

LATVIJAS UNIVERSITĀTES  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**FIBROMIALĢIJAS SAISTĪBA AR BETA-HERPESVĪRUSU HHV-6A,  
HHV-6B UN HHV-7 INFEKCIJU**

Bakalaura darbs

Autors: **Agnese Vanaga**

Studenta apliecības Nr.: av11150

Darba vadītājs: Vad.pētn., Dr.habil.biol. Svetlana Čapenko

RĪGA 2014

# SATURA RĀDĪTĀJS

ANOTĀCIJA.....	4
SUMMARY .....	5
APZĪMĒJUMU SARAKSTS .....	6
IEVADS .....	7
1 LITERATŪRAS APSKATS.....	8
1.1 Fibromialģija.....	8
1.2 Fibromialģijas patoģenēze un etioloģija .....	9
1.2.1 Fibromialģijas ārstēšana .....	11
1.3 Herpesvīrusi .....	11
1.3.1 HHV6A, HHV6B, HHV-7 .....	12
1.3.2 HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 iespējamā saistība ar fibromialģiju .....	15
2 MATERIĀLI UN METODES .....	16
2.1 Pacienti un asins paraugi.....	16
2.2 DNS izdalīšana un kvantitātes kontrole.....	16
2.3 $\beta$ Globīna PĶR.....	17
2.4 Polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu .....	18
2.5 HHV-6 vīrusa genoma sekvenses klātbūtnes noteikšana .....	18
2.5.1 HHV-6A un HHV-6B vīrusu diferencēšana.....	20
2.6 HHV-7 genoma secības klātbūtnes noteikšana.....	21
2.7 PBMC izdalīšana no asinīm.....	23
2.8 RNS izdalīšana, kvantitātes un kvalitātes kontrole.....	23
2.9 Reversās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcija.....	24
2.10 $\beta$ -Aktīna PĶR .....	24
2.11 HHV-6 U89/U90 gēna secības klātbūtnes noteikšana .....	25
2.12 HHV-6 U60/U66 gēna secības klātbūtnes noteikšana .....	26
2.13 Agarozes gēla elektroforēze.....	27
2.14 Vīrusspecifisku antivielu noteikšana .....	27
2.15 Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija.....	27
2.16 Materiāli.....	28
2.16.1 Reaģenti .....	28
2.16.2 Aprīkojums .....	29

2.17	Darba drošība .....	29
3	REZULTĀTI.....	30
3.1	DNS kvalitātes pārbaude .....	30
3.2	IgG klases antivielu klātbūtne fibromialģijas sindroma pacientu plazmas paraugos	30
3.3	HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 infekciju sastopamība .....	32
3.4	Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija.....	36
3.5	HHV-6 gēnu ekspresija.....	37
4	DISKUSIJA.....	38
5	SECINĀJUMI.....	41

## ANOTĀCIJA

Fibromialģijas patogēnēze vēl joprojām ir neskaidra un kā viens no iespējamajiem slimības izraisītājiem tiek uzskatīta vīrusa infekcija. Šajā darbā tika pētīta vīrusu HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 iespējamā saistība ar fibromialģijas sindromu.

Pētījumā iekļauti 22 fibromialģijas pacienti, kuriem pēc ARC diagnostikas kritērijiem diagnosticēta fibromialģija.

Noteica HHV-6 un HHV-7 specifisko IgG klases antivielu klātbūtni asins plazmas paraugos. Izmantojot nPKR analizēja HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 vīrusu genoma secības klātbūtni DNS, kas izdalīta no pilnām asinīm un DNS, kas izdalīta no asins plazmas. Pārbaudīja HHV-6 U60/U66 un U89/U90 gēnu secību klātbūtne fibromialģijas pacientu paraugos.

Vairumam, 82 % fibromialģijas pacientu ir HHV-6 specifiskās IgG antivielas un 77% ir HHV-7 specifiskās IgG klases antivielas.

36% fibromialģijas pacientu paraugos konstatēta HHV-6 vīrusa genoma secības klātbūtne, no tiem 37% asins plazmā. 75% no detektētajiem vīrusiem HHV-6B, bet 25% HHV-6A. 77% paraugos detektēta HHV-7 genoma secības klātbūtne, to tiem 19% vīrusa genoma secība detektāta asins plazmā.

HHV-6 U60/U66 gēnu secību klātbūtne netika konstatēta nevienā no analizētajiem paraugiem, bet U89/90 gēnu secību klātbūtne konstatēta 100% paraugos, kuros ar nPKR tika konstatēta HHV-6 genoma secības klātbūtne.

Bakalaura darbs izstrādāts RSU Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā „Fibromialģijas un mialģiskā encefalomiēlīta/hroniskā noguruma saistība ar beta herpesvīrusu (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7) un parvovīrusa B19 infekciju” projekta ietvaros.

Atslēgas vārdi: Fibromialģija, HHV-6A, HHV-6B, HHV-7

## SUMMARY

The pathogenesis of fibromyalgia is still unclear but one of the possible causes to the disease is considered to be a virus infection. In this work HHV-6A, HHV-6B and HHV-7 virus possible association with fibromyalgia syndrome was studied.

The study included 22 fibromyalgia patients who were diagnosed with fibromyalgia by ARC diagnostic criteria.

Presence of HHV-6 and HHV-7 specific IgG class antibodies in plasma samples were identified, using nPCR the presence of viral genome HHV-6A, HHV-6B and HHV-7 sequence in whole blood and in plasma was determined. Presence of HHV-6 U60/U66 and U89/90 gene sequence in fibromyalgia patients was inspected.

Quantity 82% of fibromyalgia patients had HHV-6 specific IgG antibodies and 77% of patients had HHV-7 specific IgG class antibodies. 33% of fibromyalgia patients HHV-6 viral genome sequence was recognized, 37% of them it was found in plasma. 75% of detected were HHV-6B and 25% HHV-6A viruses. In 77% of analyzed samples HHV-7 genome sequence was recognized, 19% of them it was found in plasma. Presence of HHV-6 genes U60/U66 in samples was not detected, but U89/U90 gene sequence was recognized in all samples who were tested on HHV-6 and viral genome sequence was found.

Bachelor thesis was done in August Kirchenstein Institute of Microbiology and Virology Riga Stradins University in project „ Association of fibromyalgia and myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome with beta-herpesviruses (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7) and parvovirus B19 infection ”

Key words: fibromyalgia, HHV-6A, HHV-6B, HHV-7

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- 5- HT- 5-hidroksitriptamīna receptors  
ARC - *American College of Rheumatology commitee*  
B19 – cilvēka parvovīruss B19  
Bp – bāžu pāri  
ciHHV-6 – hromosonāli integrēts cilvēka herpesvīruss-6  
CNS – centrālā nervu sistēma  
DNS – dezoksiribonukleīnskābe  
dNTP – dezoksiribonukleotīdtrifosfāts  
E – agrīnie/ early  
EBV – Epšteina-Barra vīruss  
ELISA- imūnenzimātiskais tests (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)  
GH- augšanas hormons  
HCV- hepatīta c vīruss  
HHV-6 - cilvēka herpesvīruss-6  
HHV-6A – cilvēka herpesvīruss-6A  
HHV-6B – cilvēkas herpesvīruss-6B  
HHV-7- cilvēka herpesvīruss-7  
HIV – cilvēka imunodeficīta vīruss  
ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses  
IE – nekavējoši agrīnie/ immediate early  
IgG – Imūnglobulīns G  
IL- interleikīns  
kDNS – komplementārais DNS  
L – vēlie/ late  
nPKR – polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšēju praimēšanu  
PBL – perifēro asiņu leukocīti  
PBMC – perifēro asiņu mononukleārā šūnas  
PBS – fosfāta buferšķīdums  
RSU- Rīgas Stradiņu Universitāte  
SDS – nātrija dodecilsulfāts

## IEVADS

Fibromialģija ir bieži nepareizi diagnosticēta reimatiska slimība, kurai ir raksturīgas plaši izplatītas, hroniskas sāpes muskuļos un allodīnija. Šī hroniskā, mokošā slimība galvenokārt ietekmē sievietes pusmūža gados un ar izplatības lielumu, kas jau ir pielīdzināms reimatiskajam artrītam. Vēl līdz šim slimības etioloģija un patoģenēze paliek neskaidra, nav pieejami ne standartizēti marķieri, ne testi slimības diagnostikai, tapēc daudzi slimības gadījumi tā arī netiek diagnosticēti. Dažādi faktori kā centrālās un autonomās nervu sistēmas, neironu signālu pārvades, imūnsistēma disfunkcija, ārēji stresori, psihiatriskie un citi aspekti tiek uzskatīti par iesaistītiem sindroma patoģenēzē. Zinātnieku uzskata, ka fibromialģijas iespējamais izraisītājs var būt arī kāds pagaidām vēl nezināms infekcijas aģents, piemēram, vīruss, tajā skaitā arī beta-herpesvīrusi.

Beta-herpesvīrusu dzimtai piederošie cilvēka herpesvīrus-6A, -6B un -7 ir ļoti plaši izplatīti vīrusi veselu cilvēku populācijā, tie ir neotropi un imūnmodulējoši vīrusi, kuriem ir raksturīga spēja uz mūžu palikt latentiem savā saimniekorganismā un reaktivēties imūnsupresijas laikā. Tieši šo vīrusu neotropo īpašību dēļ tie tiek asociēti ar fibromialģiju.

Iegūtie rezultāti būs oriģināli, jo līdz šim Latvijā nav datu par HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 vīrusu infekciju izplatību pacientiem ar fibromialģijas sindromu.

Šī pētījuma mērķis bija konstatēt HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 vīrusu sastopamību un iespējamo vīrusu reaktivāciju fibromialģijas pacientiem.

Mērķa sasniešanai izvirzīti šādi darba uzdevumi:

1. Izdalīt DNS no pilnām asinīm un no asins plazmas cilvēkiem ar diagnosticētu fibromialģijas sindromu un praktiski veseliem asins donoriem, pārbaudīt DNS kvalitāti un kvantitāti.
2. No perifēro asiņu mononukleārām šūnām izdalīt RNS, pārbaudīt kvalitāti un kvantitāti, un sintezēt komplementāro DNS.
3. Pārbaudīt HHV-6 un HHV-7 specifisko IgG klases antivielu klātbūtni asins plazmā, fibromialģijas pacientiem.
4. Ar nPKR noteikt un analizēt HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 genomu secību klātbūtni pacientu DNS paraugos, kas izdalīti no pilnām asinīm un DNS paraugos, kas izdalīti no asins plazmas.
5. Ar nPKR noteikt un analizēt HHV-6 gēnu U60/U66 un U89/U90 klātbūtni fibromialģijas pacientiem.
6. Ar reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju noteikt HHV-6 un HHV-7 vīrusu slodzes fibromialģijas pacientiem.

# 1 LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1 Fibromialģija

Fibromialģija ir sindroms, ko raksturo plašas hroniskas sāpes daudzos jūtīgos punktos, daudzveidīgs un mainīgs klīniskais spektrs, locītavu stīvums un tādi sistēmiski simptomi kā garastāvokļa svārstības, nogurums, kognitīvā disfunkcija un bezmiegs, bez skaidri definēta slimības pamata ( Bellato et al. 2012).

Lai gan sapratne par šo sindromu ir uzlabojusies tā etioloģija un patoģenēze vēl ir neskaidra, diagnostika grūta, tiek uzskatīts, ka fibromialģija netiek konstatēta 3 no 4 cilvēkiem, kas cieš no šī sindroma (Clauw, Arnold, and McCarberg 2011).

Pētījumi liecina, ka fibromialģijas sindroms skar 2-5% no populācijas, attīstītajās valstīs, pārsvarā slimo jaunas līdz pusmūža vecuma sievietes (Guymer 2013). Sieviešu un vīriešu attiecība, kuriem diagnosticēti šie traucējumi ir 9:1 (Staud 2011). Tā kā fibromialģijas cēlonis nav zināms, nav standartizētu bioloģisko marķieru un testu diagnozes apstiprināšanai, tādēļ šīs medicīnas diagnozes eksistence ilgi ir bijusi apšaubīta un tā ir uz simptomiem pamatota (Bellato et al. 2012).

Tas, kas šodien tiek definēts kā fibromialģija sindroms deviņpadsmitajā gadsimtā jau tika aprakstīts kā termins „fibrositis”, bet tikai divdesmita gadsimta septiņdesmitajos gados Smythe and Moldofsky ieviesa jauno terminu fibromialģija un identificēja īpašu jūtīgos reģionus, vēlāk sauktus par „jutīgajiem punktiem” (Wolfe et al..1990) (1.attēls). Tikai 1990.gadā *American College of Rheumatology commitee (ACR)* izstrādāja plaši lietotus diagnostikas kritērijus, kas lai diagnosticētu sindromu noteica, ka jāizpildās abiem punktiem:

- 1) vēsture ar plaši izplatītām skeleta-muskuļu sāpēm vismaz trīs mēnešus,
- 2) jūtīgums vismaz 11 no 18 noteiktajiem punktiem.

Sāpēm ir jābūt abās ķermeņa pusēs, jāskar laukumi virs un zem jostasvietas un sāpēm ir jābūt asām.

Lai gan pateicoties *ACR* izveidotajiem diagnostikas kritērijiem, attīstījās pētījumi šajā jomā un ārstēšanas stratēģijas uzlabojās, šie kritēriji tika kritizēti un 2010.gadā *Wolfe* ar kolēģiem tos modificēja (Bellato et al. 2012). Modificētie diagnostikas kritēriji, kas pašlaik tiek lietoti, lai atšķirtu pacientus ar fibromialģiju un pacientus ar citiem traucējumiem ir :

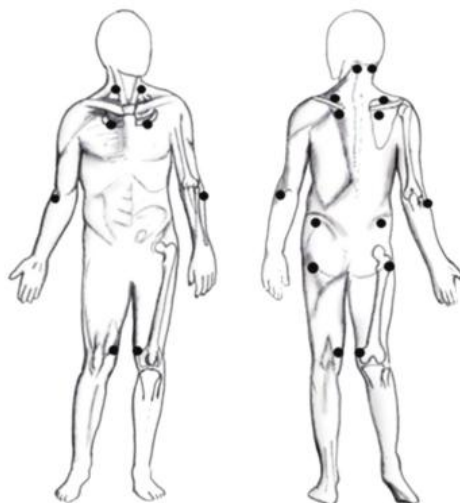
1. sāpju izplatības indekss (*widespread pain index, WPI*) – sāpīgo ķermeņa reģionu skaits. Tiek atzīmētas vietas, kurās pacientam bijušas sāpēs pēdējās nedēļas laikā, tiek apskatīti šādi rajoni- plecu josla, gūžas, žoklis, muguras augšdaļa, muguras lejasdaļa, augšdelms, augšstilbs, krūtis, kakls, vēdera dobums, apakšdelms, apakšstilbs ( šos laukumus apskata abpusēji ).
2. Simptomu ( nogurums, traucēts miegs/piecelies neizgulējies, izziņas traucējumi) smaguma (*SS*) skala. No 0 līdz 3 apzīmē sāpju smagumu (0- nav problēmu, 1- nenozīmīgas vai vieglas problēmas, parasti – vieglai vai neregulāras, 2- mērenas; vērā ņemamas problēmas, biežas un/vai mērenā līmenī, 3- stipras; tādas, kas izplatās, nepārtrauktas, dzīvi-traucējošas problēmas.
3. Citi simptomi – Galvassāpēs, vēdera dobuma sāpes, depresija. Jā vai nē.

Lai diagnosticētu fibromialģiju :  $WPI \geq 7/19$  un  $SS$  skala  $\geq 5$  vai

$WPI$  3 - 6 un  $SS$  skala  $\geq 9$

\*simptomi jau ir vismaz 3 mēnešus

\*nav citu izskaidrojošu diagnožu ( Wolfe et al. 2011).



1.attēls. Jūtīgie punkti fibromialģijas pacientiem.

Figure 1. Tender points for fibromyalgia patients.

## 1.2 Fibromialģijas patoģenēze un etioloģija

Dažādi faktori kā centrālās un autonomās nervu sistēmas, neironu signālu pārvades un imūnsistēma disfunkcija, ārēji stresori, psihiatriskie un citi aspekti tiek uzskatīti par iesaistītiem fibromialģijas sindroma patoģenēzē (Bellato 2012).

Centrālā sensibilizācija tiek uzskatīta par galveno mehānismu, kas iesaistīts. Tas tiek definēts kā pārāk jutīga atbilde uz stimulācijām, ko signalizē CNS (Clauw et al. 2011). Centrālā sensibilizācija ir spontānu nervu aktivitātes, receptīvo laukumu palielināšanās un palielināta stimulu atbilde, ko pārnes aferentie nervi (Staud and Smitherman 2002). Neatkarīgi no paaugstinātajiem neironu mehānismiem neirogliju šūnu aktivācija arī spēlē svarīgu lomu fibromialģijas patoģenēzē, tāpēc, ka tās palīdz modulēt sāpju pārnesi muguras smadzenēs, ko aktivē vairāki sāpīgi stimuli, kas atbrīvo iekaisumu citokīnus, slāpekļa oksīdu, prostaglandīnu un reaktīvā skābekļa sugas, kas stimulē un pagarina muguras smadzeņu hiperuzbudinātību (Watkins et al. 2001). Dažādi nervu impulsu pārnesēji arī tiek uzskatīti par iesaistītiem centrālajā sensibilizācijā un tiek meklēti šo neurotransmiteru līmeņu izmaiņas serumā un likvorā, piemēram, serotīna, kam ir ļoti svarīga loma sāpju modulācijā un 5-HT, taču ziņas par rezultātiem ir strīdīgas (Bellato et al. 2012).

Citas parādības, kas arī varētu būt iesaistītas fibromialģijas patoģenēzē ir anomālijas miega ciklā, miega traucējumi. Pacienti nespēj sasniegt dziļo, atjaunojošo, IV fāzes miegu un tā tiešās sekas tam varētu būt tādas, ka pacientiem ir GH un insulīnam līdzīgā augšanas faktora deficīts, šie hormoni atbild par muskuļu mikrotraumu labošanu (Roizenblatt et al. 2001; Bellato et al. 2012). Traucējumi hipotalāma-hipofīzes asīs ar izmainītu kortizola līmeni, ģenētiskais polimorfisms, kā rezultātā notiek pārmaiņas CNS serotonīnerģiskos un kateholamīnerģiskos procesos arī tiek iesaistīts patoģenēzē (Guymer, 2013). Cilvēkiem ar 5-HT<sub>2A</sub> receptora 102T/C polimorfismu ir novērots lielāks risks saslimt ar fibromialģiju, taču šis polimorfisms nav specifisks fibromialģijai un tiek attiecināms uz dažādām radnieciskām slimībām (Lee et al. 2012). Fibromialģija ir bieži sastopama cilvēkiem ar autoimūnam saslimšanām un nesenie pētījumi demonstrē, ka imunoloģiskie traucējumi arī varētu izsaukt fibromialģiju. Augstāki IL-10, IL-8 un TNF- $\alpha$  līmeņi tika novēroti, kas liek domāt par iekaisuma atbildes nozīmību slimības patoģenēzē (Podolecki, Podolecki and Hrycek, 2009).

Bieži fibromialģijas sindroms ir sastopams kopā ar citām kondīcijām, ieskaitot, kairinātās zarnas sindromu, spriedzes tipa galvassāpes un migrēna, hroniska iegurņa sāpēm, hroniskā noguruma sindromu u.c. (Clauw et al., 2011).

Zinātnieku uzskata, ka fibromialģijas iespējama izraisītājs var būt arī kāds pagaidām vēl nezināms infekcijas aģents, piemēram, vīruss (Ablin, Shoenfeld, & Buskila, 2006). Interneta aptaujā, kurā piedalījās 2596 cilvēki ar fibromialģijas sindromu tika noskaidrots, ka 26,7 % simptomu sākšanos asociēja ar akūtu saslimšanu, ko var izraisīt pēkšņa vīrusa reaktivācija (Bennett et al. 2007). Svarīgu lomu šīs slimības asociācijā ar infekcioziem aģentiem varētu spēlēt citokīni un gliju šūnas, kas ekspresē receptorus baktērijām un vīrusiem (Bellato et al. 2012). Dažādi infekciju aģenti pagaidām tiek saistīti ar fibromialģijas

sindromu, piemēram, HCV, HIV, Koksaki B, EBV, HHV-6, B19, tādas baktērijas kā *Borrelia*, *Mycoplasmas* un *Chlamydia*. Taču tieša infekciozo aģentu saistība ar šo sindromu vēl nav pierādīta (Nicolson 2002.; Ablin et al. 2006.; Bellato et al. 2012).

### 1.2.1 Fibromialģijas ārstēšana

Mērķi fibromialģijas ārstēšanā ir atvieglot sāpes, palielināt spēcinošā miega daudzumu un uzlabot fiziskās funkcijas, samazinot sindroma simptomus. Pagaidām fibromialģijas sindroma simptomu mazināšanai un terapijai lieto vairākas metodes. Ne-farmakoloģiskās metodes visbiežāk saistītas ar dažāda veida regulāriem vingrojumiem, spēka treniņiem, jogu, meditāciju, kas varētu uzlabot situāciju ar nogurumu un miega traucējumiem (Bellato et al., 2012).

Tā kā pagaidām vēl nav nekādu speciālu diagnostikas testu un standartizētu bioloģisko marķieru, tāpēc nav arī speciālas farmaceitiskās vielas fibromialģijas ārstēšanai (Guymmer, 2013). Bieži kā pirmo līdzekli fibromialģijas terapijai izmanto dažādus pretsāpju medikamentus, piemēram, tādu simptomu kā muskuļu sāpes mazināšanai. Ibuprofēns, naproksēns un tramadols tiek uzskatīti par labākiem simptomu mazināšanai (Goldenberg et al. 2004).

Izmanto arī antidepresantus un neiromodulējošus pret-lēkmju līdzekļus, kas spēj ievērojami samazināt sāpes un arī palīdz tikt galā ar tādiem fibromialģijas simptomiem kā depresija un miega traucējumiem (Podolecki et al., 2009).

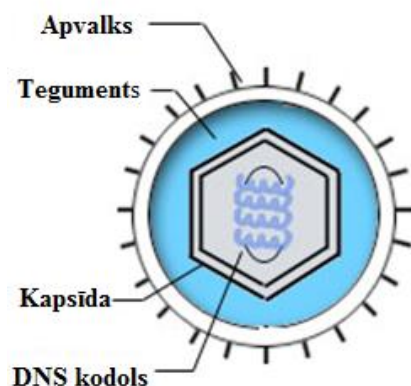
Vairāki zinātnieki uzskata, ka fibromialģijas sindroma izraisītājs varētu būt arī kāds infekcijs aģents, bet pētījumi par antibiotiku vai pretvīrusa terapijas iedarbību uz pacientiem ar fibromialģiju ir maz, lai izdarītu pārliecinošus secinājumus par to iedarbību (Nicolson 2002; Kendall et al. 2004).

## 1.3 Herpesvīrusi

Sastopami astoņi cilvēka herpesvīrusi, pamatojoties uz ģenētiskajām analīzēm par to strukturālajiem proteīniem gH cilvēka herpesvīrusi tiek iedalīti trīs apakšdzimtās: alfa -, beta-, gamma-herpesvīrusos. To galvenā kopīgā iezīme ir spēja uz mūžu palikt latentiem vai persistentiem savā saimniekorganismā un reaktivēties organisma imūnsupresijas laikā. (Bolle, Naesens, & Clercq 2005).

Visu herpesvīrusu galvenie struktūras elementi ir: nukleokapsīda ar ikosaedrisku simetriju, kura diametrs ir 90-110 nm, kura satur vīrusa lineāru, divpavedienu DNS, apvalks,

kurā iestiprināti vīrusa glikoproteīni un teguments, kas sastāv no proteīnu maisījuma, kas aizpilda vietu starp nukleokapsīdu un apvalku (Yoshida et al., 1989) (2.attēls).



2.attēls. Herpesvīrusu shematiskā uzbūve.

Figure 2.Schematic structure of herpesviruses.

### 1.3.1 HHV6A, HHV6B, HHV-7

Saskaņā ar starptaustisko vīrusu taksonomiju cilvēka HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 pieder pie *Herpesviridae* dzimtas, *Betaherpesvirinae* apakšdzimtas un *Roseolovirus* ģints (Levy J., 1997). Cilvēka herpesvīrusu-6 pirmo reizi jau 1986.gadā izdalīja no pacientiem ar limfoproliferatīvām slimībām un to izdarīja Salahudini ar kolēģiem (Casselli and Di Luca, 2007). Cilvēka herpesvīrus-7 pirmo reizi 1990.gadā tika izolēts no vesela pieauguša cilvēka CD4+ limfocītiem (Frenkel et al., 1990). Primārā inficēšanās ar šiem vīrusiem parasti notiek jau agrā bērnībā. 1988.gadā tika atklāts, ka bērniem agrīnā vecumā HHV-6 izraisa drudzi un izsitumus, ko nosauca par *Exanthem subitum*, drudzis parādās bērniem no sešu mēnešu līdz trīs gadu vecumam un tas var skart vairākus orgānus, kā arī CNS, ir novērots, ka arī HHV-7 vīrusa infekcija var izraisīt *Exanthem subitum*, taču infekcija var norisināties arī bez klīniskiem simptomiem (Yamanishi et al. 1988; Magalhaes et al. 2011) un HHV-7 vīrusa infekcija parasti parādās vēlāk (Ward et al. 2005).

Abi vīrusi ir ģenētiski līdzīgi, šo vīrusu nukleotīdu sekvenču identitāti dažādos gēnos ir 20 līdz 75% un virioniem ir novērojami daži kopīgi antigēnu epitopi (Ward 2005, Casselli and Di Luca 2007).

Neilgi pēc cilvēka herpesvīrusa-6 atklāšanas, divi atšķirīgi varianti HHV-6A un HHV-6B tika identificēti, pirmie, kas atklāja abus HHV-6 variantus bija Frenkels un kolēģi. Abiem variantiem bija atšķirīgs *in vitro* tropisms atsevišķām T šūnu līnijām, specifiska imunoloģiskā

reaktivitāte ar monoklonālajām antivielām, dažādas endonukleāzes restrikcijas vietas un specifiska starpdzimtu variācija to DNS sekvencē (Ablashi et al. 2013). Kopumā abiem tipiem vairāk kā 90% sekvenču homologija, lielākā novirze ir IE-1 reģionā (U86 līdz U95, izņemot U94 gēnos), kur atšķiras līdz pat 31% sekvences. Šajā reģionā vīrusiem atšķiras splaisinga sistēma un transkripcijas regulācija, kas varētu liecināt par to, ka tieši šis reģions nosaka galvenās bioloģiskās atšķirības starp variantiem A un B (Dominguez et al. 1999; Isegawa et al. 1999).

2012.gadā *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* klasificēja HHV-6A un HHV-6B kā atsevišķus vīrusus. Norādot uz to galvenajām atšķirībām (Ablashi et al. 2013):

- HHV-6B ir dominantais vīruss perifērajās asinīs un ir dominantais vīruss, kas aktivējas transplantācijās.
- HHV-6B, bet ne HHV-6A ir asociēts ar febrīlajiem krampjiem un deniņu daivas epilepsiju.
- HHV-6A, bet ne HHV-6B tiek saistīts ar Hašimoto tireodītu.
- HHV-6A ir dominantais vīruss, kas atrasts izskaistītās sklerozes pacientiem.
- HHV-6A, bet ne HHV-6B produktīvi inficē CD8+ T šūnas, dabiskās galētājšūnas un gamma/delta T šūnas.
- Abi vīrusi lieto CD46 kā šūnu receptorus, HHV-6B var lietot arī CD134.
- HHV-6A, bet ne HHV-6B var replicēties cilvēku nervu stumbra šūnās un oligodendrocītu priekšteču šūnās.
- HHV-6A var replicēties astrocītos; HHV-6B infekcija nepilnīgi attīstās.
- HHV-6B hemokīns u83B ir specifisks priekš CCR2 un var saistīt šūnas latentas vai lītiskas infekcijas laikā, kamēr HHV-6A hemokīns U83A ir ar plašāku specifiku ietekmējot dendrītiskās, dabisko galētājšūnu aktivētās un ādas T šūnas.
- Vairākas monoklonālas antivielas ir vīrus-specifiskas.
- HHV-6B ir dominantais vīruss sākotnējā infekcijā visos reģionos, izņemot Āfriku.

HHV-6B, HHV-6A un HHV-7 ir ļoti plaši izplatīti vīrusi veselu cilvēku populācijā, tie paliek latenti makrofāgos un T-limfocītos, šie vīrusi bieži sastopami veselu donoru siekalās (Casselli and Di Luca, 2007).

HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 vīrusi ir limfotropi un imūnmodulējoši, to sākotnējai infekcijai seko vīrusa persistence saimniekorganismā mūža garumā, to galvenās mērķšūnas ir

CD4+ T-šūnas (Mori and Yamanishi 2007). Herpesvīrusu gēnu transkripcija un ekspresija ir cieši un koordinēti regulēta infekcijas cikla laikā: IE proteīni, kurus kodē  $\alpha$  gēni, aktivē  $\beta$ -gēnus, kuri pēc kārtas pārslēdzas vēlo produktu, kurus kodē  $\gamma$  gēns, sintēzē. Šīs īpašības izmanto, lai noteiktu kinētisko klasi atlasītajiem vīrusa gēniem, ar mērķi identificēt transkripcijas modeli HHV-6A un HHV-6B DNS produktīvā un latentā infekcijā (Mirandola et al. 1998). Produktīvā infekcijā, inficētās šūnas ekspresē vairumu, ja ne visus, vīrusu gēnus. IE vai  $\alpha$  gēni, tiek ekspresēti pirmie, tiem seko E  $\beta$  gēni un L  $\gamma$  gēni. Persistentas infekcijā latentā fāzē parasti tiek ekspresēti tikai maza daļa gēnu, lai tikai saglabātu dzīvotspēju, no IE reģioniem ( Rotola et al. 1998).

Vīrusu genoma un antigēnu detekcija nervu šūnās *in vivo* un *in vitro* liecina, ka abi vīrusi HHV-6A un HHV-6B ir neotropiski ( Fotheringham et al. 2007), tie spēj inficēt nervu šūnas, ieskaitot astrocītus un oligodendrocītus, bet HHV-6B spēj uzturēt tikai nepilnīgi attīstījušos infekciju, kamēr HHV-6A nostiprina produktīvu infekciju, kas vēlāk pāriet latentā stadijā (Ahlqvist et al. 2005). HHV-6A un HHV-6B vīrusi var inficēt arī daudz citas cilvēka šūnas, piemēram, makrofāgus, dendrītiskās šūnas, epitēlija šūnas, kaulu smadzeņu priekšteču šūnas. Abi vīrusi var inficēt arī endotēlija šūnas, nostiprinot zema līmeņa produktīvu infekciju, un fibroblastus, bet fibroblastos tikai HHV-6A spēj mazā līmenī ražot infekcijas pēcnācējus (Caselli and Di Luca 2007). HHV-6A un HHV-6B vīrusu lielais tropisms izskaidrojams ar to, ka galvenais šo vīrusu receptors CD46 ir plaši izplatīts (De Bolle, 2005).

Noskaidrots, ka HHV-6A un HHV-6B vīrusi spēj integrēties šūnas genomā, kas liecina par to, ka vīrusi var tikt pārnesti gan horizontālā, gan vertikālā ceļā (Richman et al., 2002). Pēc HHV-6 infekcijas parasti seko klasisks herpesvīrusu replikācijas cikls ar infekcijas virionu atbrīvošanu un inficētās šūnas iznīcināšanu ( Gravel et al. 2013).

Ir pierādīts, ka HHV-7 vīruss kā receptoru izmanto glikoproteīnu CD4, bet ir iespējams, ka arī citas molekulas var kalpot par receptoriem un vīruss spēj inficēt arī šūnas, kas neekspresē CD4. CD4+ T šūnām ir svarīga loma imūnās atbildes indukcijā un aizskarot tās HHV-7 potenciāli var izsaukt imūno degradāciju (Lusso et al. 1994). Šūnas, kas spēj ekspresēt HHV-7 strukturālos antiēģēnus ir detektētas plaušās, ādā, piena dziederos, arī nierēs, aknās un mandelēs, bet HHV-7 pozitīvo šūnu skaits šajās šūnās bija zems (Kempf et al. 1998). Atšķirībā no HHV-6 vīrusu infekcijām, kas regulē CD4 T limfocītos un izraisa tā ekspresiju CD4- negatīvajās šūnās, pēc inficēšanās ar HHV-7 vīrusu cilvēka CD4+ T-šūnās tiek novērota CD4 antigēna samazināšanos uz šūnas virsmas (Furukawa et al. 1994).

HHV-6A, HHV6B un HHV-7 vīrusu reaktivācija var notikt novājinātas imūnsistēmas gadījumos, piemēram, ilgstoša stresa apstākļos, imūnsupresantu lietošanas laikā, pēc ilgstošas anestēzijas, transplantāciju, AIDS gadījumā u.c. (Yalcin et al. 1994). Ir pētījumi, kas ziņo par

to, ka HHV-6 vīrusi var būt reaktivēti *in vitro* pēc HHV-7 vīrusa infekcijas (Katsafanas et al. 1996). Reaktivējoties šie vīrusi var izsaukt dažādas komplikācijas- imūnsistēmas, nervu sistēmas un citu organisma sistēmu izmaiņas (Bolle 2005.; Caselli and Di Luca 2007).

Nesenie pētījumi liecina, ka abi HHV-6A un HHV-6B vīrusi spēj integrēties saimniekšūnas hromosomu telomērās un tos sauc ciHHV-6 un *in vitro* pētījumos pierādīts, ka ciHHV-6 aktivēties un izraisīt aktīvu vīrusa replikāciju (Prusty, Krohne and Rudel 2013).

### **1.3.2 HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 iespējamā saistība ar fibromialģiju**

Vairāki faktori tiek pagaidām asociēti ar fibromialģijas sindromu ieskaitot fizikas traumas, emocionāls stress un noteiktas infekcijas (Buskila, Atzeni, & Sarzi-Puttini, 2008). Hroniskas sāpes, nogurums un jutīgums, kas raksturīgs fibromialģijai arī ir novērojams pacientiem ar hronisku vīrusu vai baktēriju infekciju, tāpēc nav pārsteigums, ka jau agrākos pētījumos tika meklētas liecības par infekciju ar patogēnu fibromialģijas (Ablin et al., 2006).

Tā kā HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 ir neotropiski vīrusi un spēj apiet imūnsistēmu un „iebrukt” centrālajā nervu sistēmā. Pašlaik ir teorija, ka HHV-6 vīrusi CNS iebrūk caur ožas nerviem un *in vitro* HHV-6A vīrusa infekcija spēj veidot produktīvu infekciju neirogliju šūnās, kas arī iespējams reprezentē *in vivo* rezervuāru latentai vīrusa infekcijai CNS (Harberts et al. 2011), savukārt kādas izmaiņas neirogliju šūnu aktivācijā var izraisīt traucējumus sāpju pārneses modulēšanās, šis aspekts tiek uzskatīts par iesaistītu fibromialģijas patoģenēzē (Watkins et al. 2001). Pētījumi liecina, ka arī HHV-7 var iebrukt un izraisīt latentu infekciju CNS (Yoshikawa et al. 2000).

Turklāt jāuzsver ir tas, ka fibromialģijai līdzīgais un radnieciskais hroniskā noguruma sindroms jau sen tiek asociēts ar HHV-6 un HHV-7 un jaunākie pētījumi liek domāt, ka šie vīrusi ir iesaistīti sindroma etiopatogēnēzē (Ablashi et al. 1994, Chapenko et al. 2012).

## 2 MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1 Pacienti un asins paraugi

Pētījums veikts atbilstoši drošības standartiem un ar Rīgas Stradiņa Universitātes Ētikas komitejas atļauju un pirms izpētes visi dalībnieki deva savu piekrišanu.

Pētījumā tika iekļauti 22 pacienti, 21 sievietes (95,5%) un 1 vīrietis(4,5%), kuriem tika diagnosticēta fibromialģija. Pacientu asins paraugi saņemti no Paula Stradiņa Klīniskās Universitātes slimnīcas Neiroloģijas klīnikas. Pacientu vidējais vecums ir 52 gadi. Slimība tik diagnosticēta saskaņā ar ACR ( *American College of Rheumatology commitee* ) pamatkritērijiem.

Kontroles grupā tika iekļauti 20 praktiski veseli donori.

Saņemtie asins paraugi tika safasēti pa 0,5ml ependorfa stobriņos. Visi paraugi tika uzglabāti pie -70°C.

### 2.2 DNS izdalīšana un kvantitātes kontrole

DNS izolēšanai no pilnām asinīm izmantoja, ependorfos safasētos, 0,5ml asiņu paraugus un šūnas tika lizētas asinīm pievienojot 1 ml lizējošā bufera. Paraugus samaisīja un centrifugēja 10000 apgr./min 3 minūtes, lai šūnas tiktu nogulsnētas. Supernatantu noņēma un paraugam pievienoja 1 ml destilēta ūdens atmazgāšanai un paraugs tika atkārtoti centrifugēts pie 10000 apgr./min 3 minūtes. Vēlreiz atdalīja supernatantu un nogulsnēm pievienoja 80 µl proteīnāzes K bufera, kas nepieciešams proteīnu šķelšanai, 20 µl 20% SDS (nātrija dodecilsulfāts), kas šķeļ leukocītu membrānas, 15 µl proteīnāzes K, kas piedalās proteīnu denaturācijā un destilēta ūdens līdz 0,5ml atzīmei. Paraugus samaisīja un inkubēja četras stundas 55°C temperatūrā.

DNS izdalīšanai lietotāja standarta fenola- hloroforma metodi. Pēc inkubācijas paraugam pievienoja 0,5 ml fenola, kas attīra paraugus no piemaisījumiem. Lai ekstrahētu DNS, paraugus uzmanīgi maisīja 6 minūtes un pēc tam paraugus centrifugēja pie 10000 apgr./min. 10 minūtes. Atdalīja supernatantu un pievienoja 250 µl fenola un 250 µl hloroforma, kas palīdz palielināt organiskās fāzes blīvumu, paraugus maisīja un centrifugēja kā iepriekš. Atkal atdalīja supernatatu un pievienoja 0,5 ml hloroforma, paraugus atkārtoti maisīja un centrifugēja. Lai nogulsnētu DNS pie tā pievienoja 1 ml ledusaukstu 96% etanolu, un centrifugēja 14000 apgr./min. 15 minūtes, +4°C temperatūrā. Etanolu nolēja un nogulsnēm pievienoja 1 ml 70% etanola un paraugu centrifugēja kā iepriekš. Etanolu nolēja un DNS

šķīdināja destilētā ūdenī, ko pievienoja atkarībā no DNS percipitātu daudzuma, paraugus atstāja uz nakti inkubēties +4°C. DNS glabāja -80°C.

DNS izolēšanu no asins plazmas veica, izmantojot 200 µl plazmas paraugus un DNS attīrīšanas kolonas ( QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen GmbH, Vācija). Izolēšanu veica saskaņā ar ražotāja instrukciju.

DNS un paraugu koncentrācijas mērīšanai izmantoja spektrofotometru „NanoDrop”, kas mēra elektromagnētisko šķidrumspraugumu. Ar programmas ND1000 palīdzību noteica nukleīnskābes koncentrāciju, sistēmu iestatot un nosakot absorbciju pie 260nm viļņa garuma. Sistēmas kalibrēšanai lietoja 2 µl destilēta ūdens. DNS paraugu koncentrāciju mērīja ņemot 2µl katra parauga. Iegūtie rezultāti tika izteikti nanograms mikrolitrā (ng/µl).

### 2.3 β Globīna PĶR

No pilnām asinīm izdalīta DNS parauga kvalitātes noteikšanai un lai izslēgtu šūnu izcelsmes DNS piemaisījumus no plazmas izdalītajā DNS izmantoja β globīna PĶR saskaņā ar *Vadamme et al. 1995*.

Praimeru secība:

GS268 5' – ACACAACCTGTGTTCACTAGC – 3'

GS269 5' – TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG – 3'

B globīna gēna noteikšanai, maisījuma pagatavošanai vienam paraugam (25µl) izmantoja:

10x PĶR buferi	2,5µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2µl
10 mM dNTP	0,5µl
100 µM GS268 praimerī	0,1µl
100µ M GS269 praimerī	0,1µl
5U/µl Taq polimerāzi	0,1µl
3x destilēta ūdens	17,7µl
DNS parauga	2µl

Paraugu amplifikācijas programma:

1.	Denaturācijas posms	3 min.	95°C
2.	Hibridizācijas posms- 40 cikli	3 min.	95°C
		30 sek.	55°C
		45 sek.	72°C
3.	Pēdējais elongācijas posms	7 min.	72°C

Pēc amplifikācijas, paraugus analizēja 1,7% agarozes gelā, elektroforētiski. Izmantojot UV gaismu un marķieri pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker23 (Thermo Scientific, Lietuva) noteica amplifikācijas produkta izmēru. Par attīrītu un kvalitatīvu DNS uzskatīja, ja no pilnām asinīm izdalīta DNS ieguva PĶR produktu ar izmēru 200 bp un negatīvs rezultāts no plazmas izdalīta DNS paraugos liecināja, ka paraugi nav kontaminēti ar šūnas DNS.

#### 2.4 Polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu

Lai pilnu asiņu DNS, asins plazmas DNS un kDNS paraugos pavairotu specifiskus DNS fragmentus un izmantoja polimerāzes ķēdes reakciju ar iekšējo praimēšanu (nPĶR). PĶR sastāv no vairākiem cikliem, kuru laikā DNS tiek pakļauts temperatūras izmaiņām, katru sintēzes ciklu veido trīs reakcijas posmi: 1) DNS denaturācija, 2) praimeru hibridizācija un 3) DNS sintēzes jeb elongācijas posms. Polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimēšanu palielina DNS amplifikanta specifiskumu, samazinot fona DNS sintēzes iespējamību. Lai izvairītos no potenciālās kontaminācijas tika veikta ūdens kontrole pēc katriem pieciem paraugiem.

#### 2.5 HHV-6 vīrusa genoma sekvences klātbūtnes noteikšana

HHV-6 vīrusa genoma sekvences klātbūtnes noteikšanu paraugos veica saskaņā ar *Bandobashi et al. 1997*, ar iekšējo praimeru komplektu, kuri bija komplementāri kapsīda galvenos proteīnus kodējošam gēnam un tie atpazīna abus vīrusus HHV-6A un HHV-6B. Kā pozitīvā kontrole tika izmantots HHV-6 genoma DNS (Advances Biotechnologies Inc. Columbia, USA) un kā negatīvo kontroli izmantoja DNS no praktiski veseliem asins donoriem, kuru DNS nesatur HHV-6 genoma secības.

Praimeru secība:

1. cikls: HV61 – 5' – GCG-TTT-TCA-GTG-TGT-AGT-TCG-GCA-G – 3'  
HV62 – 5' – TGG-CCG-CAT-TCG-TAC-AGA-TAC-GGA-GG – 3'
2. cikls: HV63 – 5' - GCT-AGA-ACG-TAT-TTG-CTG-CAG-AAC-G – 3'  
HV64 – 5' – ATC-CGA-AAC-AAC-TGT-CTG-ACT-GGC-A - 3'

Praimeru jutība 5 genoma kopijas (Kozireva et al.2009).

HHV-6 genoma secības klātbūtnes noteikšanai PĶR 1. cikla amplifikācijas maisījuma pagatavošanai( uz 50 µl) vienam paraugam izmantoja:

10x PĶR buferi	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
10 mM dNTP	1 µl
100 µM HV61 praimeris	0,2 µl
100 µM HV62 praimeris	0,2 µl
5 U/µl Taq polimerāzi	0,2 µl
Destilēta ūdens	30,4 µl
DNS parauga	10 µl

HHV-6 genoma secības klātbūtnes noteikšanai PĶR 2. cikla amplifikācijas maisījuma pagatavošanai (uz 25 µl) vienam paraugam izmantoja:

10x PĶR buferi	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
100 µM HV63 praimeris	0,1 µl
100 µM HV64 praimeris	0,1 µl
5 U/µl Taq polimerāzi	0,1 µl
Destilēta ūdens	15,2 µl
1.cikla PĶR produktu	5 µl

Amplifikācijas programma 1. un 2. ciklam bija vienāda:

1.	Denaturācijas posms	5 min	95°C
2.	Hibridizācijas posms – 30 cikli	1 min	94°C
		1 min	60°C
		1 min	72°C
3.	Pēdējais elongācijas posms	8 min	72°C

PĶR amplifikācijas produktus – 258 bp, analizēja elektroforētiski 1,7% agarozes gēlā, UV gaismā ar marķiera pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23 (Thermo Scientific, Lietuva) palīdzību konstatēja paredzamā garuma produkta klātbūtni. Rezultātus vizualizēja izmantojot *BioSpectrum Imaging System, Vācija*.

### 2.5.1 HHV-6A un HHV-6B vīrusu diferencēšana

HHV-6 vīrusa tipa noteikšanu veica saskaņā ar Wang *et al.* 1996. Kā pozitīvās kontroles tika izmantots DNS, kas izolēts no HHV-6B (Z-29) un HHV-A (GS) virioniem (Advanced Biotechnologies Inc. Columbia, MD, USA), kā negatīvo kontroli izmantoja DNS no praktiski veselīem asins donoriem, kuru DNS nesatur HHV-6 genoma secības.

Praimeru secība:

1.cikls: 661- 5'- CAA-GCC-CTA-ACT-GTG-TAT-GT- 3'

662 - 5'- TCT-GCA-ATG-TAA-TCA-GTT-TC- 3'

2.cikls: 663 – 5'- CTG-GGC-GGC-CCT-AAT-AAC-TT- 3'

664 – 5'- ATC-GCT-TTC-ACT-CTC-ATA-AG – 3'

PQR 1. cikla amplifikācijas maisījuma pagatavošanai( uz 50 µl) vienam paraugam izmantoja:

10x PQR buferi	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
10 mM dNTP	1 µl
100 µM 661 praimeris	0,2 µl
100 µM 662 praimeris	0,2 µl
5 U/µl Taq polimerāzi	0,2 µl
Destilēta ūdens	29,4 µl
DNS parauga	10 µl

Amplifikācijas programma 1.ciklam:

1.	Denaturācijas posms	4 min	95°C
2.	Hibridizācijas posms – 30 cikli	1 min	94°C
		1 min	50°C
		1 min	72°C
3.	Pēdējais elongācijas posms	10 min	72°C

PĶR 2. cikla amplifikācijas maisījuma pagatavošanai( uz 25 µl) vienam paraugam izmantoja:

10x PĶR buferi	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
100 µM 663 praimeris	0,1 µl
100 µM 664 praimeris	0,1 µl
5 U/µl Taq polimerāzi	0,1 µl
Destilēta ūdens	14,2 µl
1.cikla PĶR produktu	5 µl

Amplifikācijas programma 2.ciklam:

Denaturācijas posms	4 min	95°C
Hibridizācijas posms – 30 cikli	1 min	94°C
	1 min	60°C
	1 min	72°C
Pēdējais elongācijas posms	10 min	72°C

nPĶR produkti HHV-6A – 195bp un HHV-6B – 423bp tika vizualizēti elektroforētiski 1,7% agarozes gelā ar marķiera pUC19 DNA/MspI (HpaII) (Thermo Scientific, Lietuva ) palīdzību UV gaismā un noteica paredzamā amplifikācijas produkta klātbūtni un rezultātus vizualizēja izmantojot *BioSpectrum Imaging System, Vācija*.

## 2.6 HHV-7 genoma secības klātbūtnes noteikšana

Saskaņā ar *Berneman et al. 1992* veica HHV-7 genoma sekvenču noteikšanu. Lietoja praimeru komplektu, kas bija komplementāri U10 gēnam, *Pfeiffer et al. 1995*. Kā pozitīvā kontrole tika izmantots HHV-7 genoma DNS ( Advances Biotechnologies Inc. Columbia, USA) un kā negatīvo kontroli izmantoja DNS no praktiski veselīgiem asins donoriem, kuru DNS nesatur HHV-7 genoma secības.

Praimeru secība:

1.cikls: HV7 – 5' – TAT-CCC-AGC-TGT-TTT-CAT-ATA-GTA-AC – 3'

HV8 – 5' – GCC-TTG-CGG-TAG-CAC-TAG-ATT-TTT- 3'

2.cikls: HV10 – 5'- CAG-AAA-TGA-TAG-ACA-GAT-GTT-GG- 3'

HV11 – 5'- TAG-ATT-TTT-TGA-AAA-AGA-TTT-AAT-AAC- 3'

Praimeru jūtība 1 genoma kopija (Kozireva et al. 2009).

HHV-7 genoma secības klātbūtnes noteikšanai PĶR 1. cikla amplifikācijas maisījuma pagatavošanai( uz 50 µl) vienam paraugam izmantoja:

10x PĶR buferi	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
10 mM dNTP	1 µl
100 µM HV7 praimeru	0,2 µl
100 µM HV8 praimeru	0,2 µl
5 U/µl Taq polimerāzi	0,2 µl
Destilēta ūdens	30,4 µl
DNS parauga	10 µl

Amplifikācijas programma 1.ciklam:

1.	Denaturācijas posms	3 min	94°C
2.	Hibridizācijas posms – 30 cikli	1 min	94°C
		2 min	60°C
		2 min	72°C
3.	Pēdējais elongācijas posms	7 min	72°C

HHV-7 genoma secības klātbūtnes noteikšanai PĶR 2. cikla amplifikācijas maisījuma pagatavošanai( uz 25 µl) vienam paraugam izmantoja:

10x PĶR buferi	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
100 µM HV10 praimeru	0,1 µl
100 µM HV11 praimeru	0,1 µl
5 U/µl Taq polimerāzi	0,1 µl
Destilēta ūdens	15,2 µl
1.cikla PĶR produktu	5 µl

Amplifikācijas programma 2.ciklam:

1.	Denaturācijas posms	3 min	94°C
2.	Hibridizācijas posms – 30 cikli	1 min	94°C
		2 min	55°C
		2 min	72°C
3.	Pēdējais elongācijas posms	7 min	72°C

Iegūtos amplifikācijas produktus, kuru izmērs bija 124bp analizēja elektroforētisi 1,7% agarozes gēlā. UV gaismā un ar marķiera pUC19 DNA/MspI (HpaII) (Thermo Scientific, Lietuva ) palīdzību noteica paredzamā amplifikācijas produkta klātbūtni un rezultātus vizualizēja izmantojot *BioSpectrum Imaging System, Vācija*.

## 2.7 PBMC izdalīšana no asinīm

Pacientu perifērās asinis atšķaidīja 2 reizes ar PBS buferi un akurāti uzslāņoja uz fikola gradienta attiecībā 2:1 ( $\rho = 1,077 \pm 0,001$ ; Eurobio, Francija). Uzslāņotās asinis centrifugēja 1400 apg./min 12 minūtes. Pēc centrifugēšanas gradienta vidusdaļā veidojās balts gredzens - PBMC, ko pēc tam atsūca un 2 reizes mazgāja ar PBS. Izdalītās PBMC glabāja safasētas pa 0,5 ml endorfā stobriņos PBS buferī,  $-70^\circ\text{C}$

## 2.8 RNS izdalīšana, kvantitātes un kvalitātes kontrole

PBMC paraugam pievieno 1ml TRI reaģentu, paraugu inkubēja istabas temperatūrā 5 minūtēs un pievienoja 200  $\mu\text{l}$  hloroforma un vorteksēja aptuveni 15 sekundes katru. Tālāk sekoja paraugu inkubācija 2-3 minūtes istabas temperatūrā. Paraugus centrifugēja 12000g 15 minūtes  $+4^\circ\text{C}$  temperatūrā. Uzmanīgi, neaizskarot organisko fāzi, pārnesa augšējo/ūdeņaino fāzi jaunajos stobriņos. Pievienoja 500  $\mu\text{l}$  izopropanola un inkubēja 10 minūtes istabas temperatūrā. Centrifugēja 12000g 10 minūtes  $+4^\circ\text{C}$  temperatūrā. Atbrīvojās no supernatanta un RNS izgulsnēja, pievienojot 1 ml 75% etanolu. Centrifugēja 7500g 5 minūtes  $+4^\circ\text{C}$  temperatūrā. Atbrīvojās no supernatanta un ļāva atlikušajam etanolam žāvēties 2-3 minūtes. RNS šķīdināja ūdenī, kas apstrādāts ar dietilpirokarbonātu.

RNS kvantitātes un kvalitātes mērīšanai izmantoja spektrofotometru „NanoDrop” Ar programmas ND1000 palīdzību noteica nukleīnskābes koncentrāciju, sistēmu iestatot un nosakot absorbciju pie 260nm viļņa garuma. Sistēmas kalibrēšanai lietoja 2  $\mu\text{l}$  destilēta ūdens. RNS paraugu koncentrāciju mērīja ņemot 2 $\mu\text{l}$  katra parauga. Iegūtie rezultāti tika izteikti RNS

nanograms mikrolitrā (ng/μl). Ja OD260/280 attiecība bija tuvu 2, tad RNS tika uzskatīts par attīrītu.

## 2.9 Reversās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcija

Lai varētu identificēt gēnu ekspresijas izmaiņas jāizdala RNS un pēc tam ar reversās transkripsijas palīdzību tas tiek pārvērsta par komplementāro DNS (kDNS), kuru tālāk izmanto polimerāzes ķēdes reakcijā.

kDNS sintēzei sterilos stobriņos, kas tika novietoti uz aukstas virsmas, iepildīja RNS – 5 μg; oligo (dT)18 praimeris – 1 μl; destilētu ūdeni - 6 μl. Inkubēja 65°C temperatūrā 5 minūtes. Tikmēr pagatavo reakcijas maisījumu.

Reakcijas maisījums vienam paraugam:

5X reakcijas buferis	4 μl
RiboLock RNase Inhibitor (20 u/μl)	1 μl
10 mM dNTP mix	2 μl
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/μl)	1 μl

Katram paraugam pievienoja 8 μl reakcijas maisījuma. Inkubēja 60 minūtes 42°C temperatūrā pēc tam 5 minūtes 70°C. Tālāk paraugus analizēja ar nPĶR. Uzglabāja -80°C.

## 2.10 β-Aktīna PĶR

cDNS kvalitātes noteikšanai izmantoja arī PCR metodi, nosakot β-aktīna gēna klātbūtni cDNS paraugos. Paraugus amplificēja.

Praimeru secība: PR183- 5'- CACCCACACTGTGCCCAT -3'

PR183 - 5'- CTAGAAGCATTGCGGTGAC -3'

B globīna gēna noteikšanai, maisījuma pagatavošanai vienam paraugam (25μl) izmantoja:

10x PĶR buferis	2,5μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2μl
10 mM dNTP	0,5μl
PR183 praimeris	0,1μl
PR184 praimeris	0,1μl
5U/μl Taq polimerāze	0,1μl
3x destilēta ūdens	17,7μl
cDNS parauga	2μl

Paraugu amplifikācijas programma:

1.	Denaturācijas posms	3 min.	95°C
2.	Hibridizācijas posms- 40 cikli	1 min.	95°C
		30 sek.	55°C
		45 sek.	72°C
3.	Pēdējais elongācijas posms	7 min.	72°C

Pēc amplifikācijas, paraugus analizēja 1 % agarozes gelā, elektroforētiski. Par kvalitatīvu cDNS uzskatīja, cDNS PĶR produktu ar izmēru 650 bp.

### 2.11 HHV-6 U89/U90 gēna secības klātbūtnes noteikšana

Gēna detekciju veica saskaņā ar Bosch et al. 2001.

Praimeru secība: C1bis- 5' - GTT-CCT-GTT-TCA-TGG-CA - 3'

C2bis- 5' - TCC-AGT-AAT-GTG-GAA-GAA-GG- 3'

Amplifikācijas maisījuma (25µl) pagatavošanai izmantoja:

10x PĶR buferi	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
C1bis praimeri	0,1 µl
C2bis praimeri	0,1 µl
5 U/µl Taq polimerāzi	0,1 µl
Destilēta ūdens	17,2 µl
kDNA parauga	2 µl

Amplifikācijas programma:

1.	Denaturācijas posms	15 min	94°C
2.	Hibridizācijas posms – 39 cikli	20 sek	94°C
		45 sek	50°C
		20 sek	72°C
3.	Pēdējais elongācijas posms	5 min	72°C

Iegūtos amplifikācijas produktus, kuru izmērs bija 115 bp analizēja elektroforētisi 1,7% agarozes gēlā. UV gaismā un ar marķiera pUC19 DNA/MspI (HpaII) palīdzību noteica paredzamā amplifikācijas produkta klātbūtni un rezultātus vizualizēja izmantojot *BioSpectrum Imaging System, Vācija*.

## 2.12 HHV-6 U60/U66 gēna secības klātbūtnes noteikšana

Gēna detekciju veica saskaņā ar Mirandola et al. 1998.

Praimeru secība: C3- 5'- GGC-CGT-TTT-TTT-AAC-TTC-GGC-GT- 3'

C4- 5'- GTT-TAA-ATG-CCG-CCG-AAT-GTT-TC- 3'

Amplifikācijas maisījuma (25µl) pagatavošanai izmatoja:

10x PĶR buferi	2,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
10 mM dNTP	0,5 µl
C3 praimeru	0,1 µl
C4 praimeru	0,1 µl
5 U/µl Taq polimerāzi	0,1 µl
Destilēta ūdens	17,2 µl
kDNA parauga	2 µl

Amplifikācijas programma:

1.	Denaturācijas posms	5 min	94°C
2.	Hibridizācijas posms – 35 cikli	1 min	94°C
		1 min	50°C
		2 min	72°C
3.	Pēdējais elongācijas posms	10 min	72°C

Iegūtos amplifikācijas produktus, kuru izmērs bija 442 bp analizēja elektroforētisi 1,7% agarozes gēlā. UV gaismā un ar marķiera pUC19 DNA/MspI (HpaII) palīdzību noteica paredzamā amplifikācijas produkta klātbūtni un rezultātus vizualizēja izmantojot *BioSpectrum Imaging System, Vācija*.

### 2.13 Agarozes gēla elektroforēze

Elektroforēzes metodi izmanto DNS frakciju atdalīšanai un identifikācijai. Pamatojoties uz jonu kustību elektriskajā laukā, DNS frakcija ar mazāku bāzu pāru daudzumu pārvietojas ātrāk, tāpēc ar elektroforēzes metodes palīdzību DNS fragmenti tika sadalīti pēc to izmēra.

Agarozes gēla pagatavošanai izmantoja 1,7g agarozes pulvera, 100 ml 1xTAE bufera un DNS iekrāsošanai gēlam tika pievienots 5µl etīdija bromīds, kas piesaistās pie DNS un UV gaismā fluoriscē. Gēlu ielika elektroforēzes aparāta vanniņā, kurā iepildīts 1x TAE buferšķīdums. Katra parauga 10µl iekrāsoja ar 1µl *6X Loading dye* un uznesa uz gēla. DNS frakciju pārvietošanās notika aptuveni 40 minūtes, 140 voltos, 120 miliampēros. Elektroforēzes rezultātus apskatīja transiluminatora ultravioletajā starojumā izmantojot *BioSpectrum Imaging System*, *Vācija* un vizualizēja *LaunchVisionWorks LS* programmā.

### 2.14 Vīrusspecifisku antivielu noteikšana

Lai detektētu vīrusspecifiskās IgG klases antivielas pret HHV-6 cilvēka asins plazmas paraugos tika izmantots *HHV-6 IgG Antibody ELISA kit (ABI, Columbia MD, ASV)*, saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Optisko blīvumu detektēja ar *Multiskan Ascent- Thermo Scientific, Afganistāna*.

Vīrusspecifiskās IgG klases antivielas pret HHV-7 asins plazmā noteica ar *HHV-7 IgG IFA Kit (ABI, Columbia MD, ASV)*, saskaņā ar ražotāja instrukciju. HHV-7 specifisko IgG klases antivielu klātbūtne tika detektēta ar fluorescences mikroskopu *NIKSON Eclipse 80i, Japāna*.

### 2.15 Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija

Lai noteiktu HHV-6 vīrusa DNS kopiju skaitu PBL paraugos izmantoja reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas kvantitatīvās detektēšanas komplektu *HHV-6 Real-TM Quant Real-TM (Sacace Biotechnologies, Itālija)*, saskaņā ar ražotāja norādījumiem.

Lai noteiktu HHV-7 vīrusu DNS kopiju skaitu PBL paraugos izmantoja reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas kvantitatīvās detektēšanas komplektu *Quantification of Human Herpes Virus 7 genomes (PrimerDesign, Apvienotā Karaliste)*, saskaņā ar ražotāja norādījumiem.

## 2.16 Materiāli

### 2.16.1 Reaģenti

- Equilibrated phenol, pH 8,0 – Affymetrix, ASV
- Hloroforms 99,98% - Sigma, Vācija
- QIAamp DNA Blood Mini Kit - Qiagen GmbH, Vācija
- 10x PĶR buferis - Fermentas, Lietuva
- 25 mM MgCl<sub>2</sub>- Fermentas, Lietuva
- 0,2 mM dNTP- dezoksiribonukleotīdu trifosfāts- Fermentas, Lietuva
- 5U/μl Taq polimerāze *DNA Taq Polymerase (recombinant)*- Fermentas, Lietuva
- Agarozē- *Top Vision LE GQ Agarose*, Fermentas, Lietuva
- Etīdija bromīds- 10 mg/ml, Sigma, Vācija
- 50xTAE electrophoresis buffer- Thermo Scientific, Lietuva
- 6xLoading Dye Solution- Fermentas, Lietuva
- TRI Reaģents – Life Tehnologies, ASV
- DEPC Treated water- Life Tehnologies, ASV
- Izopropanols – Sigma-Aldrich Corporation, ASV
- HHV-6 Real-TM Quant Real-TM darba komplekts - Sacace Biotechnologies, Itālija
- Quantification of Human Herpes Virus 7 genomes darba komplekts - PrimerDesign, Apvienotā Karaliste
- Fikols – Eurobia, Francija
- SDS: 80 ml Destilēts ūdens, 20g SDS
- Lizējošais buferis (kopējais tilpums 50 ml) –  
0,5 ml 1M Tris HCl,  
0,125 ml 2M MgCl<sub>2</sub>,  
0,125 ml 4M NaCl,  
49,25 ml destilēts ūdens.
- Proteināzes K buferis (kopējais tilpums 100 ml) –  
5,85g NaCl,  
23,98 ml 0,5M EDTA,  
destilēts ūdens līdz 100 ml atzīmei.

## 2.16.2 Aprīkojums

Aparatūra rezultātu vizualizēšanai: BioSpectrum Imaging System, Vācija

Centrifūga: Mikro 22r, Hettich, Vācija

Centrifūga: Mini Spin "Eppendorf"

Elektroforēzes aparāts: CAMBRIDGE Protein analysis & DNA sequencing Electrophoresis, Lielbritānija

Fluorescences mikroskops: NIKSON Eclipse 80i, Japāna

Fotometriskais lasītājs: Multiskan Ascent, Thermo Scientific, Afganistāna

Līdzstrāvas avots: Power Supply EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, Zviedrija

Maisītājs: Vortex Sankine 10897, Latvija.

Mikroviļņu krāsns: M1712R, SAMSUNG, Koreja

Pipetes BIOHT PROLINE PIPETTE, Somija

Pipetes GILSON PIPETMAN, Francija

PĶR aparāts : BIOMETRA, Thermocyclex, Vācija

Reakciju stobriņi 0,5 ml, 1,5 ml un 2 ml, uzgaļi ar filtru, uzgaļi bez filtra: Thermo Labsystems, Somija

Spektrofotometrs: NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, ASV

UV transiluminators: Transiluminator LKB 2001 Macrovue, Zviedrija

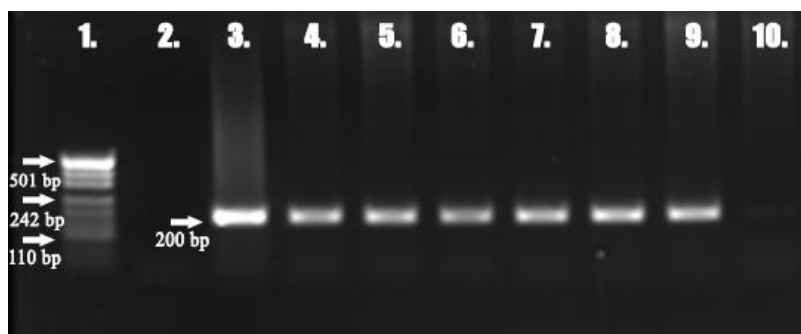
## 2.17 Darba drošība

1. Strādājot laboratorijā visi darbi obligāti jāveic lietojot cimdus un halātu, lai pasargātu sevi no dažādu bīstamu vielu un novērstu iespējamu infekciozo aģentu nokļūšanu uz ādas.
2. Jāizvairās no tieša UV starojuma, kas nāk no transiluminātoru un no laboratorijas boksa.
3. Etīdija bromīds ir kancerogēns, tāpēc jāizvairās no tā tieša kontakta ar ādu un tā tvaiku ieelpošanas.

### 3 REZULTĀTI

#### 3.1 DNS kvalitātes pārbaude

Izdalītā DNS paraugu kvalitāti noteica ar  $\beta$  globīna PĶR (3.attēls).



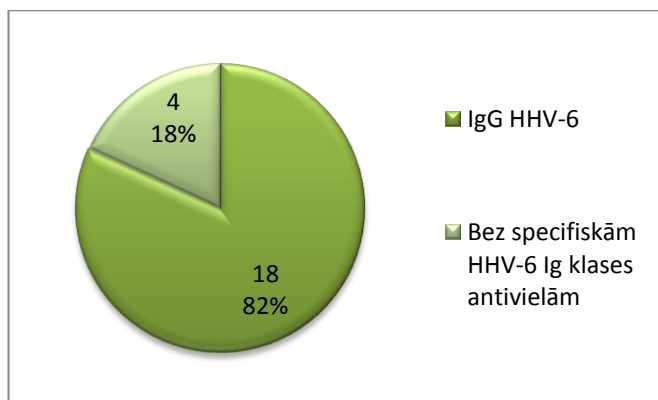
**3.attēls. Beta globīna gēna amplifikācijas produkta elektroforētiskā analīze 1,7% agarozes gēlā. 1.Marķieris [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2. Reaģentu ūdens kontrole; 3-9. Pilnu asiņu DNS paraugi, kas satur beta globīna gēna secību- 200 bp; 10. Asins plazmas paraugs, kas nesatur globīna gēnu secību**

**Figure 3. Beta globin gene amplification product analysed in electrophoresis 1,7% agarose gel. 1. Marker [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2. Reagent water control; 3-9. Whole blood samples with beta globin gene sequence – 200 bp; 10. Plasma samples that do not contain  $\beta$ -globin gene sequence**

#### 3.2 IgG klases antivielu klātbūtne fibromialģijas sindroma pacientu plazmas paraugos

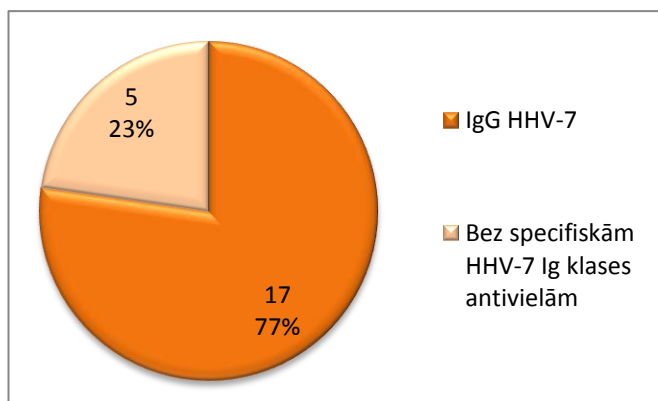
Pārbaudot HHV-6 specifisku antivielu klātbūtni asins plazmas paraugos, IgG klases antivielas atrada 18 no 22 (82%) fibromialģijas sindroma pacientu paraugiem, bet HHV-6 specifisku IgG klases antivielu klātbūtne netika konstatēta 4 no 22 (18%) pacientiem.

Pārbaudot HHV-7 specifisku antivielu klātbūtni asins plazmas paraugos IgG klases antivielas konstatēja 17 no 22 (77%) fibromialģijas sindroma pacientu paraugiem, bet nekonstatēja IgG klases antivielu klātbūtni 5 no 22 (23%) pacientiem.



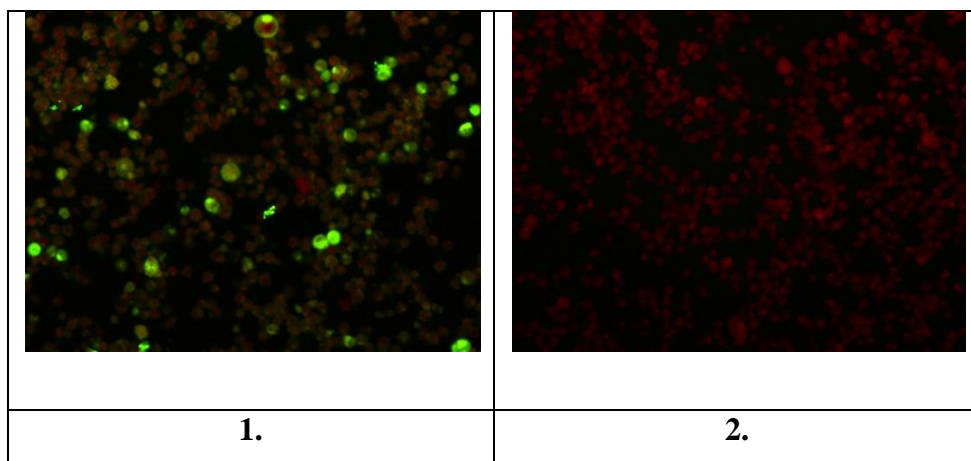
**9.attēls. Cilvēka herpesvīrusa-6 specifisku IgG klases antivielu klātbūtne fibromialģijas sindroma pacientu plazmas paraugos (n=22)**

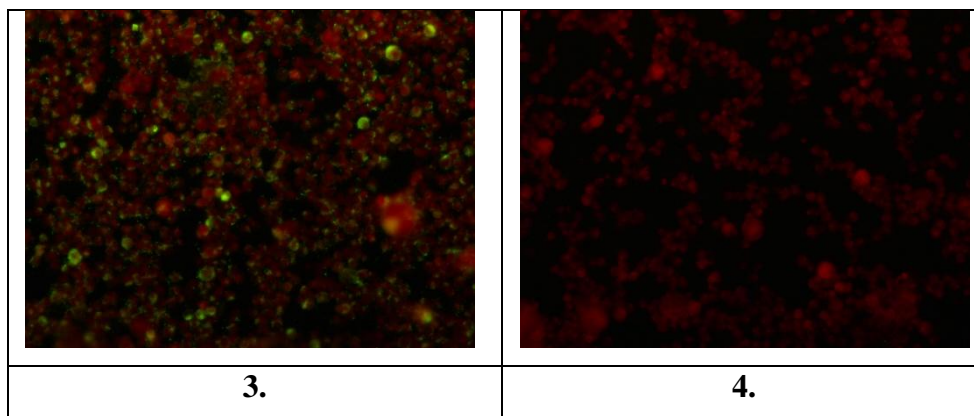
**Figure 9. Presence of human herpesvirus-6 specific IgG class antibodies in plasma samples of patients with fibromyalgia syndrome**



**10.attēls. Cilvēka herpesvīrusa-7 specifisku IgG klases antivielu klātbūtne fibromialģijas sindroma pacientu plazmas paraugos (n=22)**

**Figure 10. Presence of human herpesvirus-7 specific IgG class antibodies in plasma samples of patients with fibromyalgia syndrome**





**11.attēls. HHV-7 specifisko IgG klases antivielu detektēšana fluorescences mikroskopā.**  
**1. Pozitīvā kontrole; 2. Negatīvā kontrole; 3. Pozitīvs pacienta asins plazmas paraugs, satur HHV-7 specifiskās IgG klases antivielas; 4. Negatīvs pacienta asins plazmas paraugs, nesatur HHV-7 specifiskās IgG klases antivielas.**

**Figure 11. HHV-7 specific IgG class antibodies detection with fluorescence microscope.**  
**1. Positive control; 2. Negative control; 3. Positive patient plasma sample, contain HHV-specific IgG class antibodies; 4. Negative patient plasma sample, do not contain HHV-specific IgG class antibodies**

### **3.3 HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 infekciju sastopamība**

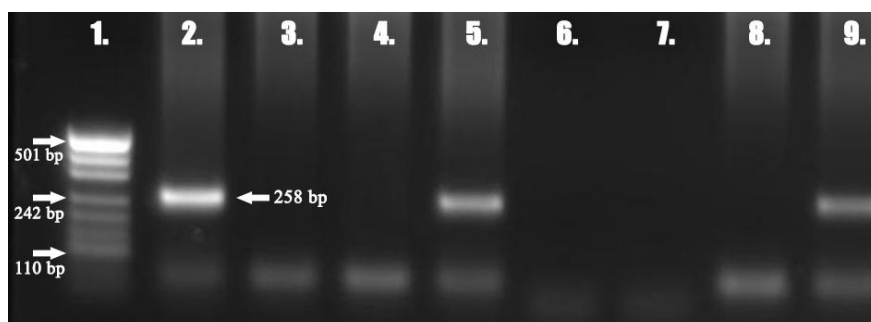
Izmantojot nPQR HHV-6 un/vai HHV-7 vīrusa infekciju konstatēja 18 no 22 (82%) pacientiem, kuriem diagnosticēta fibromialģija, no tiem – 6 (30%) infekcija tika konstatēta vīrusa infekcija gan pilnās asinīs, gan asins plazmā, kas varētu liecināt par aktīvu infekciju. Četriem no 22 fibromialģijas pacientiem netika konstatēts šo vīrusu genoma sekvenču klātbūtne ne DNS, kura izdalīta no pilnām asinīm, ne DNS, kura izdalīta no asins plazmas.

Vienam no 22 fibromialģijas pacientu paraugiem (5%) tika konstatēta atsevišķa HHV-6 genoma sekvenču klātbūtne gan DNS, kas izdalīta no pilnām asinīm, gan DNS, kas izdalīta no asins plazmas, šis bija vienīgais paraugs no pārbaudītajiem, kurā HHV-6 vīruss sastopams viens, ne kā dubultinfekcija ar HHV-7. Atsevišķu HHV-7 vīrusa infekciju DNS, kura izolēta no pilnām asinīm konstatēja 10 no 22 (45%) fibromialģijas pacientiem, no tiem atsevišķu HHV-7 infekciju DNS, kura izdalīta no asins plazmas konstatēja 2 no 13 (20%) fibromialģijas pacientiem. Vīrusu dubultinfekciju HHV-6 + HHV-7 DNS, kura izdalīta no pilnām asinīm konstatēja 6 no 22 (23%) fibromialģijas pacientiem, no tām viena dubultinfekcija, kur gan

HHV-6, gan HHV-7 asins plazmā. Vienam no 22 (5%) fibromialģijas pacientiem konstatēja HHV-6 un HHV-7 vīrusu dubultinfekciju, kur HHV-6 genoma sekvenču konstatēja no asins plazmas izdalītā DNS, bet HHV-7 DNS, kurš izdalīts no pilnām asinīm (4.attēls; 5.attēls; 6.attēls).

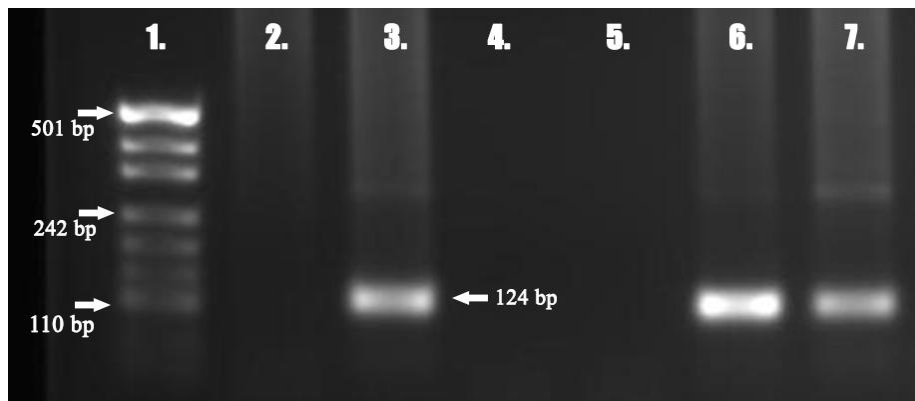
Kontroles grupā HHV-6 genoma sekvenču klātbūtne DNS, kuru izdalīja no pilnām asinīm konstatēja 2 no 20 (10%) donoriem, bet HHV-6 genoma sekvenču klātbūtni DNS, kura izdalīta no asins plazmas netika konstatēta. HHV-7 vīrusa genoma sekvenču klātbūtni DNS, kuru izdalīja no pilnām asinīm, konstatēja 10 no 20 (50%) pacientiem, vīrusa genoma sekvenču DNS, kas izdalīta no asins plazmas netika konstatēta. Dubultu HHV-6+HHV-7 vīrusu genoma sekvenču, konstatēja 3 no 20 (15%) DNS, kuri bija izdalīti no pilnām asinīm, bet dubultinfekciju asins plazmas DNS netika konstatēta 0/3.

Sešiem no 8 (75%) fibromialģijas pacientu paraugiem, kuriem tika pierādīta HHV-6 vīrusa secības klātbūtne DNS kura izdalīta no pilnām asinīm, konstatēja piederību HHV-6B vīrusam, bet 2 no 8 (25%) pierādīja piederību HHV-6A (7.attēls; 8.attēls).



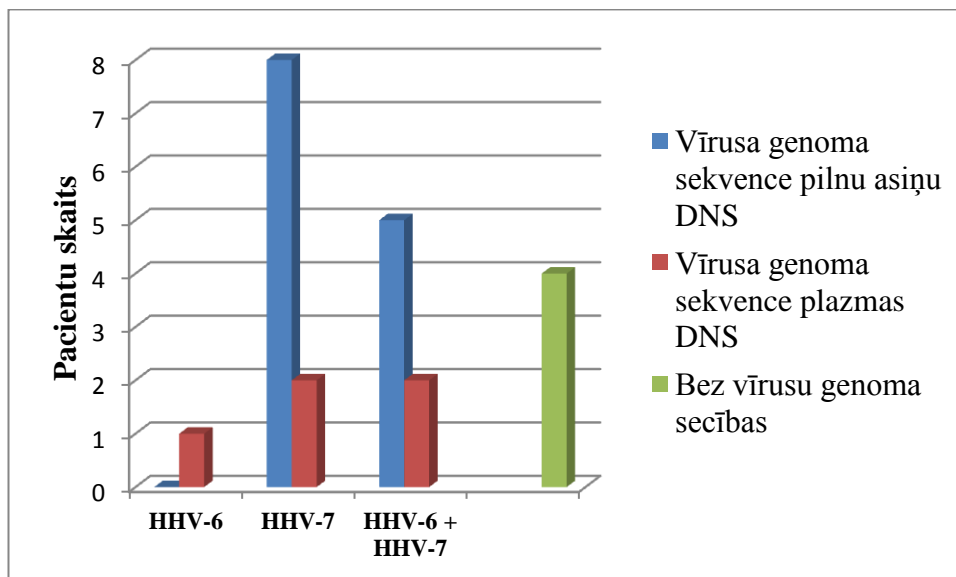
**4.attēls. Cilvēka herpesvīrusa-6 specifiskās amplifikācijas produkta elektroforētiskā analīze 1,7% agarozes gēlā. 1. Marķieris [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2. Pozitīvā kontrole; 3. Negatīvā kontrole; 4. Reāģentu ūdens kontrole; 5. Paraugs, kas satur vīrusa secību DNS, kura izdalīta no pilnām asinīm – 258 bp; 6-8. Paraugi, kas nesatur vīrusa secību 9. Paraugs, kas satur vīrusa secību, DNS kas izdalīta no asins plazmas - 258 bp**

**Figure 4. Electrophoretic analysis of human herpesvirus-6 specific amplification product in 1.7% agarose gel. 1.Marker [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2. Positive control; 3. Negative control; 4. Reagent water control; 5. Sample that contain viral sequence, DNA from whole blood – 258 bp; 6-8. Samples that do not contain viral sequence 9. Sample that contain viral sequence, DNA from plasma - 258 bp**



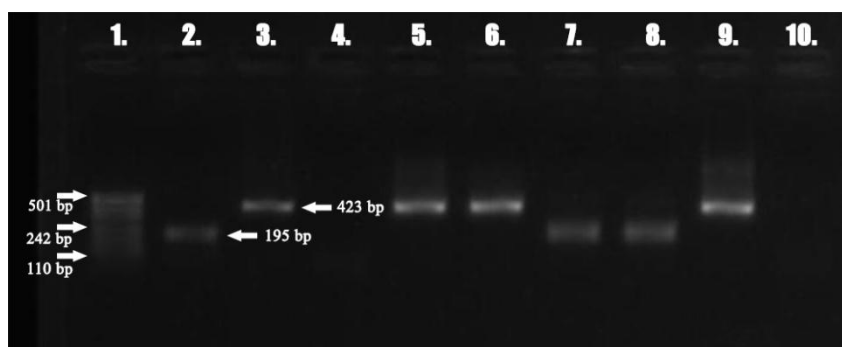
5.attēls. Cilvēka herpesvīrusa-7 specifiskās amplifikācijas produkta elektroforētiskā analīze 1,7% agarozes gēlā. 1. Marķieris [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2. Negatīvā kontrole; 3. Pozitīvā kontrole; 4. Reaģentu ūdens kontrole; 5. Paraugs, kas nesatur vīrusa secību; 6-7. Paraugi, kas satur vīrusa secību – 124 bp

Figure 5. Electrophoretic analysis of human herpesvirus-6 specific amplification product in 1.7% agarose gel. 1.Marker [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2. Negative control; 3. Positive control; 4. Reagent water control; 5. Sample that do not contain viral sequence; 6-7. Sample that contain viral sequence – 124 bp



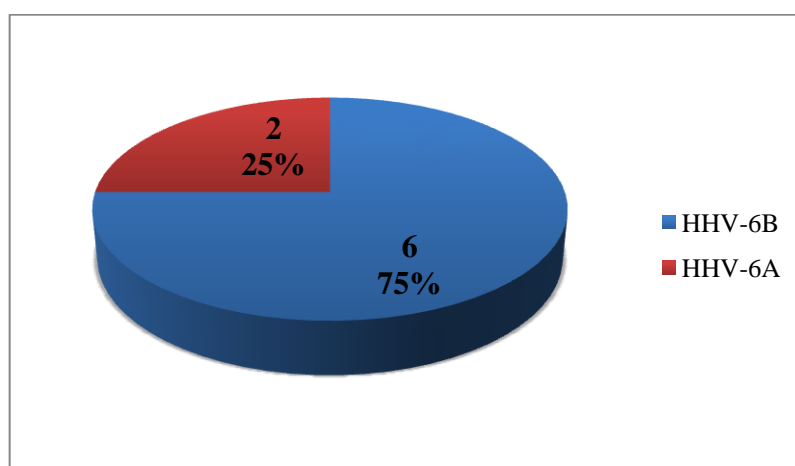
6.attēls. Cilvēka herpesvīrusa-6 un cilvēka herpesvīrusa-7 secību klātbūtne fibromialģijas sindroma pacientu DNS, kas izdalīta no pilnām asinīm un asins plazmas (n=22)

Figure 6. Presence of human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 genomic sequence in whole blood and plasma DNA of patients with fibromyalgia syndrome (n=22)



7.attēls. Cilvēka herpesvīrus-6 A un B variantu specifiskās amplifikācijas produkta elektroforētiskā analīze 1,7 % agarozes gēlā. 1. Marķieris [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2. Pozitīva HHV-6A vīrusa kontrole – 195 bp; 3. Pozitīvā HHV-6B vīrusa kontrole – 423 bp; 4. Negatīvā kontrole; 5-6,9. Paraugi, kas satur HHV-6B vīrusa secību- 423 bp; 7-8. Paraugi, kas satur HHV-6A vīrusa secību – 195 bp; 10. Reaģentu ūdens kontrole

Figure 7. Electrophoretic analysis of human herpesvirus-6 variants A and B specific amplification products in 1.7% agarose gel. 1.Marker [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2. Positive HHV-6A viral control- 195 bp; 3. Positive HHV-6B viral control – 423 bp; 4. Negative control; 5-6,9. Samples that contain HHV-6B viral sequence – 423 bp; 7-8. Samples that contain HHV-6A viral sequence – 195 bp; 10. Reagent water control



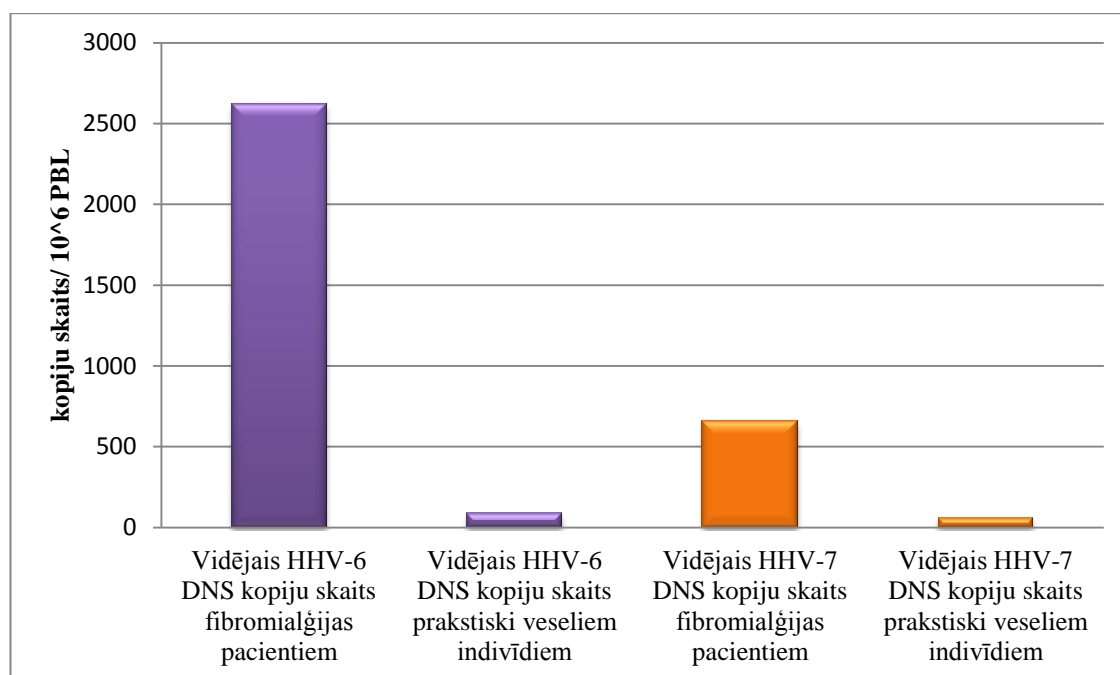
8.attēls. Cilvēka herpesvīrusu- 6A un -6B variantu sastopamība pacientiem ar fibromialģijas sindroma

Figure 8. Human herpesvirus -6A and -6B variant incidence of patients with fibromyalgia syndrome

### 3.4 Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija

Izmantojot reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju fibromialģijas pacientiem, kuriem pēc nPKR tika konstatēta HHV-6 un/vai HHV-7 genoma secību klātbūtne tika noteikts HHV-6 un HHV-7 DNS kopiju skaits DNS, kurš izdalīts no PBL. Vidējā vīrusa slodze HHV-6 infekcijas gadījumam, fibromialģijas pacientu asins paraugos bija  $2230,12 \pm 371,69$  (standartnovirze 2268,704) HHV-6 vīrusa DNS kopijas/miljons PBL. Diviem no 8 paraugiem vīrusa slodze bija ļoti augsta  $21,2 \times 10^6$  HHV-6 vīrusa DNS kopijas/miljons PBL un  $2,9 \times 10^6$  HHV-6 vīrusa DNS kopijas/ $10^6$  PBL. Vienam no 8 pacientiem HHV-6 infekciju tika konstatēts  $<10$  HHV-6 DNS kopijas/ $10^6$  PBL. Piecos no 20 praktiski veselo cilvēku donoru asinīs HHV-6 vīrusa slodze bija  $87 \pm 43,5$  HHV-6 vīrusa DNS kopijas/ $10^6$  PBL.

Sešiem no 17 pacientiem, kuriem konstatēta HHV-7 vīrusa infekcija, vīrusa slodze asins paraugos bija vidēji  $657,6 \pm 131,05$  (standartnovirze 338,01) HHV-7 vīrusa DNS kopijas/ $10^6$  PBL. 12 no 17 pacientu paraugiem, kuriem bija konstatēta HHV-7 infekcija vīrusa DNS kopijas/ $10^6$  PBL DNS bija  $<10$ . Kontroles grupai, 13 no 20 praktiski veselajiem donoriem, HHV-7 vīrusa slodze asins paraugos vidēji konstatēta  $58,8 \pm 5,88$  kopijas/ $10^6$  PBL.

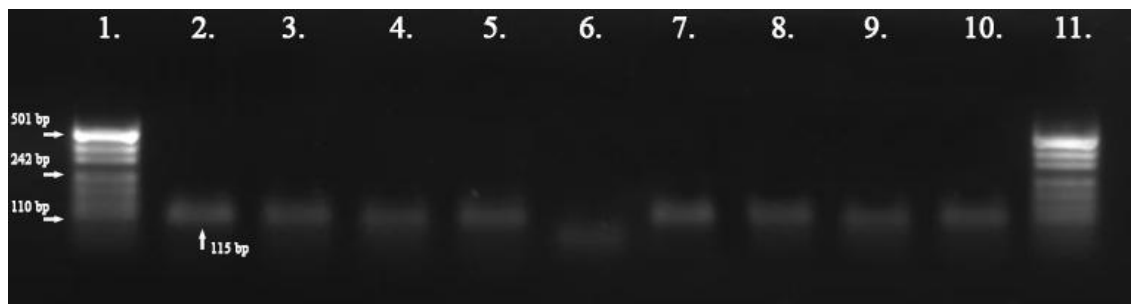


**9. attēls. Vidējais HHV-6 un HHV-7 vīrusu DNS kopiju skaits/ $10^6$  PBL pacientiem ar fibromialģijas sindromu un vīrusu DNS kopiju skaits/ $10^6$  PBL praktiski veselo indivīdu DNS paraugos**

**Figure 10. Average HHV-6 and HHV-7 viral DNA copies/10<sup>6</sup> PBL in patients with fibromyalgia syndrome and viral DNA copies/10<sup>6</sup> PBL in practically healthy individuals**

### 3.5 HHV-6 gēnu ekspresija

Analizēti tika 8 paraugi, kuriem ar nPĶR palīdzību tika konstatēta HHV-6 vīrusa genoma secības klātbūtne pacientu DNS paraugos, kas izolēti no PBL. HHV-6 transkripcionālā aktivitāte tika analizēta ar nPĶR pēc reversās transkripcijas un tika noteikta IE U89/U90 un L U60/U66 gēnu kopiju klātbūtne pacientiem ar fibromialģijas sindromu. L U60/U66 gēni klātbūtne netika konstatēta nevienā no analizētajiem paraugiem, bet IE U89/U90 gēnu klātbūtne tika konstatēta visiem fibromialģijas pacientu paraugiem, kuriem ar nPĶR tika konstatēta vīrusa genoma secības klātbūtne DNS kas izolēta no PBL.



**10.attēls. nPĶR amplifikācijas produkta HHV-6 gēna U89/U90 elektroforētiskā analīze 1,7 % agarozes gelā. 1, 11. Marķieris [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2-5., 7-10. Paraugi, kuri satur HHV-6 U89/U90 gēnu kopijas- 115 bp. 6. Reāģenu ūdens kontrole.**

**Figure 10. Electrophoretic analysis of nPCR amplification product HHV-6 U89/U90 genes. 1,11. Marker [pUC19DNA/MspI (HpaII)]; 2-5. Samples that contain HHV-6 U89/U90 gene copies – 115 bp. 6. Reagent water control.**

## 4 DISKUSIJA

Fibromialģijas sindroms ir patstāvīgi un organismu novājinoši traucējumi, kuriem var būt postošs efekts uz cilvēku dzīvēm, ietekmējot to spēju iesaistīties ikdienas aktivitātēs un mazinot darbaspējas, kas savukārt, ietekmē ne tikai pašus indivīdus, bet arī valsts ekonomiku kopumā. Sindroma izplatība attīstītajās valstīs sasniedz 2-5% no populācijas (Guymer, 2013). Tā kā fibromialģijas cēlonis ir neskaidrs, nav standartizētu biomarkieru vai diagnostikas testu tā apstiprināšanai, tad tiek uzskatīts, ka tas netiek diagnosticēts 3 no 4 pacientiem, kas sirgst ar šo sindromu (Clauw et al., 2011) un tas var kļūt par draudu sabiedrības veselībai, jo netiek uzsākta savlaicīga terapija.

Neskatoties uz ilgstošiem pētījumiem par fibromialģijas sindroma patoģenēzi un etioloģiju, vēl joprojām zinātnieki nav nonākuši pie atrisinājuma un nav vienprātības par slimības izraisītājiem. Vīrusu infekciju uzskata par vienu no iespējamajiem fibromialģijas sindroma izraisītājiem, jo vairums pacientu ziņo par pēkšņu slimības sākšanos un simptomi, kas novērojami fibromialģijas pacientiem ir novērojami arī pacientiem ar hronisku baktēriju vai vīrusu infekciju.

Par galveno mehānismu, kas iesaistīts fibromialģijas sindroma patoģenēzē tiek uzskatīts centrālās un autonomās nervu sistēmas disfunkcija. Tādēļ ir būtisks iemesls uzskatīt, ka HHV-6A, HHV-6B un HHV-7 vīrusi ir iesaistīti fibromialģijas sindroma izraisīšana, jo tie ir neotropi un pētījumi liecina, ka latentā HHV-6A, HHV-6B reaktivācija smadzenēs spēlē svarīgu lomu neiropatoģenēzes attīstībā un abi vīrusi ir potenciāli patogēni nervu sistēmai (Chan et al. 2001). Ir pierādīts, ka HHV-6 vīrusi, gan HHV-7 spēj „iebrukt” centrālajā nervu sistēmā un izraisīt centrālās nervu sistēmas bojājumus un nopietas neiroloģiskas slimības (Ward et al. 2005., Yoshikawa et al. 2000). Pierādīts, ka HHV-6A vīrusam ir lielākas neotropiskas īpašības un ka HHV-6 vīrusi spēj apiet imūnsistēmu un izveidot persistentu infekciju neirogliju šūnās (Yao et al. 2006) un kā zināms tieši neirogliju šūnās ir nozīmīgas fibromialģijas patoģenēzē, jo tās palīdz modulēt sāpju pārnesi muguras smadzenēs (Bellato et al. 2012). Iespējams tieši vīrusu reaktivācija neirogliju šūnās izraisa CNS disfunkciju, jo kā zināms *Roseoloviruses*, vīrusi, pie kuriem pieder arī HHV-6A, HHV-6B un HHV-7, izraisa ļoti nozīmīgas izmaiņas saimniekšūnas metabolismā, herpesvīrusu infekcija izslēdz saimniekšūnas DNS sintēzi, stimulē proteīnu sintēzi un palielina dažādu citokīnu un hemokīnu sekrēciju (Casselli and Di Luca 2007). Beta herpesvīrusi pēc primārās inficēšanās, parasti agrā bērnībā, spēj uzturēt persistentu infekciju latentā fāzē un reaktivēties imūnsupersijas, stresa un citu organismam nebalvēcīgu apstākļu laikā.

Darba rezultāti parādīja augsta līmeņa HHV-6 un HHV-7 vīrusu servoprevelanci. Anti-HHV-6 specifiskajām IgG klases antivielu klātbūtne seroloģiskajos izmeklējumos plazmā konstatēta 82% un specifiskās anti HHV-7 IgG klases antivielas konstatētas 77% fibromialģijas pacientiem. Šie skaitļi arī apstiprina literatūras apskatā izskanējušo, par beta-herpesvīrusu infekciju plašo izplatītību cilvēku populācijā (Caselli and De Luca 2007). Pēc nPQR rezultātiem 18 no 22 (81%) fibromialģijas pacientiem bija konstatēta HHV-6 un/vai HHV-7 vīrusa genoma secības klātbūtne, šie rezultāti liecina par nepieciešamību noteikt vīrusu reaktivēšanās riskus fibromialģijas pacientiem. Pēc HHV-6 vīrusa tipēšanas, izmantojot nPQR ar atbilstošajiem praimeriem, no 8 HHV-6 pozitīvajiem paraugiem 6 tika identificēti, kā HHV-6B, bet 2 no 8 kā HHV-6A vīrusi, kas liecina par abu vīrusu cirkulāciju Latvijas populācijā.

Reālā laika PQR rezultāti uzrādīja augstu ( $2230,12 \pm 371,69$  kopijas/ $10^6$  PBL) HHV-6 vīrusa slodzi, kā arī augstu HHV-7 vīrusa slodzi ( $657,6 \pm 131,05$  kopijas/ $10^6$  PBL) fibromialģijas pacietiem, salīdzinājumā ar praktiski veselu indivīdu paraugiem, attiecīgi ( $87 \pm 43,5$  kopijas/ $10^6$  PBL) un ( $58,8 \pm 5,84$  kopijas/ $10^6$  PBL). Interesanti atzīmēt, ka diviem fibromialģijas pacientiem tika noteikta ļoti augsta HHV-6 vīrusu slodze ( $21,2 \times 10^6$  kopijas/ $10^6$  PBL un  $2,9 \times 10^6$  kopijas/ $10^6$  PBL), abi no šiem piederēja HHV-6B. Šādas augstas vīrusa slodzes ( $>1$  miljons kopijas/ $10^6$  PBL) var liecināt par HHV-6 vīrusu hromosomālo integrāciju pacientu telomērās un iespējamu vīrusa reaktivāciju no kādiem patogēniem efektiem (Endo et al. 2014, Prusty et al. 2013, Pellett et al. 2011).

Tā kā 3 asins plazmas paraugos tika identificēts HHV-6 genoma sekvenču klātbūtne un ar reālā laika PQR noteiktas augstas HHV-6 slodzes, tas liek domāt par vīrusa reaktivāciju organismā, bet kā iepriekšējos pētījumos Caserta (2010) ar kolēģiem ir norādījusi, kvalitatīva un kvantitatīva asins plazmas PQR analīze nav pietiekama, lai atšķirtu aktīvu vīrusa replikāciju no HHV-6 vīrusa hromosomālas integrācijas. Tāpēc izmantoja gēnu ekspresijas metodi, kas pašreiz ir drošākā metode, kas ļauj diferencēt latentu no aktīvas infekcijas L U60/U66 proteīnu kopijas norāda uz lītisku infekciju un ir detektējamas tikai sākotnējās inficēšanās gadījumā vai vīrusa reaktivācijas gadījumā, bet ne latentā infekcijā. (Mirandola et al. 1998; Bosch et al 2001). Tā kā analizētajos paraugos tika konstatētas tikai U89/90 proteīnu kopijas klātbūtne, tas liecina, ka fibromialģijas pacientiem ir persisterenta HHV-6 infekcija, latentā fāzē.

Lai precīzi varētu spriest un izdarīt drošus secinājumus par vīrusa saistību ar fibromialģijas sindromu nepieciešams veikt plašākus pētījumus ar lielāku fibromialģijas pacientu skaitu. Tāpat būtu nepieciešams noteikt HHV-6 un HHV-7 specifisko IgM klases antivielu klātbūtni fibromialģijas pacientiem, kas varētu būt iespējamās vīrusa aktīvas

infekcijas indikators, kā arī turpmāajos pētījumos varētu noteikt iekaisuma citokīnu ekspresijas līmeņus. Nepieciešams izvērtēt vai vīrusa infekcija ir šī sindroma ierosinātājfaktors vai tikai pamatslimības fons.

## 5 SECINĀJUMI

1. HHV-6 un HHV-7 infekcijas ir plaši izplatītas fibromialģijas pacientiem.
2. Latvijā sastopami abi vīrusa varianti, gan HHV-6A, gan HHV-6B
3. Pacientiem ar fibromialģiju ir augsta HHV-6 un HHV-7 vīrusu slodze, salīdzinājumā ar praktiski veselajiem indivīdiem.
4. HHV-6 augstā vīrusu slodze ( $>1$  miljons kopijas/ $10^6$  PBL), dod iemeslu domāt par HHV-6 vīrusu hromosonālo integrāciju, fibromialģijas pacientiem.
5. IE U89/U90 gēnu ekspresija fibromialģijas pacientiem, norāda uz HHV-6 persistentu infekciju latentā fāzē.

## PATEICĪBAS

Izsaku lielu pateicību darba vadītājai vadošajai pētniecei Dr.habil.biol. Svetlanai Čapenko. Paldies RSU Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūta direktorei asociētajai profesorei un akadēmiķei Dr. med. Modrai Murovscai. Paldies Mag. Biol Santai Rasai par palīdzību praktisko iemaņu iegūšanā. Paldies Dr. hab. biol. Indriķim Muižniekam par darba recenzēšanu.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abbi B., Natelson B. 2013. Is chronic fatigue syndrome the same illness as fibromyalgia: evaluating the 'single syndrome' hypothesis. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians.* 106:3-9.
2. Ablashi D, Agut H, Alvarez-Lafuente R, Clark DA, Dewhurst S, et al. 2013. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch Virol.* PMID:24193951
3. Ablashi D.V. 1994. Viral studies of chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis,* 18:130-133.
4. Ahlqvist J., Fotheringham J., Akhyani N., Yao K., Fogdell-Hahn A. and Jacobson S. 2005. Differential tropisms of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *J.Neurovirol.* 11:384-394.
5. Arbuckle J.H., Medveczky M.M., Luka J., Hadley S.H., Luegmayer A., Ablashi D., et al. 2010. The latent human herpesvirus- 6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc. Nat. Acad.Sci.USA.* 107: 5563-5568.
6. Bandobashi K., Daibata M., Kamioka M., Tanaka Y., Kubonishi I., Taguchi H., Ohtsuki Y., Miyoshi I. 1997. Human herpesvirus 6 (HHV-6)-positive Burkitt's lymphoma: establishment of a novel cell line infected with HHV-6. *Blood.* 90(3):1200-7.
7. Bellato E., Marini E., Castolfi F., Barbasetti N., Mattei L., Bonasia E.D. and Blonna D. 2012. Fibromyalgia Syndrome: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *Pain research and treatment.* ID 426130.
8. Benett R.M., Jones J., Turk D.C, Russel I.J. and Matallana L. 2007. An internet survey of 2596 people with fibromyilia. *BMC Musculoskelet Disord .* 8:27.
9. Bolle L, Naesens L, Clercq E.. 2005. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy. *Microbiology Reviews-* 18:217-245.
10. Bosch G., Locatelli G., Geerts L., Faga G., Ieven M., Goossens H., Bottiger D., Oberg B. et al. 2001. Development of Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection of Active Human Herpesvirus 6 Infection. *Journal of Clinical Microbiology.* 39:2308-2310.
11. Caselli E., Di Luca Dario.2007.Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *New Microbiologica –* 30:173-187.

12. Caserta M.T., Hall C.B., Schabel K., Lofhus G., Marino A., Shelley L., Yoo C., Carnahan J., Anderso L., Wang H. 2011. Diagnostic assays for active infection with human herpesvirus 6 (HHV-6). *J.Clin.Virol.* 48(1): 55-7.
13. Chan P.K., Ng H.K., Hui M., Cheng A.F. 2001. Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain. *J Med Virol.* 64(1):42-6
14. Chapenko S., Krumina A., Logina I., Rasa.S., Chistjakovs M., Sultanova A., Viksna L. and Murovska M. 2012. Association of Active Human Herpesvirus-6,-7 and Pavovirus B19 Infection with Clinical Outcomes in patiens with Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. *Advances in Virology.* ID 205085.
15. Clauw D.J., Arnold L., McCarberg B. 2011. The science of fibromyalgia. *Mayo Clinic proceedings.* 86(9):907-911.
16. Dominguez G., T.R.Dambaugh, F.R. Stamey, S.Dewhurst, N. Inoue, and P.E. Pellett. 1999. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content nd comparison with human herpesvirus 6A. *J.Virol.* 73:8040-8052.
17. Endo A., Watanabe K., Ohye T., Suzuki K., Matsubara T., Shimizu N., Kurahashi H., Yoshikawa T., Katano H. Et al. 2014. Molecular and virological evidence of viral activation form chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin.Infect.Dis.* PMID:24803376.
18. Fotheringham J., Akhyani N., Vortmeyer A., Donati D., Willims E., Oh U. et al. 2007. Detection of active human herpesvirus-6 infection in the Brain: Correlation with Polymerase Chain Reaction Detection in Cerebrospinal Fluid. *Journal of Infectious Diseases.* 195(3): 450-453.
19. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, Katsafanas G, Roffman E, Danovich RM. 1990. Isolation of new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)*87:748-52
20. Furukawa M., Yasukawa M., Yasushijin Y. and Fujita S. 1994. Distinct effects of human herpesvirus 7 on surface molecule exppression and functional od CD4+ T cells. *J.Immunol.* 152: 5768-5775.
21. Goldenberg D.L., Burckhardt C., Crofford L. 2004. Managment of fibromyalgia syndrome. *Journal of the American Medical Association.* 292(19): 2388-2395.
22. Gravel A., Sinnett D., Flamand L. 2013. Frequency of chromosomally- integrated human herpesvirus 6 in children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE* 8(12):e84322.
23. Isegawa Y, T. Mukai, K. Nakano, M.Kagawa, J.Chen, Y.Mori, T.Sunagawa, K. Kawanishi, J.Sashihara, A.Hata, P.Zou, H.Kosuge and K. Yamanishi. 1999.

- Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variant A and B. *J. Virol.* 73:8053-8063.
24. Katsafanas G.C., Schirmer E.C., Wyatt L.S and Frenkel N. 1996. In vitro activation of human herpesviruses 6 and 7 from latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9788-9792.
  25. Kempf W., Adams V., Mirandola P., Menotti L., Di Luca D., Wey N., Muller B. and Campadelli-Fiume G. 1998. Persistence of human herpesvirus 7 in normal tissues detected by expression of a structural antigen. *J. Infect. Dis.* 178:841-845.
  26. Kendall S.A., Schaadt M.L, Graff L.B., Wittrup I., Malmkov H., Krogsgaard K., Bartels E.M., Bliddal H., Danneskiold-Samsøe B. 2004. No effect on antiviral (valacyclovir) treatment in fibromyalgia: a double blind, randomized study. *J Rheumatol.* 31(4): 783-4.
  27. Kozireva S., Užameckis D., Bariševs M., Murovska M. 2009. Sensitivity and reproducibility of polymerase chain reaction assays for detection of human herpesvirus 6 and 7. *Proceeding of the Latvian Academy of science.* 63:180-185.
  28. Kreuger G. and Ablashi D. 2006. Human Herpesvirus-6, Second Edition- General Virology, Epidemiology and Clinical pathology. *Perspectives in Medical Virology.* Netherlands: Elsevier, 251-262.
  29. Lee Y.H., Choi S.J., Ji J.D., Song G.G. 2012. Candidate gene studies of fibromyalgia: a systemic review and meta-analysis. *Rheumatol. Int.* 32(2): 417-26.
  30. Levy J. 1997. Three new human herpesviruses types 6,7 and 8. *Lancet* – 349:558-562.
  31. Lusso P., Secchiero P., Crowley R.W., Garzino-Demo A., Berneman Z.N. and Gallo R.C. 1994. CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91:3872-3876.
  32. Magalhaes Ide M, Martins RV, Vianna RO, Moyses N, Afonso LA, Olivera SA, Cavalcanti SM. 2011. Detection of human herpesvirus 7 infection in young children presenting with exanthema subitum. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106: 371-3.
  33. Mirandola P., Menegazzali P., Merighi S., Ravaioli T., Cassai E., Di Luca D. 1998. Temporal Mapping of Transcripts in Herpesvirus 6 Variants. *Journal of Virology.* 75:3837-3844.
  34. Mori Y., Yamanishi K. 2007. HHV-6A, 6B and 7: pathogenesis, host response, and clinical disease. Cambridge University Press. PMID: 21348085.
  35. Nicolson L. 2002. Co-infections in fibromyalgia syndrome, chronic fatigue syndrome and other chronic illnesses. *Fibromyalgia Frontiers.* 10:5-9.

36. Pellett E.P., Ablashi D., Ambros P., Agut H., Caserta M.T., Descamps V., Flamand L., Gautheret-Dejean A., Hall C.B. et al. 2011. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. Wiley Online Library. DOI: 10.1002/rmv.715.
37. Podolecki, T., Podolecki, A. and Hrycek, A. 2009. Fibromyalgia: pathogenetic, diagnostic and therapeutic concerns. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 119(3): 157–61.
38. Prusty K.B., Krohne G., Rudel T. 2013. Reactivation of Chromosomally Integrated Human Herpesvirus-6 by Telomeric Circle Formation. PLOS genetics. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004033.
39. Roizenblatt S., Moldofsky H., Benedito-Silva A.A. and Tufik S. 2001. Alpha sleep characteristics in fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*. 44: 222-230.
40. Rotola A., Ravaioli T., Gonelli A., Dewhurst S., Cassai E. 1998. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latency infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*. 95:13911-13916.
41. Staud R. 2011. Periheral Pain Mechanisms in Chronic Widespread Pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol*.25(2):155-164.
42. Staud R., Smitherman M.L. 2002. Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: Pathogenetic role. *Current Pain and Headache Reports*. 6(4):259-266.
43. Vandamme A.M., Franssen K., Debaisieux L., Marissens D., Sprecher S., Vaira D., Vandembroucke A.T. and Verhofstede C. 1995. Standardisation of primers and an algorithm for HIV-1 diagnostic PCR evaluated in patients harbouring strains of diverse geographical origin. *The Belgian AIDS Reference Laboratories. - J Virol Methods*. 51(2-3): 305-16.
44. Wang F.Z., Dahi H., Linde A., Brytting M., Ehrnst A., Ljungman P. 1996. Lymphotropic Herpesviruses in Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood*. 88: 3615:3620.
45. Ward K.N., Andrews N.J., Verity C.M., Miller E., Ross E.M. 2005. Human herpesvirus-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. *Arch Dis Child*. 90:619-623.
46. Ward KN.2005. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infection in the immunocompetent. *J.Clin.Virol*. 32: 183-93.
47. Watkins L.R., Milligan E.D. and Maier S.F. 2001. Spinal cord glia: new players in pain. *Pain*. 93(3):201-205.

48. Watkins L.R., Milligan E.D., Maier S.F. 2001. Glial activation a driving force for pathological pain. *Trends in Neurosciences*. 24:450-455.
49. Wolfe F., Clauw D.J., Fitzcharles A. et al. 2011. Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia. *Journal of Rheumatology*. 38(6): 1113-1122.
50. Wolfe F., Smythe A.H., Yunus M.B. et al. 1990. Criteria for the classification of fibromyalgia. *Arthritis and Rheumatism*. 33:160-172.
51. Yalcin S., Karpuzoula T., Suleymanlar G., Mutlu G., Mukai T., Yamamoto T., Isegawa Y., Yamanishi K. 1994. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infection in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Arch Virol*. 136(1-2): 183-190.
52. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. – *Lancet*, 1:1065-1067.
53. Yao K., Mandel M., Akyani N., Maynard K., Sengamalay N., Fotheringham J., Ghedin E., Kashanchini F., Jacobson S. 2006. Differential HHV-6A gene expression in T cells and primary human astrocytes based on multi- virus array analysis. *Glia* 53(8):789-98.
54. Yoshida M, Uno F, Bai ZL, Yamada M, Nii S, Sata T, Kurata T, Yamanishi K and Takahshi M. 1989. Electron microscopic study of herper-type virus isolated from an infant with exanthem subitum. *Microbiol.Immunol.* – 33:147-154.
55. Yoshikawa T., Ihira M., Suzuki K., Suga S., Matsubara T., Furukawa S., Asano Y. 2000. Invasion by human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 of the central nervous system in patients with neurological signs and symptoms. *Arch Dis Child*. 83:170-171.
56. Zuckerman J, Banatvala J.E., Pattison J.R. 1995. *Principles and Practice of Clinical Virology (Third Edition)*. Chinchester. WILEY, 1-3, 135-151.