demmler-Harrison 2009, Reichelt *et al.* 2009).

Tiek uzskatīts, ka globāli 66,6% populācijas, vecumā līdz 49 gadiem, ir inficēti ar HSV-1, taču HSV-2 skar 13,2%, vecumā no 15-49 gadiem. Novērots, ka inficēto skaits abiem vīrusu tipiem pieaug līdz ar vecumu, taču HSV-2 prevalences sievietēm ir ievērojami augstāka (James *et al.* 2020).

HSV lītiski inficē gļotādas un ādas epitēliju šūnas, pēc kā tie latenti saglabājas perifēros sensoros neironos, kas innervē sākotnēji inficēto saimniekorganisma rajonu. Latences fāzē vīrusa genoms saglabājas saimniekorganisma šūnas kodolā, taču lielākā tā genoma daļa tiek inaktivēta. Vīruss saimniekorganismā var uzturēties visu tā mūžu, taču dažādi faktori kā ultravioletā radiācija, stress un audu bojājumi, var sekmēt vīrusa reaktivāciju un atkārtotu savairošanos. Reaktivētajam vīrusam pārvietojoties pa aksoniem, tas nonāk epitēliju šūnās un atkārtoti tajās vairojas. HSV-1 galvenokārt izraisa aukstumpumpas (*herpes labialis*), vīrusam latenti nostiprinoties trīszaru nervā, taču HSV-2 latence krustu ganglijos bieži izraisa ģenitāliju herpes (*herpes genitalis*) (Luecke and Paludan 2015, Kantor *et al.* 2014). *Herpes labialis* izpausmes iespējamību palielina saskare ar inficētu cilvēku siekalām, izmantojot inficētas personas dzērienu vai kosmētikas piederumus. Herpes folikulītu izraisa HSV-1 infekcija matu folikulās, kas novērojama vīriešiem pēc bārdas skūšanas (Saleh *et al.* 2023).

VZV ir vienīgais herpesvīruss, kas izplatās caur elpošanas sistēmu, galvenokārt caur aerosola piliniem, kas tiek izdalīti šķaudot un klepojot. Vīrusam raksturīga ievērojama virulence un tas primāras infekcijas gadījumā izraisa vējbakas (*varicella*) kas parasti bērniem izpaužas vieglākā formā. Pieaugušiem vai indivīdiem ar novājinātu imūnsistēmu bieži rodas pneimonija, ar izsitumiem saistītas sekundāras infekcijas un neiroloģiskas slimības kā encefalīts un meningīts. VZV reaktivācija izraisa jostas rozi (*herpes zoster*), kas novērota gados vecākiem cilvēkiem vai indivīdiem ar novājinātu imūnsistēmu. Slimībai raksturīga izsitumu

veidošanās uz ādas. Citas personas, kurām nav imunitāte pret vīrusu, var inficēties no izsitumiem, kas veidojas uz jostas rozes pacientu ādas (Louten 2023a).

1.2.2 *Betaherpesvirinae*

Pie *Betaherpesvirinae* pieder citomegalovīruss (CMV) un rozeolovīrusu ģintis (HHV-6A, HHV-6B un HHV-7). CMV nosaukums cēlies no grieķu valodas *cytos* un *megalo*, norādot uz liela izmēra iekššūnu veidojumiem, kas raksturīgs ar CMV inficētām šūnām. No visiem HHV, CMV ir vislielākais genoms, sasniedzot 230 kb garumu, kas satur 160-200 proteīnus kodējošus gēnus, taču neskatoties uz to, viriona kapsīda izmēri ir līdzīgi citiem HHV (Fàbrega-Ferrer and Coll 2021). Primāra CMV infekcija veseliem cilvēkiem parasti nav simptomātiska, taču tā var izraisīt mononukleozi, kurai raksturīgi dažādi simptomi kā drudzis, izsitumi un leukocitoze. Lai gan zināms, ka vairums mononukleozes gadījumu izraisa Epšteina-Barra vīruss (EBV), šo slimību paveidi, pēc izraisītāja, izpaužas ļoti līdzīgi. Reaktivēts CMV var būt dzīvībai bīstams imūnsistēmas novājinātiem indivīdiem, piemēram, pacientiem, kuriem veikta orgānu transplantācija vai, kuri slimo ar iegūtu imūndeficīta sindromu, tas izraisa retinītu, alveolu un gremošanas trakta iekaisumus, kā arī zināms, ka tas izraisa mukoepidermoidālo karcinomu un iespējams arī prostatas vēzi (Gupta & Shorman 2023, Louten 2023a).

HHV-6 un HHV-7 genoma izmēri ir salīdzinoši mazāki, attiecīgi sasniedzot 162 kb un 153 kb garumu, kodējot ~85 produktus. HHV-6 tiek iedalīts divās sugās – HHV-6A un HHV-6B, savstarpēji atšķiroties ar receptoriem, patogenitāti un šūnu tropismu, taču šīm sugām raksturīga ~90% līdzība. Rozeolovīrusi spēj inficēt T limfocītus, visbiežāk nobriedušas CD4 T šūnas, taču HHV-6 inficē arī dendrītiskās šūnas, monocītus/makrofāgus un dabiskās galētājšūnas, kā arī HHV-6 raksturīgs neirotropisms, uz ko norāda pētījumi, kur no smadzeņu paraugiem izdalīts to vīrusu DNS. HHV-6 latentī nostiprinās kaulu smadzenēs lokalizētās hematopoētiskās cilmes šūnās, taču HHV-7 – cirkulējošos limfocītos (Louten 2023a).

Zināms, ka rozeolovīrusi izraisa slimības bērniem, īpaši izplatīta ir *roseola infantum*, ko galvenokārt izraisa HHV-6 (King & Al Khalili 2023). Novērots, ka primāras HHV-6B un HHV-7 infekcijas izraisa ievērojamu daudzumu ar drudzi saistītas lēkmes, kas raksturīgas bērniem zem 2 gadu vecuma un retos gadījumos var izpausties ilgstošas lēkmes epizodes - *status epilepticus* (Louten 2023a).

1.2.3 *Gammaherpesvirinae*

Pie *Gammaherpesvirinae* piederošie vīrusi - EBV un ar Kaposi sarkomu saistītais herpesvīruss (KSHV) latenti nostiprinās B limfocītos un ir saistīti ar šūnu transformāciju, kas veicina audzēju attīstību.

EBV nosaukts par godu diviem zinātniekiem - Antonijs Epsteins un Ivona Barra, kuri pirmo reizi izdalīja EBV no viņu veidotas cilvēku limfocītu šūnu līnijas. Gandrīz 95% pieaugušu cilvēku ir inficēti ar EBV. Bērniem EBV infekcijas bieži izpaužas asimptomātiski vai ar vispārīgiem, saaukstēšanās līdzīgiem simptomiem, taču pieaugušiem un pusaudžiem 90% mononukleozes gadījumu izraisa EBV. Vairums pacientiem EBV izraisīta mononukleoze neizraisa nopietnas sekas un laika gaitā slimība pazūd, taču tā var izraisīt vairākas nopietnas traumas, kā liesas bojājumus, liesas izmēru palielināšanās (splenomegālijas) dēļ. Kā arī, mononukleozes dēļ, pastiprināta limfocītu proliferācija bieži izraisa aknu un liesas izmēru palielināšanos (hepatosplenomegāliju) un limfmezglu pietūkumu. Tiek uzskatīts, ka EBV izraisa arī limfomas un nazofaringeālos audzējus (Hoover & Higginbotham, Louten 2023a).

KSHV nosaukts pēc audzēja tipa no kā vīruss pirmo reizi izdalīts. Atšķirībā no citiem herpesvīrusiem, KSHV seroprevalence ievērojami atšķiras starp dažādiem pasaules reģioniem un ir zināmi septiņi vīrusa tipi - A, B, C, D, E, F, un Z (Rewane & Tadi 2023). Līdzīgi citiem herpesvīrusiem, vairums KSHV infekcijas imūnkompetentiem indivīdiem ir asimptomātiskas, taču bērniem izpaužas ar drudzi un izsitumu veidošanos un pieaugušiem cilvēkiem ar limfmezglu pietūkumu, nogurumu un izsitumu veidošanos. Infekcija ir īpaši bīstami indivīdiem ar novājinātu imūnsistēmu, kuriem ir paaugstināts Kaposi sarkomas attīstības risks (Louten 2023a).

1.3 Herpesvīrusu saistība ar MS

Meta-analīzes pētījumā, kurā apskatīti 134 pētījumi, novērota korelācija starp herpesvīrusu infekcijām un MS. Herpesvīrusu sastopamības biežums MS pacientiem novērots sekojoši - HSV-1 un/vai HSV-2 (32%), VZV (52%), EBV (74%), CMV (41%), HHV-6 (39%), HHV-7 (28%) un HHV-8 (28%). Kā riska faktoru, iespējams, definējot EBV, VZV un HHV-6. Līdzīgi rezultāti iegūti citos pētījumos, kuros analizēts EBV, CMV un HHV-6 sastopamības biežums MS pacientiem, kuriem šo vīrusu infekcijas novērotas ievērojami biežāk, salīdzinot ar kontroles grupām (Khalesi *et al.* 2023). Citos apskata pētījumos novērota pozitīva sakarība starp infenciozo mononukleozu un MS, norādot uz iespējamo EBV infekcijas ietekmi (Guan *et al.* 2019). EBV saistību ar MS pastiprina arī novērojums, ka pret EBV antigēniem, īpaši EBV

nukleārā antigēna-1, specifisku antivielu līmenis paaugstinās pirms personai parādās MS (Ascherio & Munger 2010). HHV-6, būdams neirotrofs vīruss, ietekmē CNS un ir saistīts ar dažādām neiroloģiskām slimībām kā epilepsiju, encefalītu un drudzi saistītām lēkmēm, kā arī tiek uzskatīts, ka HHV-6 sekmē dažādu neurodeģeneratīvu slimību attīstību kā MS un Alzheimer slimība (Khalesi *et al.* 2023, Santpere *et al.* 2020).

1.4 Potenciālie MS biomarkieri

1.4.1 LBP

Lipopolisaharīda saistītāj proteīns (LBP) ir ~60 kDa smags glikoproteīns, kas atpazīst un saista lipopolisaharīda (LPS) komponenti - lipīdu A, kas noenkuro LPS pie gram negatīvu baktēriju šūnu membrānas (Raetz *et al.* 2007). LPS mēdz saukt arī par endotoksīnu, dēļ tā novērotās ietekmes uz sepses izraisīšanu. Pateicoties LBP augstās afinitātes pret LPS, endotoksīns no baktērijas membrānas var tikt atbrīvots un piesaistīts pie LBP (Tan *et al.* 2014, Je-Kyung *et al.* 2017). Izveidotais LPS-LBP komplekss caur brīviem vai makrofāgu un monocītu membrānā integrētiem CD14 tiek transportēts uz TLR4/MD-2 kompleksu. TLR4/MD-2 kompleksa receptoru aktivācija izraisa dažādas iekaisumu veicinošas un mazinošas imūnreakcijas (Kopp *et al.* 2016).

Novērots, ka LPS veicina nervu sistēmas iekaisuma veidošanu un ir saistīts ar dažādu neurodeģeneratīvu slimību izraisīšanu, piemēram, Alzheimer un Parkinsona slimību, kā arī MS. Vairākus gadus pirms neiroloģiskās slimības parādīšanās, pacientiem novērojami gremošanas sistēmas simptomi kā caureja, slikta dūša, vēdera sāpes un vemšana, ko izraisa gremošanas sistēmas mikrobioma disbioze – ievērojama patogēnu savairošanās attiecībā pret labvēlīgām baktērijām. Mikrobioma disbioze veicina iekaisuma veidošanos, zarnu caurlaidības palielināšanos un rada bojājumus asins-smadzeņu barjerā. Smadzenes un gremošanas sistēmas savstarpējā ietekme tiek dēvēta par zarnu-smadzeņu asi, caur ko mikrobioma disbioze spēj negatīvi ietekmēt CNS. Patogēnu savairošanās veicina dažādu potenciāli toksisku metabolītu daudzuma pieaugumu, kas caur zarnu sienīņu var nonākt asinsritē, LPS gadījumā, izraisot endotoksēmiju. Tālāk šie metabolīti caur bojāto asins-smadzeņu barjeru nonākt CNS. Taču asins-smadzeņu barjeras bojājumi ļauj CNS nonākt arī aktivētiem leikocītiem, kas veicina iekaisuma veidošanos un neironu apoptozi, rezultātā sekmējot neurodeģenerāciju (Kalyan *et al.* 2022).

MS pacientiem un modeļorganismiem, kam ar LPS inducēts MS, novērots augstāks LPS un LBP saturs asinīs, muguras un galvas smadzenēs. Tas izskaidrojams ar faktu, ka LPS veicina LBP sintēzi, kas ir iemesls kādēļ LBP ir izmantojams kā endotoksēmijas un iespējams arī MS biomarķieris (Kalyan *et al.* 2022, Escribano *et al.* 2017).

1.4.2 CD14

CD14 ir glikoproteīns, kas funkcionē kā koreceptors TLR, nodrošinot nespecifiskās imunitātes aktivāciju. Šī proteīna gēnu ekspresija raksturīga makrofāgiem, neitrofiliem un dendrītiskajām šūnām, bet zemākā apjomā arī T šūnām un B šūnām. Novērotas divas CD14 formas. mCD14 - 55 kDa smagais receptors, kas integrēts imūnšūnu membrānā, ko nodrošina GPI enkurs un sCD14 - 48/56 kDa receptors, kas eksistē brīvā formā, ko imūnšūnas sekretē un GPI enkuru nesatur (Sharygin *et al.* 2023, Marcos *et al.* 2010).

Augsts seruma sCD14 saturs novērots MS pacientiem, salīdzinot ar cilvēkiem, kuri ir veseli un cieš no citām neroloģiskām slimībām, kā meningīta, encefalīta un mielīta. RRMS un SPMS gadījumos novērots augstāks sCD14 saturs, kā PPMS, taču sekretētā receptora daudzumu arī ietekmē slimības aktivitāte. Augstāks daudzums novērots pacientiem, kuriem slimība ir stabila, salīdzinot ar tiem, kuriem novērota akūta relapse un progresējoša slimība, taču akūtas relapses brīžos novērots ievērojami zemāks sCD14 daudzums, kā progresējošas slimības gadījumos (Lutterotti *et al.* 2006).

1.4.3 IFN- γ

Interferons gamma (IFN- γ) ir citokīns, ko producē T limfocīti, makrofāgi, epiteliālās šūnas un dabīgās galētājšūnas. Citokīnam saistoties ar IFN- γ receptoru, tiek aktivēts JAK-STAT signālceļš ierosinot IFN- γ saistīto gēnu transkripciju. JAK-STAT aktivācija koordinē leukocītu transportu, šūnu proliferāciju un apoptozi, kā arī veicina antimikrobiālo un antitumorālo efektus. IFN- γ receptoru veido divas subvienības - IFN- γ R1 un IFN- γ R2, kas katra nodrošina savu funkciju aktivējoties dažādos apstākļos (Ding *et al.* 2022).

IFN- γ R ir saistīts ar dažādām imūnsistēmu saistītām slimībām. Receptora trūkums izraisa slimību iestāšanos, taču pārekspresija spēj radīt iekaisumu veidošanos vai veicināt ar traumu saistītu signālu aktivēšanu, kas ierosina slimību attīstību, piemēram, IFN- γ stimulējot

astrocītus, tie iespējams spēj kļūt neirotoksiski (Ding *et al.* 2022). Dažādu neurodeģeneratīvu slimību klātbūtnē, kā Alzheimeras slimības, Parkinsona slimības un MS, aktivētiem astrocītiem novērota ievērojami augstāka IFN- γ R ekspresija (Hashioka *et al.* 2009). Kā arī MS novērota pozitīva korelācija starp paaugstinātu IFN- γ līmeni un CNS perēkļu veidošanos. Veselas peles imunizējot ar encefalitogēniem Th1 limfocītiem, kas producē IFN- γ , spēj ierosināt eksperimentālo autoimūno encefalomiēlīta attīstību (Arellano *et al.* 2015).

1.4.4 TNFRSF17

Tumora nekrozes faktoru receptoru dzimtas pārstāvis 17 (TNFRSF17), jeb brīvs B šūnu nobriešanas antigēns (sBCMA) ir receptors, ko galvenokārt ekspresē atmiņas B šūnas un plazmas šūnas. Receptoram saistoties ar saviem ligandiem – B šūnu aktivējošo faktoru un proliferāciju inducējošo ligandu, nodrošina šūnu proliferāciju, asinsvadu jaunveidi, un osteoklastu aktivāciju (Wang *et al.* 2022). Taču uzskatāms, ka TNFRSF17 ekspresija ir arī saistīta ar dažādu audzēju un autoimūno slimību attīstību. Novērots, ka TNFRSF17 trūkumā pelēm attīstās B šūnu limfoproliferatīvais traucējums, izraisot abnormālu limfocītu savairošanos un imūnsistēmas novājināšanos (Vaillant & Stang 2023, Coquery & Erickson 2012). Noskaidrots, ka augsta TNFRSF17 koncentrācija CSF ir saistīta ar iekaisumu, kas novērojama MS un korelē ar B šūnu aktivitāti. (Mahler *et al.* 2020).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1 Materiāli

2. tabula.

Darbā izmantotie materiāli

Table 2.

Materials used in this study

Materiāls/Material	Apraksts/Description	Ražotājs/Manufacturer
Mikropipetes	Finnpipette F2, 0,5-5 μL	Thermo Fisher Scientific, ASV
	Finnpipette F2, 10-100 μL	
	Finnpipette F2, 20-200 μL	
	Finnpipette Focus Short, 100-1000 μL	
	Tacta, 8 Channel, 30-300 μL	Sartorius AG, Vācija
	Proline Plus, Single Channel, 0,5-10 μL	
Pipešu uzgaļi	BioSphere Quality Tips, 0,1-20 μL	Sarstedt, Vācija
	BioSphere Filter Tips, 100-1000 μL	
	Pipette Tip, 300 μL	
	Finntip Flex Filter Sterile, 200 μL	Thermo Fisher Scientific, ASV
Reakciju stobriņi	1,5 ml, 2 ml	Thermo Fisher Scientific, ASV
	DNA-/DNase-/RNase-free, 0,5 ml	Sarstedt, Vācija
Mērcilindrs	1000 ml	SIMAX, Čehija
Erlenmeijera kolba	Boro 3.3, 300 ml	ChemLand, Polija
Sejas aizsargmaska	Aizsargmaska pret UV starojumu	-
Vates kociņi	Raucotupf Cotton-tipped Applicators	L&R, Vācija

Citi bieži izmantotie materiāli: vienreizlietojamie gumijas cimdi, šķēres, pincetes, salvetes, rakstāmpiederumi.

3. tabula.

Darbā izmantotās iekārtas

Table 3.

Devices used in this study

Iekārta/Device	Apraksts/Description	Ražotājs/Manufacturer
Spektrofotometrs	NanoDrop, ND-1000	NanoDrop Technologies, ASV
Vorteksi	Mikrospin FV-2400	Biosan, Latvija
	Bio Vortex V1	
Centrifūgas	Minispin	Eppendorf, Vācija
	Microlitre Centrifuge - Z 216 MK	HERMLE, Vācija
Žāvējamois skapis	-	MEMMERT GmbH, Vācija
Mikroviļņu krāsns	-	Candy, Itālija
Kratītājs	PS-4	LaboTek, Dānija
Datorprogrammas	ND-1000 V3.5.2	NanoDrop Technologies, ASV
	Seegene Viewer v2.0	Seegene Inc., Dienvidkoreja
	Bio-Rad CFX Manager	Bio-Rad, ASV
	SkatIt RE 7.0	Thermo Fisher Scientific, ASV
	GraphPad 9	GraphPad Software, ASV
	VisionWorksLS 8.1.1	UVP, Vācija
Mikroplates nolasītājs	Varioskan LUX	Thermo Fisher Scientific, ASV
Termobloks	SC-24NC	Biosan, Latvija
Termostats	TS-100C	Biosan, Latvija
PCR iekārtas	Termociklizators - C1000 Touch	Bio-Rad, ASV
	qPCR modulis - CFX96	Bio-Rad, ASV
Elektroniskie svāri	PLJ 510-3M	Kern & Sohn, Vācija
Elektroforēzes iekārtas	Elektrības padeves iekārta - EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Zviedrija
	Rezervuārs - multiSUB	Cleaver Scientific, Lielbritānija
	BioSpectrum Imaging System	BioSpectrum®, ASV

4. tabula.

Darbā izmantotie komerciālie reaģentu komplekti

Table 4.

Commercial kits used in this study

Reaģents, reaģentu komplekts/Reagent, reagent Kit		Ražotājs/Manufacturer
ELISA	Herpes Simplex Virus Type 1 IgG ELISA, EIA-3485	DRG Instruments GmbH, Vācija
	Herpes Simplex Virus Type 1 IgM ELISA, EIA-3486	
	Herpes Simplex Virus Type 2 IgG ELISA, EIA-3487	
	Herpes Simplex Virus Type 2 IgM ELISA, EIA-3488	
	Anti-VZV ELISA (IgG), EI 2650- 9601 G	Euroimmun, Vācija
	Anti-EBV-CA ELISA (IgG), EI 2791-9601 g	
	Anti-CMV ELISA (IgG), EI 2570- 9601 G	Euroimmun, Vācija
	NovaLisa Cytomegalovirus (CMV) IgM, CMVM0110	Novatec Immundiagnostica GmbH
	Epstein-Barr Virus (VCA) IgM ELISA, DEEBVM0150	Demeditec Diagnostics GmbH, Vācija
	Varicella-Zoster Virus (VZV) IgM ELISA, DEVZVM0490	
	ELISA-VIDITEST anti-HHV-6 IgG, ODZ-235	VIDIA Ltd., Čehija
	ELISA-VIDITEST anti-HHV-6 IgM, ODZ-345	
	BioOcean® Human sCD14 ELISA Kit, EK1101	BioOcean®, ASV
	Human TNFRSF17/BCMA ELISA Kit PicoKine®, EK0661	Boster Biological Technology, ASV
	Human IFNγ(Interferon Gamma) ELISA Kit, ELK1036	ELK Biotechnology CO.,LTD, Ķīna
Enzyme Immunoassay for Quantification of free human LBP, Cat.:044 Lot 231123	ChromaTec GmbH, Vācija	
DNS/RNS izolēšana	AllPrep DNA/RNA Mini Kit (50), 80204	Qiagen, Vācija
PCR	Allplex Meningitis-V1 Assay, MG9700X	Seegene Inc., Dienvidkoreja

Fenols	-	-
Hloroforms	-	-
Lizēšanas buferis	0,5 ml 1 M Tris HCl, 0,125 ml 2 M MgCl ₂ , 0,125 ml 4 M NaCl, dH ₂ O	-
Proteināzes K buferis	5.85 g 0.375 mM NaCl, 23.98 g 0.5 M EDTA, dH ₂ O	-
PCR buferis	10x Taq Buffer with KCl, 1.25 ml	Thermo Fisher Scientific, ASV
Elektroforēzes buferis	50x TAE Electrophoresis Buffer	
dNTP	10 mM, dNTP Mix, 1 ml	
MgCl ₂	25 mM MgCl ₂ , 1.25 ml	
DNS polimerāze	5 U/μl Taq DNA Polymerase, 500 U	
Agarozē	StarPure Agarose	STARLAB GmbH, Vācija
Elektroforēzes buferis	50x TAE Electrophoresis Buffer	Thermo Fisher Scientific, ASV
Bioloģijas tīrības ūdens	AccuGENE Molecular Biology Water	Lonza, Beļģija
Prameris	GS268	Metabion, Vācija
	GS269	

2.2 Pētījuma grupas

Pētījums veikts atbilstoši drošības standartiem, ar Rīgas Stradiņa universitātes Ētikas komitejas atļauju Nr. 2-PĒK-4/35/2023, kas izsniegta 2023. gada 7. janvārī. Visi pētījumā iekļautie pacienti deva rakstisku piekrišanu dalībai pētījumā.

Pētījumā iekļauti 47 pacienti (10 vīrieši un 37 sievietes), vecumā no 18 līdz 73 gadiem, kuriem diagnosticēta recidivējoši remitējoša multiplā skleroze, un kuri stacionēti Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas neiroloģijas un neuroķirurģijas klīnikas 7. nodaļā.

Kā kontroles grupa, pētījumā iekļauti 38 praktiski veseli indivīdi (17 vīrieši un 21 sievietes), vecumā no 26 līdz 63 gadiem, kuru perifēro asiņu un no šūnām brīvas asins plazmas paraugi glabājās Rīgas Stradiņa universitātes Zinātnes centra Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūta biobankā.

2.3. Paraugu ievākšana un sagatavošana

Sertificēts medicīnas personāls, atbilstoši standartizētam protokolam, no katra pacienta paņēma perifēro asiņu paraugu speciālā asins paraugu ievākšanas stobriņā, kas satur antikoagulantu K2EDTA. Paraugs tālāk tika nogādāts Rīgas Stradiņa universitātes Zinātnes

centra Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā tālākai apstrādei un glabāšanai. No šūnām brīvu asins plazmu ieguva izmantojot centrifugēšanas metodi un PBMC atdalīja ar *Ficoll* gradienta metodi.

2.4. DNS izdalīšana no PBMC un no šūnām brīvas asins plazmas

DNS izdalīšanai no PBMC un no šūnām brīvas asins plazmas paraugiem tika izmantots *AllPrep DNA/RNA Mini Kit* (Qiagen, Vācija) materiālu un reaģentu komplekts, saskaņā ar ražotāja protokolu.

1. 200 µl parauga tika homogenizēts, tam pievienojot 350 µl RLT Plus buferi un samaisot, pēc kā paraugu centrifugēja 3 minūtes 13400 rpm.
2. 550 µl lizāta iepildīja *AllPrep* DNS kolonnā, kas ievietota 2 ml stobriņā, pēc kā kolonna tika centrifugēta 30 sekundes 10000 rpm.
3. Kolonna, uz kā membrānas piesaistījies DNS, tika ievietota jaunā 2 ml stobriņā.
4. Kolonnā pievienoja 500 µl AW1 buferi un centrifugēja 15 sekundes 10000 rpm.
5. Kolonnu ievietoja jaunā 2 ml stobriņā, tajā pievienoja 500 µl AW2 bufera un centrifugēja 2 minūtes 13400 rpm.
6. *AllPrep* kolonnu ievietoja jaunā 1,5 ml stobriņā, uz kolonnas membrānas uzpilināja 50 µl (ja DNS izdalīja no PBMC parauga) vai 30 µl (ja DNS izdalīja no plazmas parauga) EB buferi un inkubēja 1 minūti istabas temperatūrā.
7. Pēc inkubācijas kolonnu centrifugēja 1 minūti 10000 rpm, un izdalītā DNS tika eluēta 1,5 ml stobriņā.

2.5 DNS izdalīšana no perifērajām asinīm

DNS no perifēro asiņu paraugiem izdalīja izmantojot fenola-hloroforma metodi. Vispirms 0,5 ml parauga pievienoja 1 ml lizējošo buferi, kā pagatavošanai uz 50 ml izmantoja: 0,5 ml 1 M Tris HCl, 0,125 ml 2 M MgCl₂, 0,125 ml 4 M NaCl un 3x dH₂O līdz 50 ml atzīmei, un paraugu samaisīja, lai lizētu paraugā esošos eritrocītus. Lai nogulsnētu šūnas paraugu centrifugēja 3 minūtes 10000 rpm. Tālāk tika noņemts supernatants un, lai atmazgātu šūnas, nogulsnēm pievienoja 1 ml 3x dH₂O, pēc kā paraugu samaisīja un centrifugēja 3 minūtes 10000 rpm. Noņēma supernatantu un nogulsnēm pievienoja 80 µl proteināzes K buferi, kā pagatavošanai uz 50 ml izmantoja: 5,85 g 0,375 mM NaCl, 23,98 g 0,5 M EDTA un 3x dH₂O

līdz 50 ml atzīmei - proteīnu šķelšanai, 20 µl 20% SDS - leikocītu membrānas šķelšanai, 15 µl proteīnkināzes K - peptīdsaites šķelšanai. Paraugu samaisīja un inkubēja vismaz 4 stundas 55° C.

Pēc inkubācijas paraugam pievienoja 0,5 ml fenola, lai attīrītu paraugu no piemaisījumiem, un to samaisīja vorteksējot. DNS ekstrahēšanai, paraugu konstanti maisīja 15 minūtes izmantojot maisītāju, pēc kā paraugu centrifugēja 10 minūtes 10000 rpm. No parauga tika atdalīts supernatants un tas iepildīts jaunā 1,5 ml stobriņā, kam pievienoja 250 µl fenola un 250 µl hloroforma, pēc kā paraugu samaisīja vorteksējot. Tad 10 minūtes veica DNS ekstrahēšanu, pēc kā paraugu centrifugēja 10 minūtes 10000 rpm. Supernatantu pārnesa jaunā 1,5 ml stobriņā, kam pievienoja 0,5 ml hloroforma, pēc kā paraugu samaisīja vorteksējot. 10 minūtes veica DNS ekstrahēšanu, pēc kā paraugu centrifugēja 10 minūtes 10000 rpm. Supernatantu pārnesa jaunā 1,5 ml stobriņā, kam pievienoja 1 ml ledusaukstu 96% etanolu, pēc kā paraugu viegli samaisīja invertējot 1,5 ml stobriņu ar rokām. Tālāk paraugu 15 minūtes centrifugēja 14000 rpm, +4°C. Stobriņā esošo etanolu nolēja un pievienoja 1 ml ledusaukstu 70% etanolu, pēc kā paraugu 15 minūtes centrifugēja 14000 rpm, +4°C. Stobriņā esošo etanolu nolēja un DNS žāvēja, novietojot tos uz filtrpapīra otrādi ar atvērtiem vāciņiem. Kad DNS bija izžuvusi, tai pievienoja 35-50 µl 3x dH₂O. DNS izšķīdināja, to inkubējot istabas temperatūrā apmēram 2 stundas, pēc tam DNS uzglabāja +4° C līdz vienam mēnesim. Ilgtermiņa uzglabāšanai DNS ievietoja -20°C.

2.6 DNS koncentrācijas noteikšana

Izdalītās DNS koncentrāciju paraugā noteica spektrofotometriski, izmantojot NanoDrop 1000 spektrofotometru un datorprogrammu - *ND-1000 V3.5.2.*, mērot parauga absorbciju pie 260 nm viļņa garuma. Darba gaita:

1. Veica iekārtas iniciāciju un kalibrāciju, izmantojot no DNāzēm, RNāzēm un proteāzēm attīrītu ūdeni.
2. Uznesa 2 µl DNS parauga uz mērīšanas platformas un mērīja DNS koncentrāciju.
3. Ik pēc katra piektā koncentrācijas mērījuma, veica iekārtas kalibrāciju.

Papildus mērījumiem pie 260 nm viļņu garuma, izmanto mērījumus arī pie citu viļņu garuma, lai noteiktu dažādu piemaisījumu daudzumu DNS paraugā. 280 nm viļņu garumu

absorbē proteīni un fenols, taču absorbcija pie 230 nm norāda uz proteīnu, EDTA, ogļhidrātu, lipīdu un sāļu piemaisījumiem. Piemēram, attiecība A_{260} pret A_{280} , norāda uz paraugā esošās DNS koncentrācijas attiecību pret minētajiem piemaisījumiem, jeb DNS tīrību (Lucena-Aguilar *et al.* 2016).

2.7 DNS kvalitātes pārbaude

No perifērajām asinīm, PBMC un no šūnām brīvas asins plazmas izdalītās DNS kvalitāti pārbaudīja nosakot β -globīna gēna sekvenču klātbūtni tajā, izmantojot PCR metodi. Par negatīvo kontroli reakcijā izmantoja molekulārās bioloģijas tīrības ūdeni un par pozitīvo kontroli reakcijā izmantoja iepriekš pārbaudītu DNS paraugu.

β -globīna gēna sekvenču klātbūtne noteikta izmantojot sekojošus praimerus:

GS268 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'

GS269 5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG-3'

Vienam paraugam izmantoja 2 μ l izdalītās DNS (300 ng/reakcijā) un 23 μ l PCR maisījumu, kas saturēja:

10x PCR buferis	2,5 μ l
25 nM MgCl ₂	2 μ l
10 nM dNTP	0,5 μ l
27,5 nM GS268 praimeris	0,1 μ l
30,5 nM GS269 praimeris	0,1 μ l
5 U/ μ l Taq polimerāze	0,1 μ l
Molekulārās bioloģijas tīrības ūdens	17,7 μ l

Reakcijas apstākļi:

Sākotnējā denaturācija – 3 min. 95°C;

Amplifikācija (40 cikli):

1. DNS denaturācija – 30 sek. 95°C;
2. Praimeru hibridizācija – 30 sek. 55°C;
3. DNS sintēze – 45 sek. 72°C;

Noslēdzošā sintēze – 7 min. 72°C;

Uzglabāšana – +4° C.

Iegūtos PCR rezultātus analizēja elektroforētiski 1,7% agarozes gēlā un vizualizēja izmantojot iekārtu *BioSpectrum Imaging System*. Iegūtā amplifikācijas produkta izmēru 200 bp noteica ar marķieri pUC19 DNA/Mspl (HpaII), 23. DNS, kas izdalīta no perifērajām asinīm vai PBMC, uzskatīja par kvalitatīvu, ja tā saturēja β-globīna gēna sekvenci, taču DNS, kas izdalīta no šūnām brīvas asins plazmas uzskatīja par kvalitatīvu, ja tā nesaturēja β-globīna gēna sekvenci.

2.8 Cilvēka herpesvīrusu klātbūtnes noteikšana ar multiplex reāla laika PCR

Septiņu cilvēka herpesvīrusu (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 (A, B) un HHV-7) noteikšanai DNS paraugos izmantoja komerciāli pieejamu multiplex reālā laika PCR komplektu (*Allplex Meningitis-VI Assay*, Seegene, Dienvidkoreja) un reālā laika PCR iekārtu *CFX96 Real-Time System* (Bio-Rad, ASV), kas savienota ar programmu *Bio-Rad CFX Manager*. Iegūtos rezultātus analizēja datorprogrammā *Seegene Viewer v2.0*. Herpesvīrusu klātbūtnes noteikšanai vienam paraugam izmantoja 5 µl DNS un 15 µl PCR maisījuma ar sekojošu saturu:

MG-V1 MOM	5 µl
EM4	5 µl
EM4 Buferis	4 µl
Iekšējā kontrole	1 µl

Reakcijas apstākļi:

Solis	Ciklu skaits	Temperatūra	Ilgums
1	1	50°C	20 min
2		95°C	15 min
3	45	95°C	10 sek
4*		60°C	15 sek
5*		72°C	10 sek

* - Fluorescence *FAM*, *HEX*, *Cal Red 610* un *Quasar 670* kanālos tiek detektēta 4. un 5. solī.

2.9 EBV specifisko antivielu noteikšana

Visas ELISA mikroplates tika nolasītas izmantojot iekārtu *Varioskan LUX* (Thermo Scientific, ASV), kas savienota ar programmu *SkanIt RE 7.0*.

EBV specifisko antivielu klātbūtni plazmas paraugos noteica izmantojot netiešo ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugā esošie IgG vai IgM saistās pie vīrusa kapsīda antigēniem, ar ko noklāta plates bedrīte.

IgG semikvantitatīvu daudzumu paraugā noteica izmantojot *Anti-EBV-CA ELISA (IgG)* materiālu un reaģentu komplektu, rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola, kas sastāvēja no sekojošiem punktiem:

1. Sagatavoti visi nepieciešamie reaģenti (mazgāšanas buferis, standarti...);
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu buferi, 1:100;
3. Platē duplikātos iepildīti 100 µl katrs standarts, pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un paraugu buferis kā fona, jeb Blank mērījums;
4. Platē iepildīti 100 µl atšķaidītā parauga;
5. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
6. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
8. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā, sargājot no tiešas saules gaismas;
9. Plate mazgāta 3 reizes izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
11. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
13. Veikti optiskā blīvuma (OD) mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

IgM esamība paraugos noteikta izmantojot *Epstein-Barr Virus (VCA) IgM ELISA* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:100;
3. Platē iepildīti 100 µl katrs paraugs, standarts, pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole, bet fona mērījuma bedrīte atstāta tukša;
4. Plate inkubēta 1 stundu 37° C;
5. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;

6. Katrā, izņemot fona, bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
7. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā, sargājot no tiešas saules gaismas;
8. Plate mazgāta 3 reizes izmantojot mazgāšanas buferi;
9. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
10. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
11. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
12. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

2.10 HHV-6 specifisko antivielu noteikšana

HHV-6 specifisko antivielu klātbūtni plazmas paraugos noteica izmantojot netiešo ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugos esošais IgG vai IgM saistīsies pie vīrusa antigēniem, ar ko noklātas plates bedrītes.

IgG esamība paraugos noteikta izmantojot *ELISA-VIDITEST anti-HHV-6 IgG* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:100;
3. Platē iepildīti 100 µl katrs paraugs, standarts, pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un paraugu atšķaidījumu buferis kā fona mērījums;
4. Plate inkubēta 30 minūtes 37° C;
5. Plate mazgāta 4 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
6. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
7. Plate inkubēta 30 minūtes 37° C, sargājot no tiešas saules gaismas;
8. Plate mazgāta 4 reizes izmantojot mazgāšanas buferi;
9. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
10. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
11. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
12. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

IgM esamība paraugos noteikta izmantojot *ELISA-VIDITEST anti-HHV-6 IgM* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:100;

3. Platē iepildīti 100 µl katrs paraugs, standarts, pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole un paraugu atšķaidījumu buferis kā fona mērījums;
4. Plate inkubēta 30 minūtes 37° C;
5. Plate mazgāta 4 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
6. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
7. Plate inkubēta 30 minūtes 37° C;
8. Plate mazgāta 4 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
9. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
10. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
11. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
12. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

2.11 CMV specifisko antivielu noteikšana

CMV specifisko antivielu klātbūtni plazmas paraugos noteica izmantojot netiešo ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugos esošais IgG un/vai IgM saistīsies pie specifiskiem antigēniem, ar ko noklātas plates bedrītes.

IgG esamība paraugos noteikta izmantojot *Anti-CMV ELISA (IgG)* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu buferi, 1:100;
3. Platē duplikātos iepildīti 100 µl katrs standarts, pozitīvā kontrole un paraugu buferis kā fona mērījums;
4. Platē iepildīti 100 µl atšķaidītā parauga;
5. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
6. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
8. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
9. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
11. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
13. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

IgM esamība paraugos noteikta izmantojot *NovaLisa Cytomegalovirus (CMV) IgM* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:100;
3. Platē duplikātos iepildīti 100 µl katrs standarts, pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole, bet fona mērījuma bedrīte atstāta tukša;
4. Platē iepildīti 100 µl atšķaidītā parauga;
5. Plate inkubēta 1 stundu 37° C;
6. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Katrā, izņemot fona bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
8. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
9. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
11. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
13. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

2.12 HSV-1 specifisko antivielu noteikšana

HSV-1 specifisko antivielu klātbūtni plazmas paraugos noteica izmantojot netiešo ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugos esošais IgG un/vai IgM saistīsies pie specifiskiem antigēniem, ar ko noklātas plates bedrītes.

IgG esamība paraugos noteikta izmantojot *Herpes Simplex Virus Type 1 IgG ELISA* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:100, pēc kā tie inkubēti 15 minūtes istabas temperatūrā;
3. Platē duplikātos iepildīti 100 µl katrs standarts, pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole, bet fona mērījuma bedrīte atstāta tukša;
4. Platē iepildīti 100 µl atšķaidītā parauga;
5. Plate inkubēta 1 stundu 37° C;
6. Plate mazgāta 5 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;

7. Katrā, izņemot fona bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
8. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
9. Plate mazgāta 5 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
11. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
13. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

IgM esamība paraugos noteikta izmantojot *Herpes Simplex Virus Type 1 IgM ELISA* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:50, pēc kā tiem pievienots anti-IgG antivielu saturošs šķīdums, 1:1, un paraugi inkubēti 15 minūtes istabas temperatūrā;
3. Platē duplikātos iepildīti 100 µl katrs standarts, pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole, bet fona mērījuma bedrīte atstāta tukša;
4. Platē iepildīti 100 µl atšķaidītā parauga;
5. Plate inkubēta 1 stundu 37° C;
6. Plate mazgāta 5 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Katrā, izņemot fona bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
8. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
9. Plate mazgāta 5 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
11. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
13. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

2.13 HSV-2 specifisko antivielu noteikšana

HSV-2 specifisko antivielu klātbūtni plazmas paraugos noteica izmantojot netiešo ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugos esošais IgG vai IgM saistīsies pie rekombinantiem, vīrusa tipa specifiskiem gG2 proteīniem, ar ko noklātas plates bedrītes.

IgG esamība paraugos noteikta izmantojot *Herpes Simplex Virus Type 2 IgG ELISA* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:100;
3. Platē duplikātos iepildīti 100 µl standarts, pozitīvā kontrole un negatīvā kontrole;
4. Platē iepildīti 100 µl atšķaidītā parauga;
5. Plate inkubēta 1 stundu 37° C;
6. Plate mazgāta 5 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
8. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
9. Plate mazgāta 5 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
11. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
13. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

IgM esamība paraugos noteikta izmantojot *Herpes Simplex Virus Type 2 IgM ELISA* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:50, pēc kā tiem pievienots anti-IgG antivielu saturošs šķīdums, 1:1, un paraugi inkubēti 15 minūtes istabas temperatūrā;
3. Platē duplikātos iepildīti 100 µl standarts, pozitīvā kontrole, negatīvā kontrole, bet fona mērījuma bedrīte atstāta tukša;
4. Platē iepildīti 100 µl atšķaidītā parauga;
5. Plate inkubēta 1 stundu 37° C;
6. Plate mazgāta 5 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Katrā, izņemot fona bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
8. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
9. Plate mazgāta 5 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
11. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
13. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

2.14 VZV specifisko antivielu noteikšana

VZV specifisko antivielu klātbūtni plazmas paraugos noteica izmantojot netiešo ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugos esošais IgG un/vai IgM saistīsies pie specifiskiem antigēniem, ar ko noklātas plates bedrītes.

IgG esamība paraugos noteikta izmantojot *Anti-VZV ELISA (IgG)* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:100;
3. Platē duplikātos iepildīti 100 µl katrs standarts, pozitīvā kontrole un paraugu buferis kā fona mērījums;
4. Platē iepildīti 100 µl atšķaidītā parauga;
5. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
6. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
8. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;
9. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
11. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
13. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

IgM esamība paraugos noteikta izmantojot *Zoster Virus (VZV) IgM ELISA* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamie reaģenti;
2. Paraugi atšķaidīti ar paraugu atšķaidījuma buferi, 1:100;
3. Platē duplikātos iepildīti 100 µl standarts, pozitīvā kontrole un negatīvā kontrole, bet fona mērījuma bedrīte atstāta tukša;
4. Platē iepildīti 100 µl atšķaidītā parauga;
5. Plate inkubēta 1 stundu 37° C;
6. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl HRP konjugāta;
8. Plate inkubēta 30 minūtes istabas temperatūrā;

9. Plate mazgāta 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Katrā bedrītē iepildīti 100 µl TMB substrāta;
11. Plate inkubēta 15 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. Katrā plates bedrītē iepildīti 100 µl STOP (H₂SO₄) šķīdums;
13. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

2.15 sCD14 koncentrācijas noteikšana

sCD14 koncentrācija paraugos tika noteikta izmantojot “sandwitch” ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugos esošais sCD14 saistīsies pie citokīnam specifiskām antivielām, ar ko noklātas plates bedrītes. Tests veikts izmantojot *BioOcean® Human sCD14 ELISA Kit* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Paraugi atšķaidīti ar atšķaidījuma buferi, 1:2000;
2. Sagatavoti testam nepieciešamo reaģentu atšķaidījumi – atšķaidījuma buferis ar dH₂O, 1:10, biotīna konjugātu ar atšķaidījuma buferi, 1:100 un streptavidīna-HRP šķīdumu ar atšķaidījuma buferi, 1:100.
3. sCD14 standartiem veikti sērijuveida atšķaidījumi ar atšķaidījuma buferi, pagatavojot 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250 un 125 pg/ml;
4. Ar atmazgāšanas buferi samitrinātas testa plates bedrītes;
5. Plates bedrītes iepildīti 100 µl atšķaidītie standarti un paraugi, fona mērījumam izmantots atšķaidījuma buferis;
6. Katrā bedrītē pievienoti 50 µl biotīnu konjugētu anti-sCD14 antivielu šķīdums, pēc kā plate 2 stundas inkubēta uz kratītāja (300 rpm) istabas temperatūrā;
7. Veikta bedrīšu mazgāšana 6 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
8. Plates bedrītēs iepildīti 100 µl streptavidīna-HRP konjugāta saturošā šķīduma, pēc kā plate 45 minūtes inkubēta uz kratītāja (300 rpm) istabas temperatūrā;
9. Veikta bedrīšu mazgāšana 6 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
10. Plates bedrītēs iepildīti 100 µl TMB šķīduma, pēc kā tumsā vietā plate inkubēta 10-30 minūtes istabas temperatūrā;
11. Plates bedrītēs iepildīti 100 µl H₂SO₄ šķīduma;
12. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

2.16 IFN- γ koncentrācijas noteikšana

IFN- γ koncentrācija paraugos tika noteikta izmantojot “sandwich” ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugos esošais IFN- γ saistīsies pie citokīnam specifiskām antivielām, ar ko noklātas plates bedrītes. Tests veikts izmantojot *Human IFN γ (Interferon Gamma) ELISA Kit* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Paraugi atšķaidīti ar PBS, 1:9;
2. IFN- γ standartiem veikti sērijveida atšķaidījumi, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 un 15,63 pg/ml;
3. Sagatavoti testam nepieciešamo reaģentu atšķaidījumi – biotīna konjugātu ar tam specifisku buferi, 1:100 un streptavidīna-HRP šķīdumu ar tam specifisku buferi, 1:100.
4. Plates bedrītes iepildīti 100 μ l atšķaidītie standarti un paraugi, fona mērījumam izmantots atšķaidījuma buferis;
5. Plate inkubēta 80 minūtes 37° C;
6. Veikta bedrīšu mazgāšana 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Katrā bedrītē pievienoti 100 μ l biotīnu konjugētu antivielu šķīduma, pēc kā plate inkubēta 50 minūtes 37° C;
8. Veikta bedrīšu mazgāšana 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
9. Plates bedrītēs iepildīti 100 μ l streptavidīna-HRP konjugātu saturošā šķīduma, pēc kā plate inkubēta 50 minūtes 37° C;
10. Veikta bedrīšu mazgāšana 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
11. Plates bedrītēs iepildīti 90 μ l TMB šķīduma, pēc kā tumšā vietā plate inkubēta 20 minūtes 37° C;
12. Plates bedrītēs iepildīti 50 μ l H₂SO₄ šķīduma;
13. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

2.17 TNFRSF17 koncentrācijas noteikšana

TNFRSF17 koncentrācija paraugos tika noteikta izmantojot “sandwich” ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugos esošais TNFRSF17 saistīsies pie citokīnam specifiskām antivielām, ar ko noklātas plates bedrītes. Tests veikts izmantojot *Human*

TNFRSF17/BCMA ELISA Kit PicoKine® materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamo reaģentu atšķaidījumi – biotīna konjugātu ar tam specifisku buferi, 1:100 un avidīna-biotīna-peroksidāzes šķīdumu ar tam specifisku buferi, 1:100.
2. TNFRSF17 standartiem veikti sērijveida atšķaidījumi, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,50 un 31,25 pg/ml;
3. Plates bedrītes iepildīti 100 µl atšķaidītie standarti un paraugi, fona mērījumam izmantots atšķaidījuma buferis;
4. Plate inkubēta 90 minūtes 37° C;
5. Bedrīšu saturs iztukšots un pievienoti 100 µl biotīnu konjugētu anti-TNFRSF17 antivielu šķīdums, pēc kā plate inkubēta 60 minūtes 37° C;
6. Veikta bedrīšu mazgāšana 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Plates bedrītēs iepildīti 100 µl avidīna-biotīna-peroksidāzes kompleksa šķīdums, pēc kā plate inkubēta 30 minūtes 37° C;
8. Veikta bedrīšu mazgāšana 5 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
9. Plates bedrītēs iepildīti 90 µl TMB šķīduma, pēc kā tumšā vietā plate inkubēta 15-25 minūtes 37° C;
10. Plates bedrītēs iepildīti 100 µl reakciju apstādinošs šķīdums;
11. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

2.18 LBP koncentrācijas noteikšana

LBP koncentrācija paraugos tika noteikta izmantojot “sandwich” ELISA metodi, kur pozitīva rezultāta gadījumā paraugos esošais LBP saistīsies pie citokīnam specifiskām antivielām, ar ko noklātas plates bedrītes. Tests veikts izmantojot *Enzyme Immunoassay for Quantification of free human LBP* materiālu un reaģentu komplektu un rīkojoties pēc komplektā norādītā protokola.

1. Sagatavoti testam nepieciešamo reaģentu atšķaidījumi – PBS un atšķaidījuma buferis;
2. LBP standartiem veikti sērijveida atšķaidījumi, pagatavojot 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 un 1,56 ng/ml;
3. Plates bedrītes iepildīti 100 µl atšķaidītie standarti un paraugi, pēc kā plate inkubēta 1 stundu kratītājā istabas temperatūrā;

4. Veikta bedrīšu mazgāšana 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
5. Katrā bedrītē pievienoti 100 μ l ar peroksidāzi konjugētu anti-LBP antivielu šķīduma, pēc kā plate inkubēta 1 stundu kratītājā istabas temperatūrā;
6. Veikta bedrīšu mazgāšana 3 reizes, izmantojot mazgāšanas buferi;
7. Plates bedrītēs iepildīts TMB šķīdums, pēc kā tumšā vietā plate inkubēta 12-13 minūtes istabas temperatūrā;
8. Plates bedrītēs iepildīts reakciju apstādinošs šķīdums;
9. Veikti OD mērījumi katrā bedrītē pie 450 nm viļņu garuma.

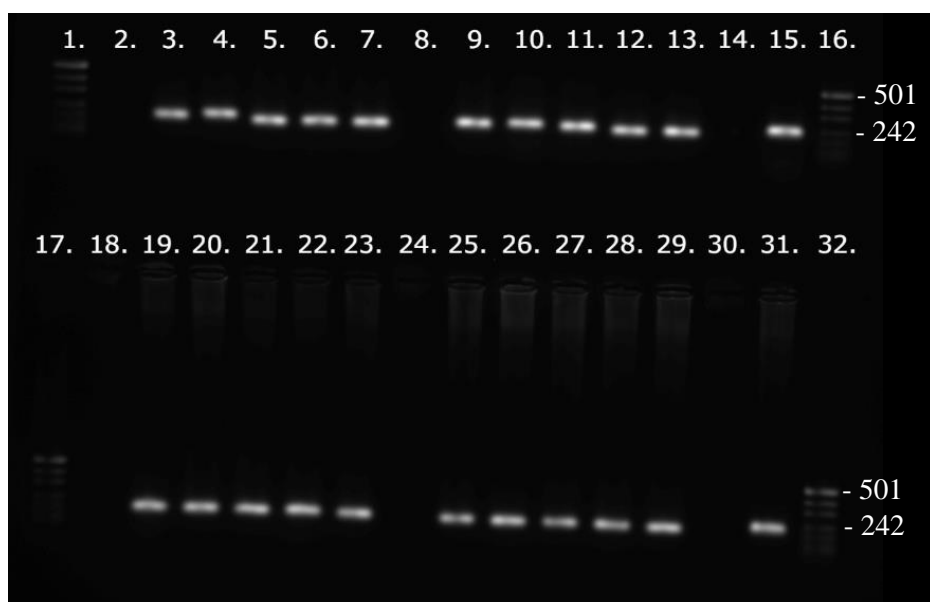
2.19 Statistiskā apstrāde

Lai novērtētu, vai starp iegūtajiem rezultātiem pastāv statistiski būtiska atšķirība, tika izmantota datorprogramma *GraphPad Prism 9* un tajā pieejamās analīzes metodes kā D'Agostīno-Pīrsona un Šapiro-Vilka testi, t-tests parametrisku paraugkopu salīdzināšanai, Manna-Vitneja tests neparametrisku paraugkopu salīdzināšanai, kā arī Fišera eksaktais tests. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski būtiskiem, ja $p < 0,05$.

3. REZULTĀTI

3.1 DNS kvalitātes analīze

Pielietojot PCR, tika noteikta izolētās DNS kvalitāte, pārbaudot β -globīna gēna sekvenču klātbūtni tajā. 1,7 % agarozes gelā elektroforētiski tika analizēti un vizualizēti iegūtie PCR produkti ar garumu 200 bp. Visos DNS paraugos, kas izolēti no PBMC vai perifērajām asinīm tika konstatēta β -globīna gēna sekvenču klātbūtne, savukārt, DNS paraugos, kas izolēti no šūnām brīvas asins plazmas, netika konstatēta β -globīna gēna sekvenču klātbūtne, norādot, ka visi DNS paraugi ir kvalitatīvi.



1. attēls. β -globīna gēna amplifikācijas produkta elektroforētiska analīze 1,7% agarozes gelā. 1., 16., 17., 32. - Marķieris pUC19 DNA/Mspl (HpaII), 23; 2., 8., 14. - DNS, kas izolēta no šūnām brīvas asins plazmas; 3-7., 9-13. - DNS, kas izolēta no PBMC; 15., 31. - Pozitīvā kontrole; 18., 24., 30. - Ūdens, negatīvā kontrole; 19-23., 25-29. - DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm.

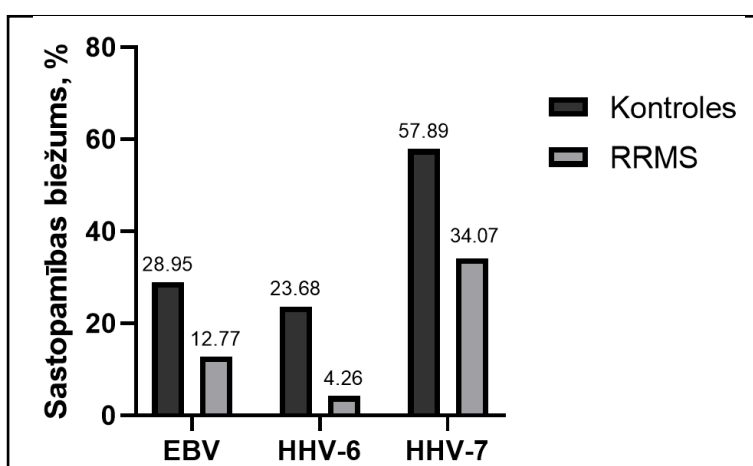
Figure 1. The analysis of β -globin gene amplification product in 1.7% agarose gel electrophoresis. 1., 16., 17., 32. - Marker pUC19 DNA/Mspl (HpaII), 23; 2., 8., 14. - DNA isolated from cell free blood plasma; 3-7., 9-13. - DNA isolated from PBMC; 15., 31. - Positive control; 18., 24., 30. - Water, negative control; 19-23., 25-29. - DNA isolated from peripheral blood.

3.2 Herpesvīrusu infekcijas sastopamība

Izmantojot multiplekss reālā laika PCR metodi, 47 pacientiem ar RRMS un 38 kontrolēm pārbaudīta septiņu cilvēka herpesvīrusu (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6 un HHV-7) genoma sekvenču klātbūtne DNS paraugos, kas izolēta no PBMC vai perifērajām asinīm.

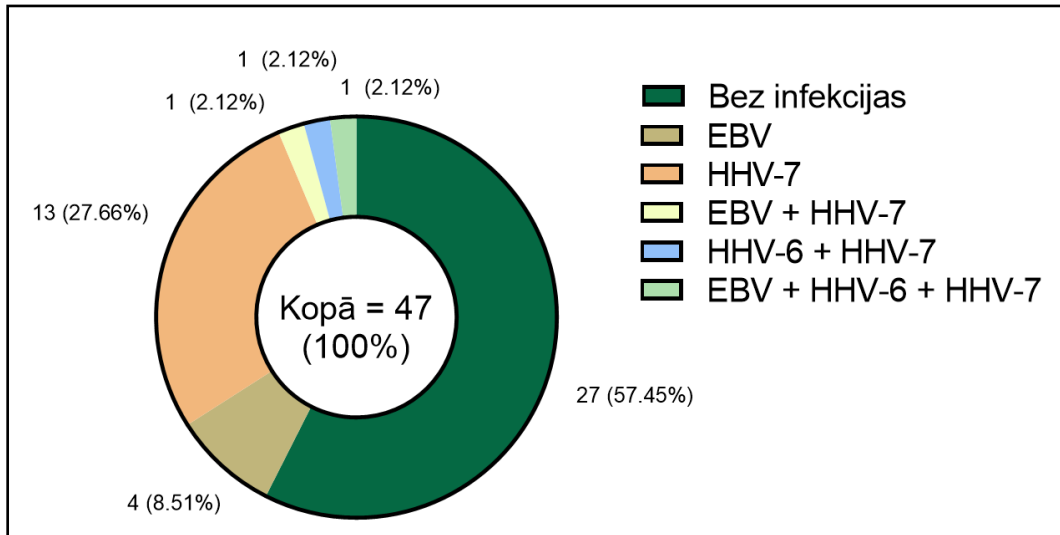
Gan RRMS pacientiem, gan kontrolēm pozitīvi rezultāti tika iegūti tikai EBV, HHV-6 un HHV-7 gadījumā. EBV klātbūtne RRMS pacientu un veselu indivīdu grupās novērota attiecīgi 6 no 47 (12,77%) un 11 no 38 (28,95%) paraugos. HHV-6 RRMS pacientu un veselu indivīdu grupās konstatēts attiecīgi 2 no 47 (4,26%) un 9 no 38 (23,68%) paraugos. HHV-7 RRMS pacientu un veselu indivīdu grupās novērots attiecīgi 16 no 47 (34,04%) un 22 no 38 (57,89%) paraugos. Taču RRMS pacientu un veselu indivīdu grupām attiecīgi 27 no 47 (57,45%) un 7 no 38 (18,42%) netika konstatēta neviena no pārbaudīto vīrusu klātbūtne. Cilvēka herpesvīrusu sastopamības biežums RRMS un kontroles grupās atspoguļots 2. attēlā. Cilvēka herpesvīrusu monoinfekcijas un koinfekcijas gadījumi RRMS un kontroles grupās atspoguļoti, attiecīgi 3. un 4. attēlā.

RRMS grupā, nevienā no pārbaudītajiem DNS paraugiem, kas izolēts no šūnām brīvas asins plazmas, netika konstatēta cilvēka herpesvīrusu 1-7 genoma sekvenču klātbūtne, norādot uz persistentu vīrusu infekciju. Savukārt kontroles grupā, vienā no pārbaudītajiem DNS paraugiem, kas izolēts no šūnām brīvas asins plazmas tika konstatēta HHV-6 genoma sekvenču klātbūtne, norādot uz aktīvu infekciju.



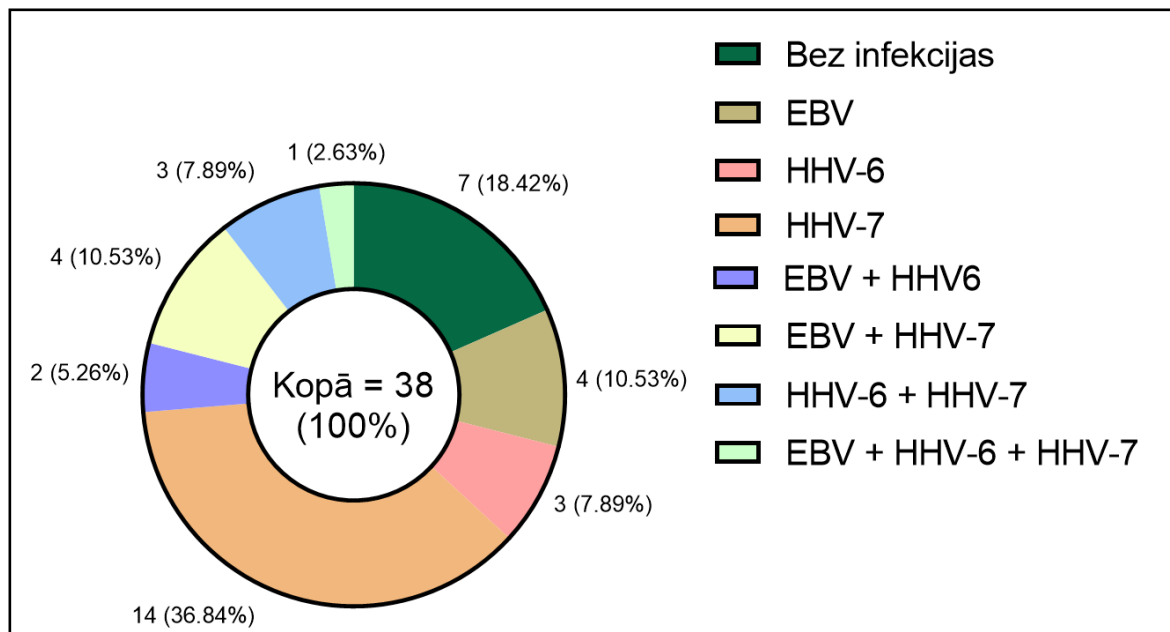
2. attēls. Multiplekss reāla laika PCR rezultāti – cilvēka herpesvīrusu genoma sekvenču sastopamības biežums RRMS un kontroles grupās.

Figure 2. Multiplex real-time PCR results – the prevalence of human herpesviruses genomic sequences in RRMS and control groups.



3. attēls. Multiplex reāla laika PCR rezultāti – cilvēka herpesvīrusu monoinfekcijas un koinfekciju sastopamības biežums RRMS pacientu PBMC paraugos.

Figure 3. Multiplex real-time PCR results - prevalence of human herpesvirus monoinfection and coinfections in RRMS patient PBMC samples.



4. attēls. Multiplex reāla laika PCR rezultāti – cilvēka herpesvīrusu monoinfekcijas un koinfekciju sastopamības biežums veselu indivīdu perifēro asiņu paraugos.

Figure 4. Multiplex real-time PCR results - prevalence of human herpesviruses monoinfection and coinfections in peripheral blood samples of healthy individuals.

3.3 Cilvēka herpesvīrusu specifisko antivielu sastopamība

47 RRMS pacientu un 38 praktiski veselu cilvēku plazmas paraugos noteikta cilvēka herpesvīrusu 1-6 specifisko IgG un IgM klases antivielu klātbūtne. Iegūtie rezultāti apkopoti 5. tabulā. Vidējais EBV, CMV un VZV specifisko IgG klases antivielu līmenis RRMS un kontroles grupā attiecīgi bija: $128,59 \pm 45,03$ RU/ml un $110,12 \pm 51,65$ RU/ml; $102,26 \pm 68,56$ RU/ml un $62,57 \pm 48,39$ RU/ml; $2412,71 \pm 1419,31$ RU/ml un $1203,33 \pm 1179,99$ RU/ml. Iegūtie rezultāti un atšķirības starp grupām atspoguļotas 5. attēlā.

5. tabula.

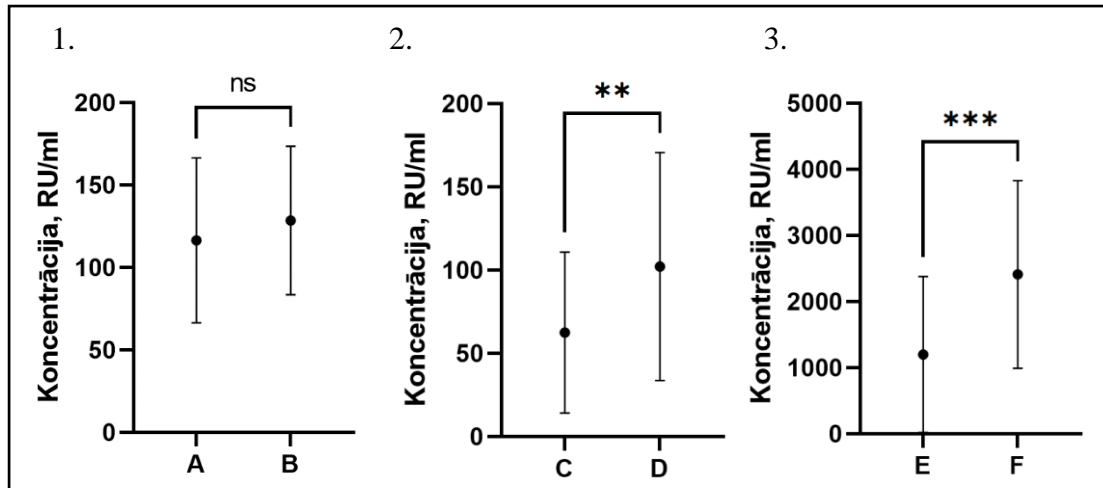
Cilvēka herpesvīrusu 1-6 specifisko antivielu sastopamības biežums kontroles un RRMS grupu plazmas paraugos

Table 5.

Human herpesviruses 1-6 specific antibody prevalence in control and RRMS groups plasma samples

Vīruss/Virus	Antivielu klase/Antibody class	Kontroles grupa/Control group n (%)	RRMS n (%)	p-vērtība/p-value
HSV-1	IgG	29 (76,32%)	32 (68,09%)	0,4721
	IgM	2 (5,26%)	0 (0,00%)	0,1969
HSV-2	IgG	1 (2,63%)	10 (21,28%)	0,0194
	IgM	1 (2,63%)	2 (4,26%)	>0,9999
VZV	IgG	36 (94,74%)	38 (80,85%)	0,1015
	IgM	1 (2,63%)	0 (0,00%)	0,4471
EBV	IgG	25 (65,79%)	38 (80,85%)	0,1393
	IgM	3 (7,89%)	0 (0,00%)	0,0854
CMV	IgG	24 (63,16%)	30 (63,83%)	>0,9999
	IgM	15 (39,47%)	11 (23,40%)	0,1554

HHV-6	IgG	7 (14,89%)	30 (78,95%)	<0,0001
	IgM	1 (2,63%)	34 (72,34%)	<0,0001



5. attēls. Cilvēka herpesvīrusu specifisko IgG klases antivielu līmenis relatīvās vienībās uz mililitru (RU/ml) kontroles un RRMS grupu plazmas paraugos. 1. - EBV specifiskās IgG klases antivielas; A - Kontrole; B – RRMS; 2. - CMV specifiskās IgG klases antivielas; C - Kontrole; D – RRMS; 3. - VZV specifiskās IgG klases antivielas; E - Kontrole; F - RRMS.

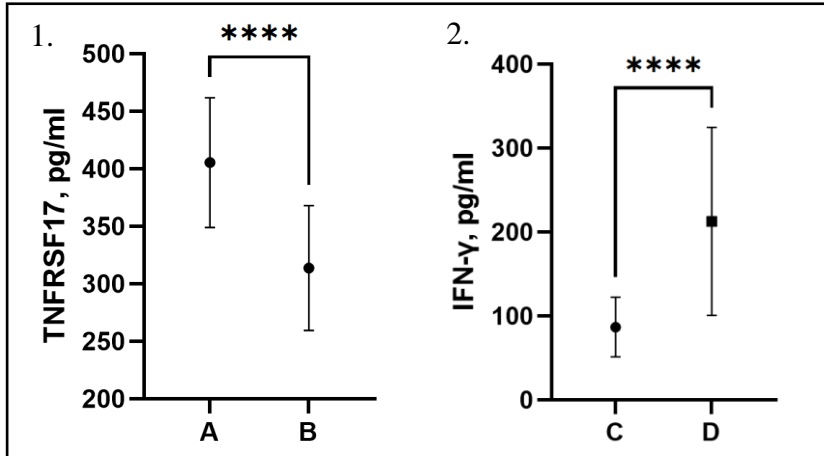
Figure 5. Human herpesviruses specific IgG class antibodies level in relative units per millilitre (RU/ml) in control and RRMS groups plasma samples. 1. - EBV specific IgG class antibodies; A - Control; B – RRMS; 2. - CMV specific IgG class antibodies; C - Control; D – RRMS; 3. - VZV specific IgG class antibodies; E - Control; F - RRMS.

3.4 Potenciālo biomarķieru sastopamība

TNFRSF17, sCD14, IFN- γ un LBP līmenis tika noteikts 46 plazmas paraugos, kas iegūti no RRMS pacientiem un 38 paraugiem, kas iegūti no praktiski veselīgiem indivīdiem.

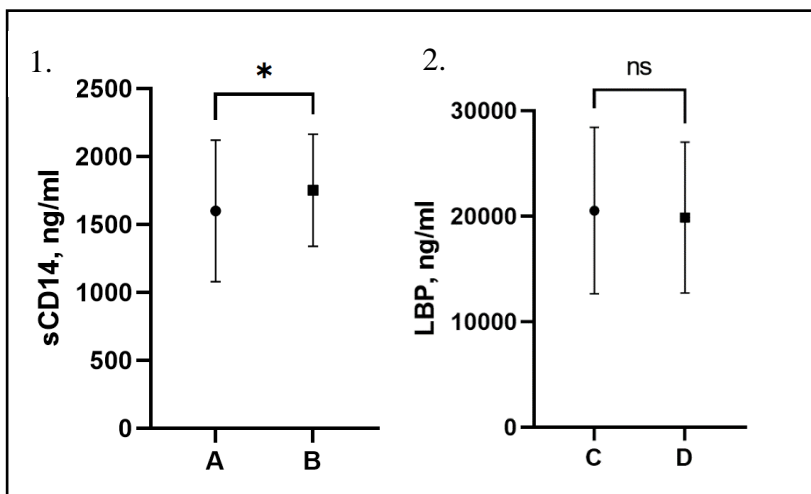
Vidējais TNFRSF17 līmenis RRMS pacientu paraugos bija $309,79 \pm 45,40$ pg/ml, savukārt kontroles grupā $413,04 \pm 60,88$ pg/ml. Vidējais sCD14 līmenis RRMS pacientu paraugos bija $1753,41 \pm 412,06$ ng/ml, savukārt kontroles grupā vidējais līmenis bija $1644,05 \pm 501,28$. Vidējais IFN- γ līmenis bija $215,74 \pm 119,08$ pg/ml RRMS grupā un $80,17 \pm 39,21$ pg/ml kontroles grupā. Vidējais LBP līmenis RRMS grupas plazmas paraugos bija $19888,14 \pm$

7156,00 ng/ml, bet kontroles grupā $20544.86 \pm 7894,18$ ng/ml. Iegūtie rezultāti atspoguļoti attiecīgi 6. un 7. attēlā.



6. Attēls. Potenciālo biomarķieru vidējās koncentrācijas plazmas paraugos. 1. - TNFRSF17; A - Kontrole; B – RRMS; 2. - IFN- γ ; C - Kontrole; D - RRMS.

Figure 6. Potential biomarker mean concentration in plasma samples. 1. - TNFRSF17; A - Control; B – RRMS; 2. - IFN- γ ; C - Control; D - RRMS.



7. attēls. Potenciālo biomarķieru vidējās koncentrācijas plazmas paraugos. 1. - sCD14; A - Kontrole; B – RRMS; 2. - LBP; C - Kontrole; D - RRMS.

Figure 7. Potential biomarker mean concentration in plasma samples. 1. - sCD14; A - Control; B – RRMS; 2. - LBP; C - Control; D - RRMS.

4. DISKUSIJA

Šajā pētījumā pārbaudīta cilvēka herpesvīrusu infekcijas marķieru - genoma sekvenču un specifisko IgG un IgM klases antivielu klātbūtne pacientiem ar RRMS un praktiski veselīem indivīdiem. Kā arī noteikts citokīna IFN- γ , receptora sCD14, proteīna LBP un receptora TNFRSF17 līmenis RRMS pacientu un kontroles grupas plazmas paraugos.

Šajā pētījumā iegūtie rezultāti, saistībā ar herpesvīrusu genoma secības sastopamības biežumu RRMS pacientiem, daļēji atbilst literatūras avotos pieejamajai informācijai. Šajā pētījumā MS pacientiem visbiežāk sastopamais cilvēka herpesvīruss bija HHV-7, taču pretēji citiem pētījumiem, netika konstatēta VZV esamība un ievērojami retāk tika konstatēta EBV klātbūtne. Šajā pētījumā nevienā MS pacienta PBMC paraugā netika konstatēta HSV-1, HSV-2 vai CMV genoma sekvenču esamība, taču vairākos citos pētījumos novērota dažāda šo vīrusu prevalence PBMC paraugos (Najafi *et al.* 2016a, Ferrante *et al.* 2000, Ben Fredj *et al.* 2012).

Meta-analīzes pētījumā novērots, ka MS pacientiem herpesvīrusu detekciju ievērojami ietekmē pētāmo paraugu veidi. Herpesvīrusu prevalence novērota 70% seruma, 55% siekalu, 48% audu, 43% PMBC un 9% CSF paraugos (Khalesi *et al.* 2023). Pētījumā, kur novērtēts HSV sastopamības biežums RRMS pacientu PBMC paraugos, vīrusa DNS esamība novērota 45,1% paraugu, taču praktiski veselām kontrolēm tikai 3,4% (Najafi *et al.* 2016a). Citā pētījumā RRMS pacientiem VZV, EBV, HHV-6 un HHV-7 esamība novērota attiecīgi 7,8%, 31,3%, 5,8% un 33,3% asins paraugu, taču veselīem indivīdiem, attiecīgi 1,96%, 3,9%, 1,96% un 9,8%.

Šajā pētījumā, RRMS pacientu paraugos tika novērots salīdzinoši zemāks EBV, HHV-6 un HHV-7 genoma sekvenču sastopamības biežums, salīdzinot ar praktiski veselīem indivīdiem. Jāpiemin, ka šajā pētījumā cilvēka herpesvīrusu genoma sekvenču klātbūtne RRMS pacientu grupā tika noteikta DNS, kas izolēta no PBMC, bet kontroles grupā – DNS, kas izolēta no perifērajām asinīm, kas varētu būt par iemeslu atšķirīgajiem rezultātiem. Iegūtie kontroles grupas rezultāti daļēji sakrīt ar cita pētījuma, kur veselīem indivīdiem noteikta herpesvīrusu prevalence asins paraugos, izmantojot reālā laika PCR metodi. Hudnall *et al.* no 100 leikocītu bagātiem asins paraugiem izdalīja DNS un novēroja, ka 72% paraugu saturēja EBV, 1% CMV, 30% HHV-6 un 65% HHV-7, taču netika novērota citu herpesvīrusu klātbūtne (Hudnall *et al.* 2008).

Šajā pētījumā vīrusu specifisku antivielu ELISA testos tika detektētas IgG antivielas pret visiem pētāmajiem herpesvīrusiem, taču, salīdzinot ar kontroli, būtiski augstāks sastopamības biežums novērots HHV-6 specifiskajām IgG un IgM klases antivielām un HSV-2 specifiskajām

IgG klases antivielām. Jāpiemin, ka IgM klases antivielu klātbūtne RRMS pacientu plazmas paraugos liecina par aktīvu vīrusu infekciju. Tomēr, lai pārlicinoši noteiktu cilvēka herpesvīrusu aktivācijas fāzi paraugos, būtu nepieciešams noteikt vīrusu RNS klātbūtni, kas ir aktīvas replikācijas marķieris. Salīdzinot ar kontroles grupu, būtiski augstāks līmenis novērots CMV un VZV specifiskām IgG klases antivielām. Šajā pētījumā iegūto EBV un VZV specifisko IgM sastopamība atšķiras, nenovērojot to klātbūtni (Farrell *et al.* 2009). Neskatoties uz to, citos pētījumos minēts, ka starp MS pacientiem un kontrolēm VZV IgM līmenim nav novērota statistiski būtiska atšķirība, kas sakrīt ar šī pētījuma rezultātiem (Najafi *et al.* 2016b, Ordoñez *et al.* 2004). Pretēji citiem pētījumiem, šajā pētījumā iegūtais MS pacientu EBV kapsīda antigēnam specifiskais IgG līmenis būtiski neatšķirās no kontroles grupas (Deeba *et al.* 2019, Abdelrahman *et al.* 2014). Šajā pētījumā iegūtais HHV-6 specifiskais IgG un IgM sastopamības biežums ir līdzīgs Ablashi *et al.* publikācijai, kur tika izdalīti seruma paraugi no MS pacientiem un HHV-6 specifiskais IgG un IgM tika konstatēti attiecīgi 90,4% un 71,4% paraugu (Ablashi *et al.* 2000). Šī pētījuma rezultāti daļēji atbilst meta-analīzei, kas iekļāvasi 1756 pacientus ar MS un CIS. Tajā tika pētīta slimības sakarība ar HHV-1 un HHV-2, kur tika novērota statistiski būtiska korelācija starp HHV-2 specifisko IgG serumā un MS, taču HHV-2 DNS esamībai paraugos netika novērota ietekme uz MS vai CIS (Xu *et al.* 2021). Šajā pētījumā līdzīgi rezultāti tika iegūti Salim *et al.* publikācijai - pētot CMV specifisko antivielu līmeni MS pacientu asinīs, novērots IgG un IgM līmeņa pieaugums, taču statistiski būtiska atšķirība novērota tikai pret CMV specifiskam IgG (Salim *et al.* 2017).

Literatūras avotos visiem pētījumā iekļautajiem potenciāliem biomarķieriem tiek pieminēta sakarība ar MS, taču statistiski būtiski no kontrolēm atšķirās TNFRSF17 ($p < 0,0001$), sCD14 ($p = 0,0458$) un IFN- γ ($< 0,0001$). Pretēji literatūras avotiem, šajā pētījumā TNFRSF17 sasniedza būtiski zemāku līmeni, salīdzinot ar kontroli (Kalyan *et al.* 2022, Lutterotti *et al.* 2006, Arellano *et al.* 2015, Mahler *et al.* 2020).

5. SECINĀJUMI

- Pētījumā konstatē cilvēka herpesvīrusu – EBV, HHV-6 un HHV-7 genoma sekvenču klātbūtni RRMS pacientiem, tomēr retāk kā kontroles grupai, kas, iespējams, skaidrojams ar vīrusu detekciju atšķirīgos bioloģiskajos materiālos;
- Šī pētījuma rezultāti liecina, ka IFN- γ un sCD14 varētu būt potenciāli RRMS biomarkieri;
- Iegūtie rezultāti liecina, ka TNFRSF17 līmenis RRMS pacientu grupā salīdzinājumā ar kontroles grupu ir statistiski zemāks, taču tas nesakrīt ar literatūras avotos minēto;
- RRMS pacientiem novēro būtisku sakarību starp palielinātu HSV-2 specifisko IgG klases antivielu un HHV-6 specifisko IgG un IgM klases antivielu sastopamības biežumu salīdzinājumā ar kontroles grupu;
- RRMS grupā novēro būtisku sakarību starp VZV un CMV specifisko IgG klases antivielu līmeņa pieaugumu salīdzinājumā ar kontroles grupu.

PATEICĪBAS

Izsaku lielu paldies darba vadītājam Andai Vilmanei par pacietību un sniegto atbalstu darba izveidē!

Paldies Zaigai Norai-Krūklei par iespēju izstrādāt bakalaura darbu RSU Zinātnes centra Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā!

Paldies Sabīnei Grāvelsiņai par darba recenzēšanu!

Liels paldies Kasparam Tāram par sniegto laiku un palīdzību darba pilnveidošanai!

IZMANTOTĀS LITERATŪRAS SARAKSTS

Abdelrahman H.S., Selim H. S., Hashish M.H., Sultan L.I. 2014. Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. - *The Journal of the Egyptian Public Health Association*, 89(2): 90–95.

Ablashi D.V., Eastman H.B., Owen C.B., Roman M.M., Friedman J., Zabriskie J.B., Peterson D.L., Pearson G.R., Whitman J.E. 2000. Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients. - *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 16(3): 179–191.

Arellano G., Ottum P.A., Reyes L.I., Burgos P.I., Naves R. 2015. Stage-Specific Role of Interferon-Gamma in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. - *Frontiers in immunology*, 6, 492.

Ascherio A., Munger K.L. 2010. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. - *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 5(3): 271–277.

Ben Fredj N., Rotola A., Nefzi F., Chebel S., Rizzo R., Caselli E., Frih-Ayed M., Di Luca D., Aouni M. 2012. Identification of human herpesviruses 1 to 8 in Tunisian multiple sclerosis patients and healthy blood donors. - *Journal of neurovirology*, 18(1): 12–19.

Boyko A., Therapontos C., Horakova D., Szilasiová J., Kalniņa J., Kolontareva J., Gross-Paju K., Selmaj K., Sereike I., Milo R., Gabelić T., Rot U. 2021. Approaches and challenges in the diagnosis and management of secondary progressive multiple sclerosis: A Central Eastern European perspective from healthcare professionals. - *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 50: (102778).

Carey E., Halper J. 2022. Multiple Sclerosis (MS) Treatments. Healthline. <https://www.healthline.com/health/multiple-sclerosis/treatment> Skatīts 31.05.2024

Coquery C.M., Erickson L.D. 2012. Regulatory roles of the tumor necrosis factor receptor BCMA. - *Critical reviews in immunology*, 32(4): 287–305.

Criste G., Trapp B., Dutta R., 2014. Chapter 5 - Axonal loss in multiple sclerosis: causes and mechanisms. – In: Goodin D.S (ed.), *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, 122: 101-113.

Davison A.J. 2007. Chapter 1 - Overview of classification. – In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K (ed.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, Cambridge University Press.

Deeba E., Koptides D., Gaglia E., Constantinou A., Lambrianides A., Pantzaris M., Krashias G., Christodoulou C. 2019. Evaluation of Epstein-Barr virus-specific antibodies in Cypriot multiple sclerosis patients. - *Molecular immunology*, 105: 270–275.

Demmler-Harrison G.J. 2009. CHAPTER 171 – CYTOMEGALOVIRUS. – In: Feigin R.D., Cherry J.D., Demmler-Harrison G.J., Kaplan S.L (ed.), *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases (Sixth Edition)*, W.B. Saunders, 2022-2043.

Ding H., Wang G., Yu Z., Sun H., Wang L. 2022. Role of interferon-gamma (IFN- γ) and IFN- γ receptor 1/2 (IFN γ R1/2) in regulation of immunity, infection, and cancer development: IFN- γ -dependent or independent pathway. - *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 155: 113683.

Escribano B.M., Medina-Fernández F.J., Aguilar-Luque M., Agüera E., Feijoo M., Garcia-Maceira F. I., Lillo R., Vieyra-Reyes P., Giraldo A. I., Luque E., Drucker-Colín R., Túnez I. 2017. Lipopolysaccharide Binding Protein and Oxidative Stress in a Multiple Sclerosis Model. – *Neurotherapeutics*, 14(1): 199–211.

Farrell R.A., Antony D., Wall G.R., Clark D.A., Fisniku L., Swanton J., Khaleeli Z., Schmierer K., Miller D.H., Giovannoni G. 2009. Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. - *Neurology*, 73(1): 32–38.

Ferrante P., Mancuso R., Pagani E., Guerini F.R., Calvo M.G., Saresella M., Speciale L., Caputo D. 2000. Molecular evidences for a role of HSV-1 in multiple sclerosis clinical acute attack. - *Journal of neurovirology*, 6(2): S109–S114.

Fàbrega-Ferrer M., Coll M. 2021. Structures of Tailed Phages and Herpesviruses (*Herpesviridae*). – In: Bamford D.H., Zuckerman M (ed.), *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*, Academic Press, 1: 318-328.

Gilden D.H., 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. - *The Lancet Neurology*, 4(3): 195-202.

Goldenberg M.M. 2012. Multiple sclerosis review. - *P&T*, 37(3): 175–184.

Guan Y., Jakimovski D., Ramanathan M., Weinstock-Guttman B., Zivadinov R. 2019. The role of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: from molecular pathophysiology to in vivo imaging. - *Neural regeneration research*, 14(3): 373–386.

Gupta M., Shorman M. 2023. Cytomegalovirus. - In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.

Harding K., Zhu F., Alotaibi M., Duggan T., Tremlett H., Kingwell, E. 2020. Multiple cause of death analysis in multiple sclerosis. - *Annals of Neurology*, 65(3): 239- 248

Hashioka S., Klegeris A., Schwab C., McGeer P. L. 2009. Interferon-gamma-dependent cytotoxic activation of human astrocytes and astrocytoma cells. - *Neurobiology of aging*, 30(12): 1924–1935.

Hoover K., Higginbotham K. 2023. Epstein-Barr Virus. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.

Hudnall S.D., Chen T., Allison P., Tying S.K., Heath A. 2008. Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. - *Transfusion*, 48(6): 1180–1187.

Induruwa I., Constantinescu C.S., Gran B. 2012. Fatigue in multiple sclerosis — A brief review. - *Journal of the Neurological Sciences*, 323(1): 9-15

James C., Harfouche M., Welton N.J., Turner K.M., Abu-Raddad L. J., Gottlieb S.L., Looker K.J. 2020. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. - *Bulletin of the World Health Organization*, 98(5): 315–329.

Je-Kyung R., Soo Jin K., Sang-Hyun R., Ji In K., Hi Eun J., Dongsun L., Heung Kyu L., Jie-Oh L., Beom Seok P., Tae-Young Y., Ho Min K. 2017. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. – *Immunity*, 46(1): 38-50.

Kalyan M., Tousif A.H., Sonali S., Vichitra C., Sunanda T., Praveenraj S.S., Ray B., Gorantla V.R., Rungratanawanich W., Mahalakshmi A.M., Qoronfleh M.W., Monaghan T.M., Song B., Essa M.M., Chidambaram S.B. 2022. Role of Endogenous Lipopolysaccharides in Neurological Disorders. – *Cells*, 11(24): 4038.

Kantor B., Bailey R.M., Wimberly K., Kalburgi S.N., Gray S.J. 2014. Chapter Three - Methods for Gene Transfer to the Central Nervous System. – In: Friedmann T., Dunlap J.C., Goodwin S.F (ed.), *Advances in Genetics*, Academic Press, 87: 125-197.

Khalesi Z., Tamrchi V., Razizadeh M.H., Letafati A., Moradi P., Habibi A., Habibi N., Heidari J., Noori M., Nahid Samiei M., Azarash Z., Hoseini M., Saadati H., Bahavar A., Farajzade M., Saeb S., Hadadi M., Sorouri Majd M., Mothlaghzadeh S., Fazli P., Asgari K., Kiani S.J., Ghorbani, S. 2023. Association between human herpesviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. - *Microbial pathogenesis*, 177: 106031.

King O., Al Khalili Y. 2023. Herpes Virus Type 6. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.

Kopp F., Kupsch S., Schromm A.B. 2016. Lipopolysaccharide-binding protein is bound and internalized by host cells and colocalizes with LPS in the cytoplasm: Implications for a role of LBP in intracellular LPS-signaling. - *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(4): 660-672.

Koskie B. 2022. Multiple Sclerosis: Facts, Statistics, and You. Healthline. <https://www.healthline.com/health/multiple-sclerosis/facts-statistics-infographic> Skatīts 31.05.2024.

Kuhle J., Sati P., 2024. The Role of Biomarkers in Multiple Sclerosis. - *Bridging the Gaps, New Directions and Practice Impacting Recommendations in Multiple Sclerosis*, 8-10.

Louten J. 2023a. Chapter 13 – Herpesviruses. – In: *Essential Human Virology (Second Edition)*, 255-276.

Louten J. 2023b. Chapter 5 – Virus transmission and epidemiology. – In: *Essential Human Virology (Second Edition)*, 77-99.

Louten J. 2023c. Chapter 6 – The immune response to viruses. – In: *Essential Human Virology (Second Edition)*, 101-117.

Lovering C. 2020. Why It Pays to Start Multiple Sclerosis (MS) Treatment Early. Healthline. <https://www.healthline.com/health/multiple-sclerosis/recently-diagnosed-why-start-ms-treatment-early> Skatīts 31.05.2024.

Lucena-Aguilar G., Sánchez-López A.M., Barberán-Aceituno C., Carrillo-Ávila J.A., López-Guerrero J.A., Aguilar-Quesada R. 2016. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. - *Biopreservation and biobanking*, 14(4): 264–270.

Luecke S., Paludan S.R. 2015. Chapter Two - Innate Recognition of Alphaherpesvirus DNA. – In: Maramorosch K., Mettenleiter T.C (ed.), *Advances in Virus Research*, Academic Press, 92(63): 63-100.

Lutterotti A., Kuenz B., Gredler V., Khalil M., Ehling R., Gneiss C., Egg R., Deisenhammer F., Berger T., Reindl M. 2006. Increased serum levels of soluble CD14 indicate stable multiple sclerosis - *Journal of neuroimmunology*, 181(1-2): 145–149.

Mahler M.R., Søndergaard H.B., Buhelt S., von Essen M.R., Romme Christensen J., Enevold C., Sellebjerg F. 2020. Multiplex assessment of cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. - *Multiple sclerosis and related disorders*, 45: 102391.

Marcos V., Latzin P., Hector A., Sonanini S., Hoffmann F., Lacher M., Koller B., Bufler P., Nicolai T., Hartl D., Griese M. 2010. Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases. - *Respiratory research*, 11(1): 32.

Mayo Clinic Staff. 2022. Multiple sclerosis. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/multiple-sclerosis/diagnosis-treatment/drc-20350274> Skatīts 31.05.2024.

Miller D.H., Chard D.T., Ciccarelli O. 2012. Clinically isolated syndromes. - *The Lancet Neurology*, 11(2): 157-169.

Najafi S., Ghane M., Poortahmasebi V., Jazayeri S.M., Yousefzadeh-Chabok S. 2016a. Prevalence of Herpes Simplex Virus Infection in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. - A Case-Control Study in the North of Iran, *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 11(3): e36576.

Najafi S., Ghane M., Yousefzadeh-Chabok S., Amiri, M. 2016b. The High Prevalence of the Varicella Zoster Virus in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Case-Control Study in the North of Iran. - *Jundishapur journal of microbiology*, 9(3): e34158.

Ordoñez G., Pineda B., Garcia-Navarrete R., Sotelo, J. 2004. Brief presence of varicella-zoster viral DNA in mononuclear cells during relapses of multiple sclerosis. - *Archives of neurology*, 61(4): 529–532.

Paudere–Logina S., Pastare D. 2023. Multiplā skleroze. Raksturojums un eksperta komentārs – Doctus. <https://www.doctus.lv/raksts/medicina-un-farmacija/kliniska-prakse/multipla-skleroze.-raksturojums-un-eksperta-komentars-5716/> Skatīts 31.05.2024.

Pozzilli C., Pugliatti M., Vermersch P., Grigoriadis N., Alkhawajah M., Airas L., Oreja-Guevara C. 2023. Diagnosis and treatment of progressive multiple sclerosis: A position paper. - *European journal of neurology*, 30(1): 9–21.

Raetz C.R., Reynolds C.M., Trent M.S., Bishop R.E. 2007. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. - *Annual review of biochemistry*, 76: 295–329.

Reichelt M., Brady J., Arvin A.M. 2009. The replication cycle of varicella-zoster virus: analysis of the kinetics of viral protein expression, genome synthesis, and virion assembly at the single-cell level. - *Journal of virology*, 83(8), 3904–3918.

Rewane A., Tadi P. 2023. Herpes Virus Type 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.

Saleh D., Yarrarapu S.N.S., Sharma S. 2023. Herpes Simplex Type 1. – In: StatPearls, StatPearls Publishing.

Salim M. A., Eftekharian M.M., Taheri M., Yousef Alikhani M. 2017. Determining the IgM and IgG antibody titer against CMV and helicobacter pylori in the serum of multiple sclerosis patients comparing to the control group in Hamadan. - *Human antibodies*, 26(1): 23–28.

Santpere G., Telford M., Andrés-Benito P., Navarro A., Ferrer I. 2020. The Presence of Human Herpesvirus 6 in the Brain in Health and Disease. - *Biomolecules*, 10(11): 1520.

Sharygin D., Koniaris L.G., Wells C., Zimmers T.A., Hamidi T. 2023. Role of CD14 in human disease. - *Immunology*, 169(3): 260–270.

Tan Y., Kagan J.C. 2014. A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. - *Molecular cell*, 54(2): 212–223.

Vaillant A.A.J., Stang C.M. 2023. Lymphoproliferative Disorders. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Walton C., King R., Rechtman L., Kaye W., Leray E., Marrie R.A., Robertson N., Rocca N., Uitdehaag B., Mei I., Wallin M., Helme A., Napier C.A., Rijke N., Baneke P. 2020. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. - *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14): 1816-1821.

Wang Z., Chen C., Wang L., Jia Y., Qin Y. 2022. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for multiple myeloma. - *Frontiers in immunology*, 13, 1050522.

Weiner H.L. 2009. The challenge of multiple sclerosis: How do we cure a chronic heterogeneous disease?. - *Annals of Neurology*, 65(3): 239-248.

Wofford A.S., McCusker I., Green J.C., Vensko T.A., Pellett P.E. 2020. Chapter Ten - Betaherpesvirus assembly and egress: Recent advances illuminate the path. – In: Kielian M., Mettenleiter T.C., Roossinck M.J (ed.), *Advances in Virus Research*, Academic Press, 108: 337-392.

Xu L., Zhang L.J., Yang L., Yang C.S., Yi M., Zhang S.N., Wang N., Huang C.N., Liu M.Q. 2021. Positive association of herpes simplex virus-IgG with multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. - *Multiple sclerosis and related disorders*, 47: 102633.

Dokumentārā lapa

Bakalaura darbs „Cilvēka herpesvīrusu infekcijas, imūnās aktivācijas un neurodeģenerācijas marķieru sastopamības biežums pacientiem ar recidivējoši remitējošu multiplo sklerozi” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un LUISā iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai un/vai e-studijās iesniegtai darba elektroniskai versijai.

Autors: Haralds Jakštāns

Datums:

Paraksts:

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs:

Datums:

Paraksts:

Recenzents:

Datums:

Paraksts:

Darbs iesniegts LU Bioloģijas fakultātē

Studiju metodiķe:

Datums:

Paraksts:

Darbs aizstāvēts Bioloģijas bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

prot. Nr. , vērtējums

Komisijas sekretārs/e: