

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**HHV-6 UN CCL5 IEKAISUMA HEMOKĪNU
IESAISTE AUTOIMŪNĀ TIREOIDĪTA
ATTĪSTĪBĀ**

MAĢISTRA DARBS

Autors: Ildze Ventīņa

Stud.apl.Nr. ik09040

Darba vadītājs: Dr.med. Alīna Sultanova

RĪGA 2018

SATURS

SATURS	2
ANOTĀCIJA	5
SUMMARY	6
APZĪMĒJUMU SARAKSTS	7
IEVADS	8
1. LITERATŪRAS APSKATS	10
1.1. Cilvēka herpesvīrusu klasifikācija un HHV-6 atklāšana	10
1.2. Cilvēka herpesvīrusu morfolģija un replikācijas cikls	10
1.2.1. Cilvēka herpesvīrusu struktūra	10
1.2.2. HHV-6 genoma struktūra	11
1.2.3. HHV-6 replikācijas cikls	12
1.3. HHV-6 raksturojums	14
1.3.1. Šūnu tropisms	14
1.3.2. Hromosomāli integrētais HHV-6	14
1.3.3. HHV-6A un HHV-6B	15
1.3.4. Transmisija	16
1.3.5. Epidemiolģija	17
1.4. HHV-6 un CCL5	17
1.4.1. CCL5 (RANTES)	17
1.4.2. HHV-6 U12 un U51	18
1.5. HHV-6 infekcijas veidi	19
1.5.1. Primāra infekcija	20
1.5.2. Persistenta infekcija	20
1.5.3. Latenta infekcija	21

1.5.4. Aktīva infekcija	21
1.6. HHV-6 ietekme uz imūnsistēmu	21
1.6.1. Imūnatbilde pēc primārās infekcijas	21
1.7. Klīniskās izpausmes	22
1.7.1. Ar HHV-6 asociētās slimības	22
1.7.2. Ar HHV-6 asociētās autoimūnās slimības	23
1.8. Ar vairogdziedzeri asociētās autoimūnās slimības	23
1.8.1. Hronisks autoimūns tireoidīts	23
1.8.2. Greivsa slimība	25
1.9. HHV-6 diagnostika un ārstēšana	26
1.9.1. HHV-6 diagnostika	26
1.9.2. HHV-6 ārstēšana	26
2. Metodes un materiāli	28
2.1. Pacienti	28
2.2. Paraugu sagatavošana	29
2.3. Makrofāgu šūnu izolēšana no perifēro asiņu mononukleārajām šūnām	29
2.4. DNS izdalīšana no asinīm un audiem	29
2.4.1. DNS un RNS koncentrācijas noteikšana	30
2.4.2. DNS kvalitātes pārbaude	30
2.5. HHV-6 genoma secības klātbūtnes noteikšana	31
2.6. HHV-6 genoma tipēšana	32
2.7. RNS izdalīšana no asinīm un audiem	34
2.8. Komplementārās DNS sintēze	34
2.9. Elektroforēze agarozes gēlā	34
2.10. ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay)	35
2.11. HHV-6 slodzes noteikšana	35
2.12. Imunohistoķīmija	35
2.13. Izmantotie materiāli, reaģenti un iekārtas	36
3. REZULTĀTI	38

3.1. Molekulārie virusoloģijas rezultāti pacientiem ar AIT un kontroles grupām ..	39
3.1.1. HHV-6 vīrusa genoma klātbūtnes noteikšana AIT pacientiem un autopsiju paraugiem, un praktiski veseliem asins donoriem	39
3.1.2. HHV-6 vīrusa tipēšana	40
3.1.3. Aktīvas HHV-6 infekcijas noteikšana	40
3.1.4. HHV-6 vīrusa slodzes noteikšana pacientiem ar AIT un autopsijas paraugiem	42
3.2. Imunoloģijas rezultāti	43
3.3. Imunohistoķīmijas rezultāti	45
4. DISKUSIJA.....	47
5. SECINĀJUMI	50
PATEICĪBAS	51
6. LITERATŪRAS SARAKSTS.....	52

ANOTĀCIJA

Šī darba ietvaros tika pētīta HHV-6 un CCL5 iekaisuma hemokīnu iesaistes loma autoimūnā tireoidīta attīstībā. Pētījumā iesaistīti 60 pacienti ar AIT, kuriem veikta tireoīdektomijas (*Thyreoidectomy totalis*) operācija, 30 autopsiju paraugi un 30 veseli asins donori kā kontroles grupa.

HHV-6 genoma sekvenca tika atrasta 59 (98%) AIT pacientiem gan audu, gan asins DNS paraugos un 23 (77%) kontroles grupas pacientiem. Aktīva infekcija tika noteikta 35/59 (59%) AIT pacientu vairogdziedzeru audu paraugos. Vīrusa slodze pie aktīvas infekcijas bija lielāka kā pacientiem pie latentas infekcijas (mediāna 1206 IQR: 455-2804 pie aktīvas pret 544.5 IQR: 155-1589 kopijas/ 1×10^6 šūnām pie latentas infekcijas) AIT pacientiem RANTES līmenis bija statistiski zemāks (mediāna 9.267, IQR: 3.489-16.93) kā asins donoriem (mediāna 56.6, IQR: 30.71 - 101.5) AIT pacientiem ar aktīvu infekciju, kuriem tika detektēta HHV-6 U12 un/vai U51 gēnu ekspresija, uzrādīja daudz zemāku RANTES līmeni, nekā pacientiem ar aktīvu vīrusa infekciju bez U12 un U51 gēnu ekspresijas. AIT pacientu audiem un asinīm, kā arī kontroles grupas asins paraugiem veica imunohistoķīmiju. Kontroles grupas asins donoru paraugiem un AIT pacientu audu paraugos tika konstatēta RANTES un HHV-6 gB (gp116) ekspresija. AIT pacientu PBMC paraugos tika konstatēta un HHV-6 gB (gp116) ekspresija, turpretim RANTES ekspresija konstatēta ļoti vāja.

Darba saturu veido 6 nodaļas ar apakšnodaļām. Kopumā darba izstrādāšanai izmantoti 78 literatūras avoti, 14 attēli un 1 tabula. Darba apjoms sastāv no 59 lapaspusēm. Bakalaura darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā.

Atslēgvārdi: HHV-6; autoimūnais tireoidīts; CCL5, U12, U51, U79/80

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the potential role of human herpesvirus 6 (HHV-6) and CCL5 involvement in AIT development. This study included 60 AIT patients, 30 autopsied subjects without thyroid pathologies and 30 healthy donors as controls.

HHV-6 genome sequence was detected in 59 (98%) AIT patients' thyroid gland tissue and blood DNA samples and 23 (77%) in control group. Active infection was detected in 35/59 (59%) AIT patients' thyroid gland tissue. Higher median viral load was found in patients with active viral infection than in patients with latent infection (median 1206 IQR: 455-2804 active and 544.5 IQR: 155-1589 copies/ 1×10^6 cells latent infection).

AIT patients' RANTES level was statistically lower (median 9.267, IQR: 3.489-16.93) compared to blood donors (median 56.6, IQR: 30.71 - 101.5) AIT patients who were positive for HHV-6 U12 and/or U51 gene expression, showed much lower RANTES level, compared to patients with active viral infection without the expression of U12 and U51 genes. RANTES and HHV-6 (gp116) was visualised in AIT patients' tissue and blood, as well as control groups blood samples with immunohistochemistry. RANTES and was detected in control groups' blood donor samples and AIT patient samples. HHV-6 gB (gp116) expression was detected in AIT patients' PBMC samples, however RANTES expression was relatively low.

The thesis has 6 chapters with subdivisions. The total amount of 78 references, 14 figures and 1 graphic chart are used in this thesis which has 59 pages. This work was done in Rigas Stradins University August Kirhenstein Institute of Microbiology and Virology.

Key words: HHV-6; autoimmune thyroiditis; U79/80; RANTES; U12; U51

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AIT- autoimūnais tireoidīts

bp – bāžu pāri

CCL5 (RANTES) – beta hemokīns, aktivācijas regulēts, normālu T šūnu ekspresēts un sekretēts

CCR5 - Ar G proteīnu saistītais RANTES galvenais receptors

CMV- citomegalovīruss

DNS- dezoksiribonukleīnskābe

DŠ- dendrītiskās šūnas

HHV-6 – cilvēka sestais herpesvīruss

HT- Hašimoto tireoidīts

kb- kilobāzes

miRNS- mikro ribonukleīnskābe

MgCl₂ – magnija hlorīds

ml – mililitri, μl – mikrolitri

nm- nanometri

nPCR - polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimerēšanu

PCR – polimerāzes ķēdes reakcija (ang. *polymerase chain reaction*)

RNS- ribonukleīnskābe

SDS – nātrija dodecilsulfāts

TAE – Tris-Acetāts

Taq – termostabila DNS polimerāze

HLA- cilvēka leikocītu antigēns

DR- tiešais atkārtojums (ang. *direct repeat*)

TSHr- vairogdziedzera stimulējošā hormona receptors

TG- tireoglobulīns

TPO- tireoperoksidāze

IEVADS

HHV-6 ir visā pasaulē plaši izplatīts, limfotrops β herpesvīruss. Inficēšanās ar HHV-6 ir plaši izplatīta pasaules iedzīvotāju vidū, tā seropozitivitāte ir tuvu 100%, lai gan ir izņēmuma valstis (Campadelli-Fiume G. et al. 1999). Primārā infekcija, kuru izraisa HHV-6, izpaužas agri bērnībā kā trīsdienu drudzis (roseola infantum) (R. R. Razonable, 2013), seroepidemioloģiskie pētījumi liecina par to, ka lielākā daļa bērnu iegūst antivielas pret HHV-6 pirms divu gadu vecuma (Okuno et al., 1989). HHV-6 infekcija ir nozīmīgs cēlonis oportūnisko infekciju ierosināšanā imunosupresēto, tipiski AIDS vai transplantātu recipientu pacientu vidū, kuriem HHV-6 infekcija/reaktivācija var izraisīt transplantēto orgānu atgrūšanu vai nāvi (Campadelli-Fiume G. et al. 1999).

HHV-6 satur divus gēnus - U12 un U51, kuri kodē ar G proteīnu saistītos receptoru (GCR) paredzamos homologus uz šūnu virsmas. HHV-6 U12 funkcionē kā β -hemokīna receptors, saistīts ar kalcija mobilizējošo signāla transdukcijas ceļu priekš RANTES, monocītu hemoatraktanta proteīna-1 (MCP-1) un makrofāgu iekaisuma proteīniem 1α un 1β . HHV-6 U51 saistās pie CCL5 (RANTES) un lejupregulē šī hemokīna transkripciju (Tadagaki K. et al. 2005).

RANTES ir hemokīni, kas piesaista un aktivē specifiskas iekaisumu šūnu populācijas (von Luetichau I. et al. 1996). Proteīni, kurus kodē U12 un U51 gēni, var tikt ekspressēti uz dažādu epiteliālo un dažu PBMC virsmas, kas padara tās par potenciālu iemeslu, kāpēc tiek ierosināts autoimunitātes process un saimnieka organisma GCR kā auto-reaktīvo T un B limfocītu mērķi (Isegawa Y. et al. 1998).

HHV-6 tiek minēts kā viens no iespējamiem vides faktoriem autoimūnā tireoidīta izraisīšanā. Tas izpaužas ar limfocitāru infiltrāciju vairogdziedzera parenhīmā, folikulāro šūnu atrofiju, granulāro tirocītu klātbūtni un fibrozi. (Iddah M., Macharia B., 2013).

Hipotēzes:

1. HHV-6 spēj modulēt RANTES signālceļu caur HHV-6 U12 un U51 gēnu ekspresiju, kas varētu būt viens no AIT attīstības mehānismiem.

2. Augsts limfotropās HHV-6 genoma sekvenču detekcijas biežums vairogdziedzera audos varētu būt augstās limfocītu un makrofāgu infiltrācijas dēļ, kas ir raksturīgi autoimūnajām slimībām.

Darba mērķis: noskaidrot HHV-6 un CCL5 iekaisuma hemokīnu iesaistes lomu autoimūnā tireoidīta attīstībā.

Darba uzdevumi:

1. Veikt autoantivienu testus pret tireoglobulīnu (TG), tireoperoksidāzi (TPO) un TSH receptoriem asins plazmā.
2. Izdalīt DNS un RNS no vairogdziedzera asinīm un audiem.
3. Pārbaudīt DNS un RNS kvalitāti un kvantitāti izdalītajiem paraugiem.
4. Noteikt HHV-6 genoma klātbūtni vairogdziedzera asinīs un audu DNS paraugos.
5. Paraugos, kuros noteikta HHV-6 genoma klātbūtne, veikt vīrusa tipēšanu un vīrusa slodzes noteikšanu.
6. Veikt komplementārās DNS sintēzi no izdalītajiem RNS paraugiem.
7. Noteikt HHV-6 aktīvas infekcijas klātbūtni vairogdziedzera audu un asins komplementārās DNS paraugos, nosakot U79/80 mRNS klātbūtni ar nPCR metodi.
8. Noteikt HHV-6 U51 un U12 mRNS klātbūtni ar nPCR metodi.
9. Pārbaudīt RANTES līmeni asins plazmā.
10. Veikt imūnfluorescenci.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Cilvēka herpesvīrusu klasifikācija un HHV-6 atklāšana

Herpesviridae dzimta ir iedalīta trīs apakšdzimtās- alfa, beta un gamma (Leroy B. et al. 2016). Pie α herpesvīrusiem pieder herpes simplex vīruss 1 (HSV-1), herpes simplex 2 (HSV-2) un varicella zoster (VZV). Pie β herpesvīrusu apakšdzimtas pieder cilvēka citomegalovīruss (CMV), cilvēka herpesvīruss-6 (HHV-6) un cilvēka herpesvīruss-7 (HHV-7). γ - herpes vīrusi ir Epšteina–Barra vīruss (EBV, HHV-4) un cilvēka 8. herpesvīruss (HHV-8) (Jenkins F., Hoffman L. 2000).

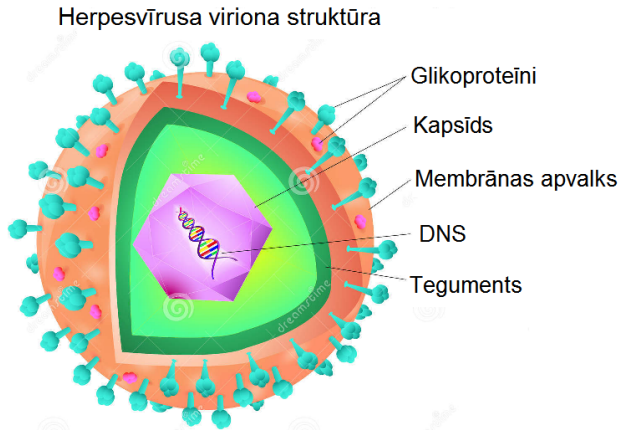
HHV-6 pirmo reizi izolēja 1985. gadā Zaki Salahuddin no AIDS pacientu perifēro asiņu mononukleārajām šūnām un liesas audiem (Krueger G., Ablashi D. 2006).

Sākotnēji HHV-6 tika iedalīts divās grupās kā variants A (HHV-6A) un variants B (HHV-6B) (Schirmer et al., 1991). Tie abi ir radnieciski, bet starp tiem pastāv bioloģisku, imunoloģisku, epidemioloģisku un molekulāru īpašību atšķirības. HHV-6B galvenokārt izraisa *Exanthem subitum* (Yamanishi et al., 1988), bet HHV-6A vēl nav minēts kā tiešs kādas slimības izraisītājs, Līdz 2012. gadam HHV-6A un 6B tika uzskatīti par diviem 6. herpesvīrusa variantiem, tomēr sakarā ar to, ka starp tiem pastāv nozīmīgas atšķirības, Internacionālā Vīrusu Taksonomijas Komiteja atzina tos par diviem atšķirīgiem vīrusiem, paturot līdzšinējo nomenklatūru- HHV-6A and HHV-6B (Adams M., Carstens E. 2012).

1.2. Cilvēka herpesvīrusu morfoloģija un replikācijas cikls

1.2.1. Cilvēka herpesvīrusu struktūra

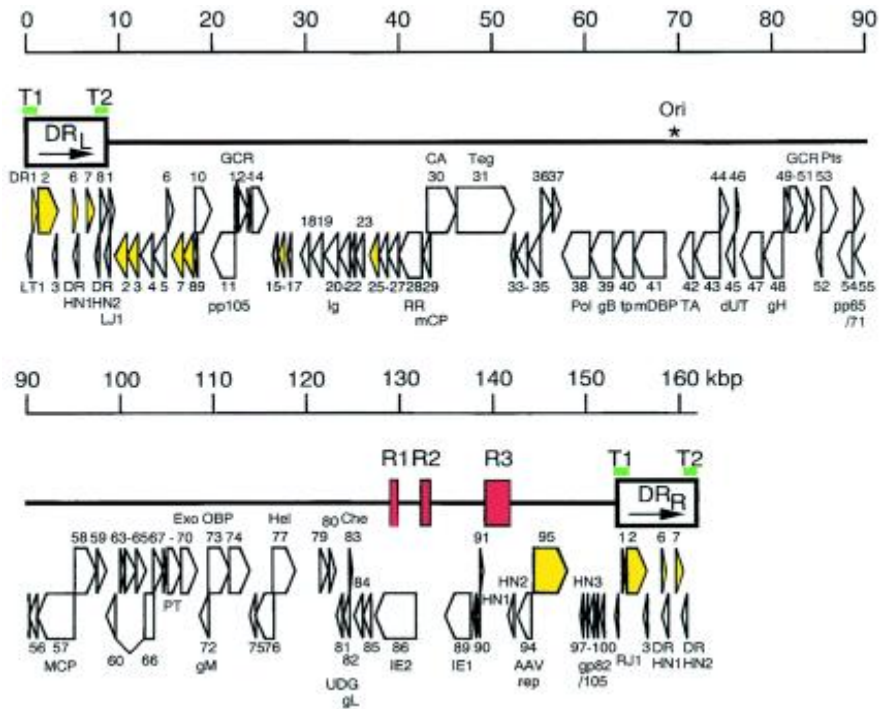
Visi herpesvīrusi sastāv no trim galvenajiem strukturālajiem elementiem: nukleokapsīda ar diametru 90-110 nm un ikosaedrisku simetriju, centrā ir kors, kas satur virālo DNS genomu, kapsīda, kura satur virālos glikoproteīnus, un teguments, kas sastāv no proteīnu kompleksa, kas aizņem vietu starp membrānas apvalku un kapsīdu. Nobriedušu virionu diametrs ir aptuveni 200 nm.



1. Attēls. Herpesvīrusa viriona struktūra.

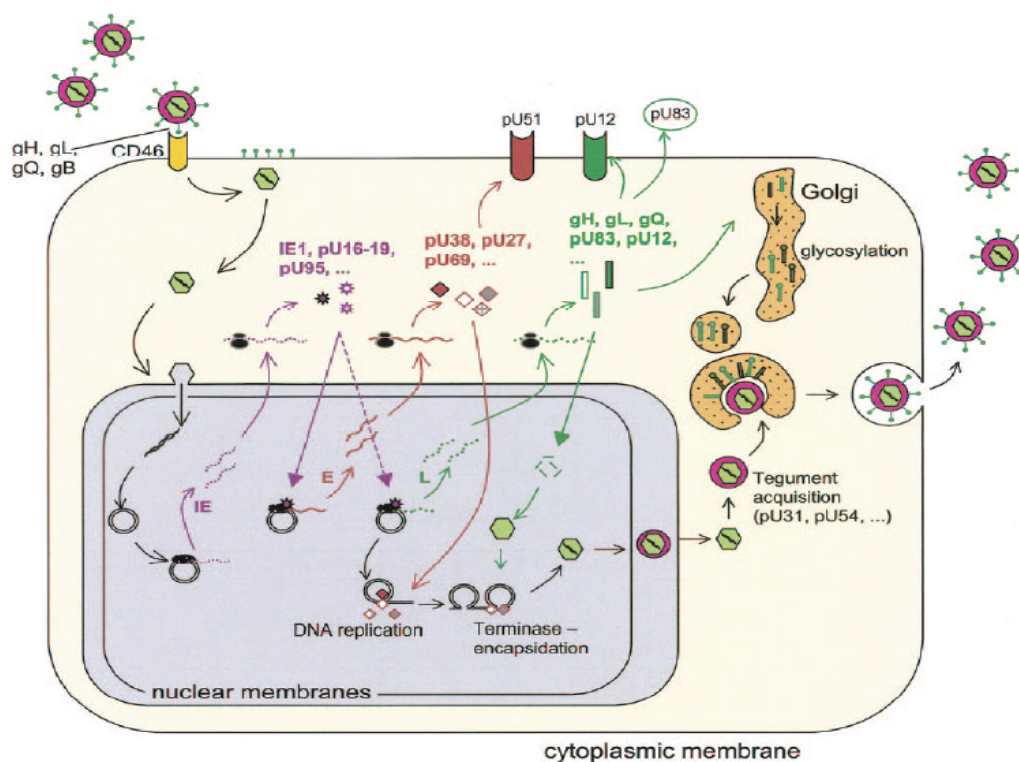
Figure 1. Structure of the Herpesvirus virion¹

1.2.2. HHV-6 gena struktūra



HHV-6 genoms ir lineāra, dubultspirāles DNS molekula, 160 to 162 kb liela, un sastāv no 143-145 kb unikālā (U) reģiona, kas robežojas ar 8-9 kb lieliem tiešo galu atkārtojumiem (DR) un trīs vidējiem atkārtojumiem- R1, R2 un R3 agrīnajā rajonā A (IE-A) (2.attēlā). Tiešie atkārtojumi satur DNS sekvenču motīvus pac-1 un pac-2, kuri šķeļ genomu, un vairākkārtējus heksanukleotīda (GGGTTA)_n atkārtojumus, kas ir raksturīga mugurkaulnieku hromosomu telomēru sekvenču (T). Unikālā reģiona genomiskā struktūra ir līdzīga CMV garā unikālā reģiona struktūrai un ir kolineāra HHV-7. HHV-6B genoms satur 119 potenciālās proteīnu kodējošās gēnu daļas (ORFs), kuru kodē 97 gēni, no kuriem 9 nav sastopami HHV-6A (Bolle L. et al. 2005).

1.2.3. HHV-6 replikācijas cikls



3. Attēls. Shematiski attēlots HHV-6 lītiskās replikācijas cikls.

Figure 3. Schematic representation of the HHV-6 lytic replication cycle³

Clin Microbiol Rev., 18(1): p. 219

³Bolle L. et al. 2005. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy-

HHV-6A un HHV-6B iekļūst šūnā, saistoties ar CD46, kas atrodas uz visu šūnu, kurām ir kodoli, virsmas un ir fizioloģiski iesaistīts komplementu regulācijā. HHV-6A gH-gL-gQ komplekss (glikoproteīni H, L un Q), kuru kodē HHV-6 U48, U82 un U100 gēni, darbojas kā virālais ligands ar cilvēka CD46 receptoru. Pēc saistīšanās un vīrusa apvalka saplūšanas ar šūnas membrānu, nukleokapsīda tiek transportēta caur citoplazmu uz kodola poru kompleksiem, caur kuriem virālais DNS genoms tiek ievadīts nukleoplazmā. Tad vīruss izmanto celulāro transkripcijas mehānismu, lai producētu virālos proteīnus (nekavējoši agrīnos [IE], agrīnos [E], un vēlīnos [L]). HHV-6 IE proteīni tiek sintezēti pāris stundas pēc šūnas inficēšanas un regulē citu gēnu ekspresiju. Agrīno gēnu ekspresija ir atkarīga no IE proteīnu sintēzes un tie producē proteīnus, kas ir galvenokārt iesaistīti DNS metabolismā un replikācijā. Vēlīnie proteīni bieži tiek glikolizēti un kalpo kā nobrieduša vīrusa daļiņu komponenti. Pēc E proteīnu sintēzes, kuriem piemīt enzimatiskas īpašības nukleotīdu metabolismā un DNS sintēzē, sākas genoma replikācija. Virālā DNS tiek formēta garos pavedienos, kuri tiek salocīti un iepakoti kapsīdu prekursoros (Agut H. et al. 2015). Nobriedušās kapsīdas izkļūst no kodola citoplazmā, kur tās iegūst tegumentu un sekundāro virālo membrānas apvalku trans- Goldži kompleksā, kur uzkrājas virālie glikoproteīni. Nobriedušie virioni izkļūst ekstracelulārajā telpā eksocitozes ceļā. HHV-6 nobriešanas cikls no citiem herpesvīrusiem atšķiras ar to, ka uz inficēto šūnu virsmas nav nosakāmi virālie glikoproteīni. Kopējais viena replikācijas cikla laiks no infekcijas brīža līdz jaunu virionu izkļūšanai no šūnas ir aptuveni 72 h. Inficētās šūnas pēc šāda replikācijas cikla it bojā apoptozes/ nekrozes ceļā (De Boelle L. et al. 2015).

1.3. HHV-6 raksturojums

1.3.1. Šūnu tropisms

CD4+ T limfocīti ir primārās mērķšūnas gan HHV-6A, gan HHV-6B, ierosinot citopātisku infekciju, kas norāda uz iespējamu lomu HHV-6 imunosupresijas izraisīšanā. Tomēr pastāv atšķirības šo abu vīrusu šūnu tropismā: HHV-6A, salīdzinot ar 6B, daudz efektīvāk replicējas dažādu veidu citotoksiskajās efektoršūnās- kā CD8 T limfocītos, NK šūnās un gd (gamma delta) T limfocītos. HHV-6A un 6B var inficēt monocītus/makrofāgus un dendrītiskās šūnas. Pretēji T limfocītiem, kuri tiek ātri inficēti pēc kontakta ar HHV-6, B limfocīti var tikt inficēti tikai pēc inficēšanās ar EBV, kas varētu liecināt par EBV infekcijas ierosinātu virsmas receptoru ekspresiju, kuri atvieglo HHV-6 iekļūšanu B limfocītos. Sarkano kaulu smadzeņu cilmes šūnas (CD34+) arī ir HHV-6 infekcijas uzņēmīgas, tās var uzturēt latentu HHV-6, kuru var ar vertikālo transmisiju nodot diferencētām asins šūnām, ieskaitot monocītus/makrofāgus un dendrītiskās šūnas (Lusso P. 2006).

Chen T., Hudnall D. 2006. gada pētījumā noteica herpesvīrusu anatomiskās atrašanās vietas organismā, izmantojot reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcijas (RT-PCR) metodi audos no 8 autopsijām, kuri reprezentēja 40 lielākās anatomiskās vietas. HHV-6 detektēja visos astoņu autopsiju audos, visbiežāk faringeālajos audos (mēlē, pieauss un apakšžokļa dziederaudos, deguna gļotādā, mandelēs), plaušu audos (plaušās un pleirā), vairogdziedzera un virsnieru dziederaudos, limfoidālos audos (asinīs, liesā, limfmezglos), muskuļaudos (gludajā un šķērsvītrotajā muskulatūrā), gastrointestinālā trakta audos (barības vadā, kuņģī, tievajā un resnajā zarnā, aknās, aizkuņģa dziedzerī), urīnizvadsistēmas audos (nierēs, urīnpūslī) un maksts audos. HHV-6 klātbūtne maksts audos varētu liecināt par iespējamu seksuālu un perinatālu vīrusa infekcijas transmisiju.

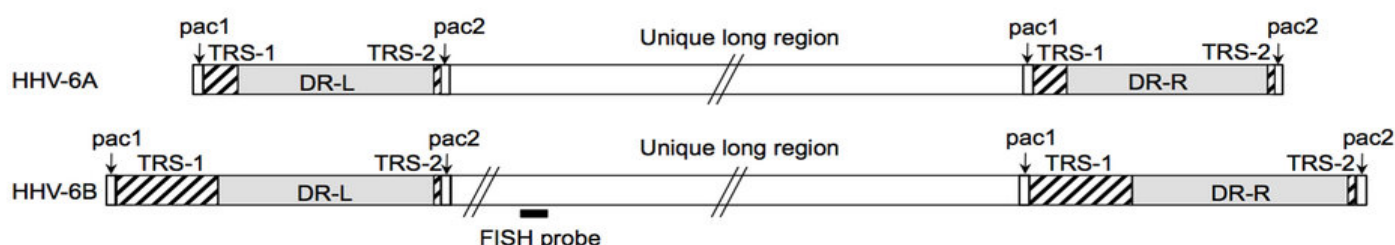
1.3.2. Hromosomāli integrētais HHV-6

HHV-6 integrē savu genomu cilvēku hromosomu telomērās. Integrācija var notikt somatiskajās šūnās vai dzimumšūnās (gametās). Integrējoties dzimumšūnās HHV-6 genoms nonāk katrā indivīda šūnā. Šādā veidā vīruss tiek nodots pēcnācējiem un tiek dēvēts par pārmantoto hromosomāli integrēto cilvēka sesto herpesvīrusu (iciHHV-6). Lai gan integrācija var notikt dažādās hromosomās, tā vienmēr notiek

telomēru reģionā. Šī integrācija norāda uz mehānismu, kā tiek saglabāts vīrusa genoms latentajā fāzē, kas ir unikāli tieši šim no visiem citiem herpesvīrusu tipiem (Kaufer B., Flamand L. 2014).

Dažādos indivīdos integrācija ir kartēta uz hromosomām: 17p13.3, 22q13 un 1q44 (Daibata et al, 1999). Abos HHV-6 genoma galos ir cilvēka telomēriem līdzīgas atkārtojumu sekvenču, un integrācijas vieta uz 17p hromosomas ir tuvu vai starp telomēriskajām sekvencēm (Clark D. A. et Griffiths P. D. 2003).

1.3.3. HHV-6A un HHV-6B



4. attēls. Shematiska HHV-6 genoma struktūra.⁴

Figure 4. Schematic representation of the HHV-6 genomic structure.

HHV-6A un HHV-6B atšķiras epidemioloģiski, in vitro augšanas veidos, reakcijā ar monoklonālām antivielām, restrikcijas endonukleāzes iezīmēm un nukleotīdu sekvenci. Gompels U.A. un viņa kolēģi ir noteikuši visu HHV-6A DNS sekvenci U1102 (Gompels U.A. et al. 1995).

HHV-6A un -6B genomiem ir aptuveni 90% identiski nukleotīdi un ~ 50% līdzība ar radniecisko HHV-7 (Greninger A.L. et al. 2018).

Isegawa et al. 1999. noteica visu HHV-6B DNS sekvenci HST celmam, kas izraisa exanthema subitum, un salīdzināja to ar HHV-6A U1102 celmu. Visa HHV-6 genoma 161- 573 bp garajā sekvencē kopā tika identificētas 115 potenciālās proteīnu kodējošās gēnu daļas (ORFs), ieskaitot dažus gēnus ar ievērojamām aminoskābju

⁴Ohye T. et al. 2014. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6- Scientific Reports 4, Article number: 4559.

atšķirībām. Atšķirības atrada agros/ regulatoros gēnos, DR2, DR7, U86/90, U89/90, un U95 (izņemot U47 gēnā), kas varētu būt atbildīgi par HHV-6A un HHV-6B pazīmju atšķirībām. Turklāt, izmantojot PCR dažādus abu veidu vīrusu specifiskus praimerus, tika atrasti 14 dažādi celmi, kas pieder HHV-6A vai HHV-6B vīrusiem.

Zinātnieki, kuri pētīja HHV-6B, CMV, BKV, AdV, un EBV virālās reaktivācijas kinētiku ik pēc nedēļas 404 pacientu hematopoētisko cilmes šūnu pēc-transplantācijas plazmas paraugos, atklāja, ka HHV-6B aktivējās 1 nedēļu pēc transplantācijas, un, sasniedza savu maksimālo līmeni agrāk (vidēji 3 nedēļas), salīdzinot ar pārējiem analizētajiem vīrusiem, turklāt tam bija īsākais laika intervāls starp tā noteikšanu un audu bojāeju, norādot uz to, ka viena veida terapija neder visiem šiem vīrusiem, un terapija pret HHV-6B ir jānozīmē laicīgi- profilaktiski pirms transplantācijas (Hill J.A. 2017)

HHV-6A un HHV-6B koinfekcijas 2014. gada pētījumā tika izmantots digitālais PQR pilienu tests (ang.*digital droplet PCR assay*), kurš nosaka absolūto DNS mērķa molekulu kvantifikāciju, skaitot nukleīnskābju molekulas, kuras ir iekapsulētas diskretos, konkrēta tilpuma definētos ūdens - eļļā pilienos. Ar šo metodi tika detektēta HHV-6A un 6B sugu koinfekcija multiplās sklerozes pacientu siekalās, perifēro asiņu mononukleārās šūnās un serumā (E. C. Leibovitch et al. 2014).

HHV-6B, salīdzinot ar HHV-6A, tiek biežāk detektēts PBMC. Abu sugu koinfekcija tika atrasta 22 no 34 plaušu audu paraugos (Cone et al. 1996), salīdzinājumā ar HHV-6B, HHV-6A tika biežāk detektēts cerebrospinālajā šķīdumā (CSŠ) (Hall et al. 1998).

1.3.4. Transmisija

1995. gada pētījumā Okuno T. et al. kā vienu no transmisijas ceļiem minēja intrauterīno un perinatālo periodu.

Tiek uzskatīts, ka ar HHV-6 var inficēties no asimptomātisku bērnu un pieaugušo siekalām. Tam ir raksturīga strauja transmisija maziem bērniem, jo tie ir uzņēmīgāki pret vīrusu.

Vīrusa iegūšanai ir nepieciešams tuvs kontakts, ko atbalsta fakts, ka bērniem, kuriem konstatēts vīruss, ir siekalu saskarsme ar māsām, brāļiem, vecākiem, radniekiem un auklēm. Nesen kā viens no iespējamajiem transmisijas veidiem tika

minēta izplatība respiratoro pilienu ceļā, jo HHV-6 DNS tika atrasts deguna gļotādā un ožas sīpolā.

1% jaundzimušo ir iedzimta HHV-6 infekcija. 86% iedzimto infekciju gadījumi ir nodoti ar hromosomāli integrētu vīrusu, tiek uzskatīts, ka pārējie 14% gadījumu vīrusi tiek iegūti caur transplacentāro infekciju (Tesini B. et al. 2014).

Yoshikawa T et al. 2001. gada pētījumā konstatēja HHV-6 primāro infekciju pieciem zīdaiņiem, kuriem tika transplantēta daļa no katra tā HHV-6 seropozitīvās mātes aknām.

1.3.5. Epidemioloģija

Neskaitot HSV-2 un HHV-8, herpesvīrusu sastopamība starp pieaugušajiem ir ļoti augsta, lai gan pastāv ģeogrāfiskās atšķirības (Bolle L. et al. 2005). 90% pieaugušo visā pasaulē ir HHV-6 seropozitīvi (Agut H. et al. 2015).

HHV-6 visuresošā daba ir pierādīta, jo visiem jaundzimušajiem ir pasīvās mātes antivielas pret HHV-6, kuru daudzums tipiski samazinās 4-6 mēnešu vecumā, pēc kā visai drīz sākas primārā infekcija. Lai gan HHV-6A DNS ir atrasts nabassaites mononukleārajās šūnās, un apmēram 1/3 indivīdiem ar hromosomāli integrēto HHV-6, tā loma sekojošajā aktīvajā infekcijā nav vēl vispāratzīta (Tesini B. et al. 2014).

1.4. HHV-6 un CCL5

1.4.1. CCL5 (RANTES)

RANTES (aktivācijas regulēts, normālu T šūnu ekspresēts un sekretēts) ir hemokīni ar zemu molekulāro masu. RANTES piemīt hemotaktiska aktivitāte attiecībā pret monocītiem, eozinofīlajiem leukocītiem un CD4+ T šūnām. RANTES regulē arī histamīna izdali no bazofīlajiem leukocītiem. (Hopp R.J. 1994).

RANTES (CCL5) ekspresē daudzi hematopoētisko un nehematopoētisko šūnu tipi, kuriem ir svarīga loma efektoru un atmiņas T šūnu migrācijā akūtu infekciju laikā.

Daudzu hronisku infekciju laikā notiek strauja vīrusa izplatība no sākonējās infekcijas vietas uz distāliem audiem. Lai T šūnas spētu migrēt uz inficētajiem orgāniem, vispirms ir jānotiek to aktivācijai limfmezglos un liesā. Hemokīniem ir galvenā loma T šūnu atbildes regulācijas nodrošināšanā, sākot ar naivo T šūnu piesaistīšanu uz iekaisušajiem limfoīdajiem audiem, T šūnu migrēšanu limfoīdajos

orgānos, aktivēto T šūnu migrāciju no limfoidajiem audiem uz efektorvietām, kā arī efektoro T šūnu migrāciju starp ne-limfoidajiem audiem (Sallusto F. 2000).

Beta hemokīnam RANTES ir nozīmīga loma imūnatbildes veidošanā pret vīrusu infekcijām. Sākotnēji uzskatīja, ka RANTES ir T šūnu specifisks hemokīns, tomēr tagad ir zināms, ka to ekspresē daudz dažādu šūnu tipi, ieskaitot epiteliālās šūnas un trombocītus. RANTES ir arī dažādu šūnu tipu hemoatraktants, kā piemēram, monocītiem, NK šūnām, atmiņas T šūnām, eozinofilajiem leukocītiem un dendrītiskajām šūnām.

Pie CCL5 (RANTES) pieder trīs dažādi hemokīnu (C-C motīvu) receptori (CCRs): CCR1, CCR3, un CCR5 (Singh S.K. 2018) RANTES ir viens no visefektīvākajiem limfmezgla imūno šūnu piesaistītājiem, maksimālo aktivitāti sasniedzot 7 dienā.

RANTES galvenais recptors CCR5 ir ar G proteīnu saistīts receptors, kurš spēj saistīties arī ar MIP1 α (CCL3) un MIP1 β (CCL4). CD4 T šūnu antigēn-specifiskās mijiedarbības ar antigēn-nesošajām dendrītiskajām šūnām (DŠ) izraisa lokālu MIP1 α un MIP1 β producēšanu, kuri piesaista naivās CD8 T šūnas uz to pašu peptīdu-prezentējošo DŠ, kuru aktivēja CD4 T šūna. Tādā veidā šie citokīni palīdz nodrošināt CD4 T šūnu palīdzību optimālai CD8 T šūnu imūnatbildes gatavībai (Crawford A. et al. 2011).

1.4.2. HHV-6 U12 un U51

Isegawa Y. et al. 1998. gadā aprakstīja divus gēnus (U12 un U51), kurus satur HHV-6 un, kuri kodē ar G proteīnu saistītos receptoru (GCR) paredzamos homologus uz šūnu virsmas. Proteīni, kurus kodē U12 un U51 gēni, var tikt ekspresēti uz epiteliālo un dažu perifēro asiņu mononukleāro šūnu populāciju virsmas, kas padara tās par potenciālu iemeslu, kāpēc tiek ierosināts autoimunitātes process un saimnieka organisma GCR kā auto-reaktīvo T un B limfocītu mērķi, kā arī, *in vitro* HHV-6 specifiskais GCR var mijiedarboties ar citokīnu signālceļu, izraisot RANTES lejupregulāciju.

U51 gēns ir viens no diviem 7-transmembranālajiem (7-tm) receptoriem, kurus satur HHV-6. Tas ir visradnieciskākais cilvēka citomegalovīrusa (CMV) UL78 gēna saimei, un R78 gēns ir nepieciešams efektīvai vīrusa replikācijai *in vivo*, liecinot par

to, ka arī U51 varētu spēlēt lomu vīrusa replikācijā un virulencē. HHV-6 U51 var saistīties pie RANTES ar nanomolāru afinitāti. U51 ir svarīga loma DNS replikācijā un sincītija veidošanā. U51 pozitīvai efekts uz HHV-6 replikāciju varētu būt kā sekas tam, ka U51 piemīt spēja pastiprināt šī vīrusa izplatību no šūnas uz šūnu (Zhen Z. et al. 2005). U51 saistās ar RANTES un citiem CC hemokīniem, un tā ekspresija epiteliālajās šūnās, kuras jau producē RANTES, noved pie specifiskas transkripcionālas lejupregulācijas.

HHV-6 U12 *in vitro* uzrāda augstu saistīšanās spēju ar hemokīnu receptoru, kas ir saistīts ar RANTES β -hemokīniem (RANTES), monocītu hemoatraktanta proteīns 1 (MCP-1), un makrofāgu iekaisuma proteīni 1α un 1β (MIP- 1α un MIP- 1β) inducē HHV-6 U12 produkta signāla transdukcijas atbildes, kuras tiek mērītas ar Ca^{2+} jonu plūsmu. U12 receptors spēja veikt hemokīnu signālu transdukciju no ELC/MIP- 3β uz citoplazmu, kā rezultātā pieauga intracelulāro Ca^{2+} jonu koncentrācija. Tā signāla transdukcijas atbilde bija līdzīga EBI1/CCR7. ELC/MIP- 3β tiek ekspresēts dažādos limfoīdajos audos, tajā skaitā aizkrūtes dziedzerī, limfmezglos, resnās zarnas piedēklī un liesā. ELC/MIP- 3β ir U12 bioloģiskais ligands ar specifiski augstu afinitāti. Pētījumos ir nozīmīgi pierādījumi tam, ka vīrusa inficētās šūnas atbild uz ELC/MIP- 3β caur U12, un iegūtie rezultāti liecina par iespējumu šī signālreceptora lomu patoģenēzē (Nakano K. et al. 2003).

1.5. HHV-6 infekcijas veidi

Tāpat kā pārējiem herpesvīrusiem, arī trīs herpesvīrusiem no β apakšdzimtas, ir spēja palikt saimnieka organismā latentā vai persistejošā stāvoklī pēc primārās infekcijas visu tā dzīves laiku un atkāroti aktivēties dažādu ārējo faktoru dēļ (pēc orgānu vai hematopoētisko cilmes šūnu transplantācijas, ilgstoša stresa apstākļu gadījumā, intensīvas imunosupresantu terapijas dēļ, vai personām, kas ir inficētas ar HIV) (Razonable R., Paya C. 2003).

Gan HHV-6A, gan B infekcijas tiek detektētas pēc-transplantācijas periodā. Biežāk tiek atrasts HHV-6B, tomēr pētījumā, kurā noteica vīrusa klātbūtni pacientiem pēc sarkanajā kaula smadzeņu transplantācijas - plazmā, bet ne perifēro asiņu mononukleārajās šūnās tika atrastss HHV-6A DNS (Nitsche et al. 2001).

1.5.1. Primāra infekcija

Primārā infekcija norisinās agri bērnībā un izpaužas kā ekzantēma jeb trīsdienu drudzis (*roseola infantum, exanthema subitum*) (R. R. Razonable, 2013).

Pēc veiktajiem seroloģisko testu rezultātiem, cilvēka herpesvīruss 6B (HHV-6B) inficē >90% visas pasaules bērnu līdz 2 gadu vecumam. Trīsdienu drudzis ir visizpaltītākā ar HHV-6B saistītā infekcija, kura izpaužas pēc primāras infekcijas 6 mēnešus līdz 3 gadus veciem bērniem. Daudz retāk vīruss var izraisīt lēkmes, gastrointestinālus un respiratorus simptomus, trombocitopēniju, hepatītu, kolītu un CNS infekcijas (Greninger A. L. et al. 2018.)

Primāra HHV-6 infekcija var izpausties bez simptomiem vai ar 3-5 dienas ilgstošu febrilu temperatūru, kurai pazeminoties parādās izsitumi, diareja, respiratori traucējumi vai lēkmes (R. R. Razonable, 2013). Ziemeļamerikā tika veikts apjomīgs pētījums, kur lielākajai daļai bērnu HHV-6 infekcijas simptomi izpaudās 6-9 mēnešu vecumā. Visbiežākie no novērotajiem simptomiem bija augsta temperatūra (vidēji 39.6°C) bungādiņu memberānu iekaisums un nervozitāte. Tikai 20% pacientu varēja novērot roseolai raksturīgos izsitumus (Strausbaugh L. J. et al. 2001).

Veseliem pieaugušajiem primārā infekcija tiek asociēta ar heterofilo antivielu-negatīvu infekciozai mononukleozei līdzīgu slimību un hepatītu (Clark D. A. et Griffiths P. D. 2003).

1.5.2. Persistenta infekcija

Persistentā infekcijā vīrusa darbība netiek pilnībā pārtraukta, tas turpina uzturēties inficētu saimniekorganismu šūnās un audos. Persistentas infekcijas var būt gan asimptomātiskas, gan produktīvas, neiznīcinot, vai par nenodarot lielus bojājumus saimnieka organisma šūnām. Pēc primārās infekcijas seko persistence, kas ilgst visu mūžu, kad perifēro asiņu mononukleārajās šūnās, siekalu dziedzeros un CNS var noteikt virālo DNS (Bolle L. et al. 2005). HHV-6 DNS ir atrasts arī bērnu cerebrospinalajā šķidrumā - gan primārās infekcijas laikā, gan pēc tās (Strausbaugh L. J. et al. 2001).

Kā HHV-6 persistences vieta ir minētas arī mandeles, kurās pārsvarā tika detektēts HHV-6B vīruss (Roush et al. 2001).

1.5.3. Latenta infekcija

Tāpat kā citi herpesvīrusi, HHV-6 uzturas saimnieka organismā neierobežoti ilgu laiku un ir spējīgs reaktivēties, kas raksturojas ar spēju noteikt aktīvus, nobriedušus virionus dažādās organisma vietās. Izšķir īstu latentu stāvokli (nenotiek jaunu vīrusu replikācija) vai zema līmeņa hronisku replikāciju, kamēr citās šūnās tas inducē pilnīgu lītisku infekciju (Bodin C. et al. 2014). Par latentas infekcijas norises vietām tiek uzskatīti monocīti, limfocīti un polipotentās sarkano kaulu smadzeņu cilmes šūnas. Neliels daudzums HHV-6 DNS tiek atrasts arī perifēro asiņu monocītos veselos indivīdos (Bolle L. et al. 2005) un astrocitomas šūnu līnijās in vitro (Yoshikawa T. et al. 2002).

Vīrusa gēns U94, kas tiek ekspresēts latentas infekcijas laikā, tiek uzskatīts par vienu no svarīgākajiem latentas infekcijas uzturēšanā (Bolle L. et al. 2005).

1.5.4. Aktīva infekcija

Vīrusa reaktivācija visbiežāk norisinās asimptomātiski, izņemot gadījumos, kad inficētam indivīdam tiek nomākta imunitāte, piemēram asinsrades cilmes šūnu transplantācijas gadījumā (Bodin C. et al. 2014).

Reaktivācija notiek caur IE gēnu transkripciju IE1 un IE2 rajonos, kurai seko celulāru/ virālu faktoru transaktivācijas efekts. Šis reaktivācijas process rezultējas ar replikācijas cikla inducēšanu un iespējamu citopātiskā efekta parādību (Agut H. et al. 2015). Akūta HHV-6 infekcija bieži sākas arī pacientiem pēc aknu transplantācijas, un izpaužas kā ar HHV-6 asociētā akūtā fulminantā aknu mazspēja (Lea J., Ganttb S., 2013).

1.6. HHV-6 ietekme uz imūnsistēmu

1.6.1. Imūnatbilde pēc primārās infekcijas

Gan HHV-6A, gan 6B spēj vai nu produktīvi vai neproduktīvi inficēt vairākus imūno šūnu tipus. Primārais HHV-6 mērķis, lai tas spētu replicēties, ir CD4+ T limfocīti, kas atbild par specifisko citotoksisko imunitāti. HHV-6A, bet ne B, replicējas arī dažādās citotoksiskās efektoršūnās, kā, piemēram, CD8+ T šūnās, gamma/delta T šūnās un NK šūnās. Makrofāgos un dendrītiskajās šūnās, kas ir antigēnu prezentējošās šūnas, HHV-6 infekcija parasti ir neproduktīva, tomēr tā izraisa

ievērojamus funkcionālos bojājumus, piemēram, selektīvo IL-12 supresiju, kas ir svarīgs Th1-polarizēto antivirālo imūno atbilžu citokīns. Šis un citi imunomodulātori efekti šķiet medītēti saistoties ar primāro HHV-6 receptoru- CD46. Turklāt, HHV-6 infekcija izraisa vispārēju CD46 ekspresijas apturēšanu limfātiskajos audos, kas izraisa autologa komplementa aktivāciju. Papildus HHV-6 imunomodulācijas mehānismi ietver arī šūnu virsmas receptoru ekspresijas izmainīšanu un citokīnu/hemokīnu producēšanu. HHV-6 spēj modulēt arī inducējošas atbildes caur citokīnu un hemokīnu receptoru virāli kodētu homologu ekspresiju. Regulējot specifiskās antivirālās imūnatbildes reakcijas, HHV-6 spēj veicināt savu izplatību un persistenci in vivo, kā arī pastiprināt citu aģentu patogēnos efektus, kā piemēram cilvēka imūndeficīta vīrusa (HIV) (Lusso P. 2006).

Inficētajās T šūnās vīruss veic hemokīnu receptora CCR7 augšupregulāciju (Yoshida et al. 1997.) un lejupregulē CXCR4 ekspresiju, ko medītē proteīns YY1, kurš ir CXCR4 represora promoteris (Hasegawa et al. 2001). Inficētajās dendrītiskajās šūnās HHV-6A lejupregulē galvenā audu saderības kompleksa (MHC) I klases molekulas, kas liecina par potenciālu izvairīšanās stratēģiju no imūnās sistēmas (Hirata et al. 2001).

1.7. Klīniskās izpausmes

1.7.1. Ar HHV-6 asociētās slimības

Pētījumā par HHV-6 reaktivēšanās izraisītu aknu bojājumu pie HHV-6 asociētām slimībām tiek minēts hronisks noguruma sindroms, miokardīts un zāļu izraisīts hipersensivitātes sindroms, kādā dēvē HHV-6 reaktivācijas izraisītu aknu bojājumu (Fujita et al. 2015). Epšteina-Barra vīruss un HHV-6 tiek minēti kā iespējamie vides riska faktori kognitīviem traucējumiem un Alzheimeras slimības progresēšanai gados vecākiem cilvēkiem (Carbone et al. 2014). Pacientiem ar anterogrādo amnēziju, kuriem tika veikta hematopoētisko cilmes šūnu transplantācija, ir novērota atkārtota HHV-6 infekcija, kas ir asociēta ar limbisko encefalītu (Gorniak et al. 2006). Kolīta izveidošanās gadījums, kas tiek saistīts ar HHV-6B reaktivāciju, tika novērots pacientam pēc plaušu transplantācijas (Lamoth et al. 2008). Gados jaunākiem pacientiem, kuriem ir Hodžkina limfoma ar nodulāro sklerozi, HHV-6 ir

atrasts malignās Rīda-Šternberga šūnās, un tiek saistīts ar lomu šīs slimības patogēnēzē (Siddon et al. 2012).

1.7.2. Ar HHV-6 asociētās autoimūnās slimības

HHV-6 ir eksperimentāli asociēts ar vairākiem autoimūniem iekaisuma procesiem, tajā skaitā Hašimoto tireoidītu, Sjogrena sindromu, multiplo sklerozi, reimatoīdo artrītu un sistēmas sarkano vilkēdi. Nesenos pētījumos minēta HHV-6 infekcijas saistība tādu autoimūno slimību izraisīšanā, kā purpura fulminans, autoimūnās saistaudu slimības, smags autoimūnais hepatīts (Caselli et al. 2012). Yagasaki H. et al. 2010. gada pētījumā HHV-6 ir minēts arī kā iespējamais autoimūnās hemolītiskās anēmijas un autoimūnās neitropēnijas izraisītājs. Principi N. et al 2017. gada pētījumā detektēja HHV-6B 1.tipa diabēta pacientiem.

1.8. Ar vairogdziedzeri asociētās autoimūnās slimības

Autoimūnām vairogdziedzera slimībām (AITD) ir divi galvenie izpausmes veidi: Greivsa slimība (GD) un Hašimoto tireoidīts (HT), kuras abos gadījumos izpaužas ar limfocitāru infiltrāciju vairogdziedzera parenhīmā (Antonelli A. et al. 2015). Tās izpaužas kā vairogdziedzera disfunkcijas un neendēmisks kākslis, kuru etioloģija ir apkārtējās vides un ģenētiskie faktori, kuri raksturojas ar atšķirīgām iekaisuma vai autoimūnām slimībām. Galvenie vides faktori ietver jodu, medikamentus, infekcijas, smēķēšanu, stresu un ģenētisku predispozīciju uz AITD. Pirmās patoloģiskās AIT pazīmes aprakstīja 1912. gadā, kad pacientiem ar kāksli histoloģiskajā vairogdziedzeru audu preparātu izmeklējumā uzrādījās limfocitāra infiltrācija, folikulāro šūnu atrofija, granulāro tirocītu klātbūtne (onkocītiskās jeb Hurtle šūnas) un fibroze. (Iddah M., Macharia B., 2013).

1.8.1. Hronisks autoimūns tireoidīts

Autoimūnais tireoidīts ir orgānspecifiska autoimūna slimība, kuru pirmo reizi 1912. gadā aprakstīja Hakaru Hashimotoa. Tas ir visbiežākais hipotireoīdisma cēlonis valstīs, kurās ir pietiekams joda daudzums uzturā.

Ir identificēti vairāki autoimūnā tireoidīta varianti: klasiskā forma, fibrozais variants, IgG4 variants, juvenīlā forma, Hašimoto toksikoze un sporādiskais vai

pēcdzemdību tireoidīts. Tas var izpausties arī kā eitiroīds vai pat hipertiroīds stāvoklis ar vai bez kākšļa (Ranganathan R. et al. 2015).

Klasiskā hroniska autoimūnā tireoidīta forma jeb Hašimoto tireoidīts ir galvenais hipotireozes iemesls, un tā biežums palielinās. Saslimstība ar hronisku autoimūno tireoidītu dažādās populācijās ir 0,3 – 5 saslimšanas gadījumi uz 1000 cilvēkiem gadā. Sievietēm hronisku autoimūnu tireoidītu novēro 15-20 reizes biežāk kā vīriešiem. Hronisks autoimūns tireoidīts asociējas ar izmaiņām T un B limfocītos. Šī tireoidīta gadījumā 95% pacientu konstatē av- TPO un av-TG titru paaugstināšanos, kas ir hroniska autoimūna tireoidīta diagnostiskie marķieri, reizēm vienlaicīgi var konstatēt arī citas autoimūnas slimības (sarkano vilkēdi, reimatoīdo artrītu, sklerodermiju, Šegrena sindromu, autoimūnu virsnieru mazspēju, B₁₂ vitamīna deficīta anēmiju, *vitiligo*, 1.tipa cukura diabētu u.c.). Hroniska autoimūna tireoidīta pacientiem vairogdziedzeris palpatori ir nedaudz palielināts, pablīvs, nelīdzens, neregulārām kontūrām. Ultrasonogrāfijā konstatē autoimūna tireoidītam raksturīgās izmaiņas. Vairogdziedzera biopsijā konstatē limfocitāru infiltrāciju. Tas var noritēt arī ar normālu vairogdziedzera hormonu līmeni asinīs, bet ar pakāpenisku pāreju subklīniskā hipotireozē, vai vēlāk daudzu gadu laikā manifestējas ar klīniski izteiktu hipotireozi. 15-20% pacientu ar hronisku autoimūnu tireoidītu konstatē paaugstinātu TSH receptoru bloķējošo antivielu titru (Pirags V. et al. 2002).

Hašimoto tireoidīta fibrozā forma ir reti sastopama. Tā galvenokārt skar pusmūža vecuma cilvēkus un izpaužas 10% HT pacientiem. Tai ir raksturīga plaša fibroza proliferācija bez izplatības apkārt esošajos audos (Iannaci G. et al. 2013).

Ar IgG4 saistītais HT ir jauns apakštīps, kuru raksturo vairogdziedzera iekaisums, kurā ir daudz IgG4 pozitīvas plazmas šūnas un ierobežota fibroze, kas skar tikai vairogdziedzera kapsulu un limfoplazmatisko infiltrāciju (Luiz H.V. et al. 2014).

Hašimoto toksikoze ir pārejoša hipertireozes fāze. Tā ir tireotoksikozes/ hipertireoidisma kombinācija. Tā ir sevis ierobežojoša un ilgst no pāris nedēļām līdz pāris mēnešiem (Unnikrishnan G. 2013).

Juvenīlais HT visbiežāk skar bērnus pubertātes vecumā, un sieviešu- vīriešu saslimstība ir 2:1. Bērnus jaunākus par 3 gadiem šī slimība skar reti (Cappa M. et al. 2011).

Sporādiskais HT ir klīniski un patoloģiski līdzīgs pēcdzemdību HT un atšķiras tikai ar to, ka nenorisinās grūtniecības laikā. Raksturīga limfocitāra infiltrācija bez fibrozes. Pēcdzemdību HT skar aptuveni 5-7% sievietes pēc dzemdībām. Aptuveni pusei no šīm pacientēm anamnēzē ir autoimūna vairogdziedzera slimība. Vairumam pacientu šī forma izpaužas kā nesāpīgs, mazs, ciets kākslis laika posmā no 2-6 mēnešiem pēc dzemdībām. Gandrīz pusi (43%) no pacientēm pirms atlabšanas fāzes skar hipotireoīdisms (Bindra A. et al. 2006).

1.8.2. Greivsa slimība

Greivsa slimība ir biežāk sastopamais hipertireozes cēlonis. To biežāk novēro 30-50 gadus veciem pacientiem. Sievietes slimo 5-8 reizes biežāk kā vīrieši. Ir pierādīta HLA DR3 un DR2 gēnu predisponējošā ietekme slimības izcelsmē. IgG klases autoantiviēlas pret TSH receptoru stimulē vairogdziedzera hormonu hipersekrēciju vairogdziedzera folikulārā epitēlija šūnās un vairogdziedzera hipertrofiju. Šīs autoantiviēlas ir atrodamas Greivsa slimības pacientu asins sērūmā. Periorbitālajos taukaudos, ekstraokulārajos muskuļos un zemādas saistaudos lokalizētie olbaltumi ar TSH receptora olbaltumam līdzīgu struktūru piesaista IgG klases autoantiviēlas un rezultātā veidojas autoimūns iekaisums. Autoimūnu orbitopātiju novēro apmēram 50% slimniekiem ar Greivsa slimību. Orbitopātija un/vai dermopātija var manifestēties vēl pirms hipertireozes. Smēķētājiem ar GS orbitopātija novērota biežāk un tai ir smagāka norise. Autoimūnais mehānisms GS piešķir recidivējošas slimības gaitu un recidīvi var manifestēties pat pēc desmitiem gadu (Pirags V. et al. 2002).

Hipertireozes klīniskās pazīmes visbiežāk parādās pakāpeniski un vairāku mēnešu laikā. Biežāk sastopamās ir: nogurums, siltuma nepanesība, svara zudums, nervozitāte, miega traucējumi, termors, muskuļu vājums, aizdusa, sirdsklauves, tahikardija un tahiartimija, biežāka vēdera izeja un mēnešreižu traucējumi (*hypomenorrhea*).

Autoimūnā orbitopātija ir acs orbītas slimība, kas asociēta ar Greivsa slimību (autoimūno hipertireozi) un manifestējas ar tūsku autoimūna iekaisuma un hidrofilo glikozoaminoglikānu uzkrāšanās rezultātā retroorbitālajos saistaudos un ekstraokulārajos grozītājmuskuļos (Pirags V. et al. 2002).

Retāk sastopama ir **tiroīda dermatopātija**, kas parasti skar ādas zonu zem un uz apakšstilba. Dermopātija gandrīz vienmēr ir saistīta ar oftalmopātiju un, smagos gadījumos, ar akropātiju (Fatourechi 2012).

1.9. HHV-6 diagnostika un ārstēšana

1.9.1. HHV-6 diagnostika

Polimerāzes ķēdes reakcija ar specifiskiem praimeriem var precīzi identificēt un atšķirt HHV-6A un HHV-6B. Ar reversās transkripcijas qPCR var noteikt, vai šie vīrusi aktīvi replicējas (aktīva infekcija). Ar kvantitatīvo Real-time PCR var visefektīvāk noteikt, vai pacients ir inficēts ar vīrusu un, vai ir notikusi tā reaktivācija (Hill J. et al. 2014). Komerciālais ELISA tests nosaka anti-HHV-6 imūnglobulīna G antivielu klātbūtni.

2017. gadā tika veikts pētījums par HHV-6A infekcijas iespējamo lomu miRNS disregulācijā, kas tiek novērota pacientiem ar AIT. Izmantojot 84 miRNS paneļa noteikšanas testu, kas tiek specifiski saistīti ar iekaisumu un autoimunitāti, secināja, ka HHV-6A infekcija, bet ne -6B vai HHV-7 infekcijas, ierosināja miR-155_2 ekspresijas samazināšanos un miR-1238 ekspresijas pieaugumu tirocītos, kā arī ekspresijas pieaugumu vairākos ar autoimunitāti asociētos miRNS limfocītos (Caselli E. et al. 2017).

1.9.2. HHV-6 ārstēšana

Tā kā vakcīna pret HHV-6 nav izstrādāta, pašreiz HHV-6 terapijā izmanto nukleozīdu analogu ganciklovīru (GCV) vai lietošanai per os-valganciklovīru (ValGCV), vai pirofosfātu analogu foskarnetu, tomēr šīm zālēm ir ļoti toksisks efekts, un ne vienmēr tās ir efektīvas pret HHV-6, jo tās ir izstrādātas pret citām virālām infekcijām.

Akūtas HHV-6 infekcijas sastāda 20% no neatliekamās palīdzības izsaukumiem 6-8 mēnešus veciem bērniem augstas temperatūras dēļ. 13% gadījumu šie bērni tika hospitalizēti. Šie dati uzrāda to, ka HHV-6 ir ekonomisks nozīmīgums, kā arī netiek uzsvērts tas, ka šim vīrusam visbiežāk netiek veikta pareiza

diferenciāldiagnostika, kas varētu palīdzēt izvairīties no liekas antibiotiku kā terapijas nozīmēšanas pacientiem (Strausbaugh L. J. et al. 2001).

Imūnterapijas, kas ir balstītas uz antivielām, T-šūnu subpopulācijām vai vakcīnām, varētu potenciāli nodrošināt alternatīvu vai papildus terapiju kā pieeju HHV-6 infekcijas kontrolei. Pamatzināšanu trūkums par organisma imūnās atbildes mehānismu pret HHV-6 ir aizkavējis HHV-6 specifisku imūnterapiju attīstību. Turklāt, līdz nesenam atklājumam, HHV-6A un HHV-6B ir tikuši ārstēti kā viena kopīga suga, tomēr starp tiem ir atšķirības gan genomu struktūrā, gan ierosinātajā imūnās atbildes mehānismā (Becerra A. et al. 2014).

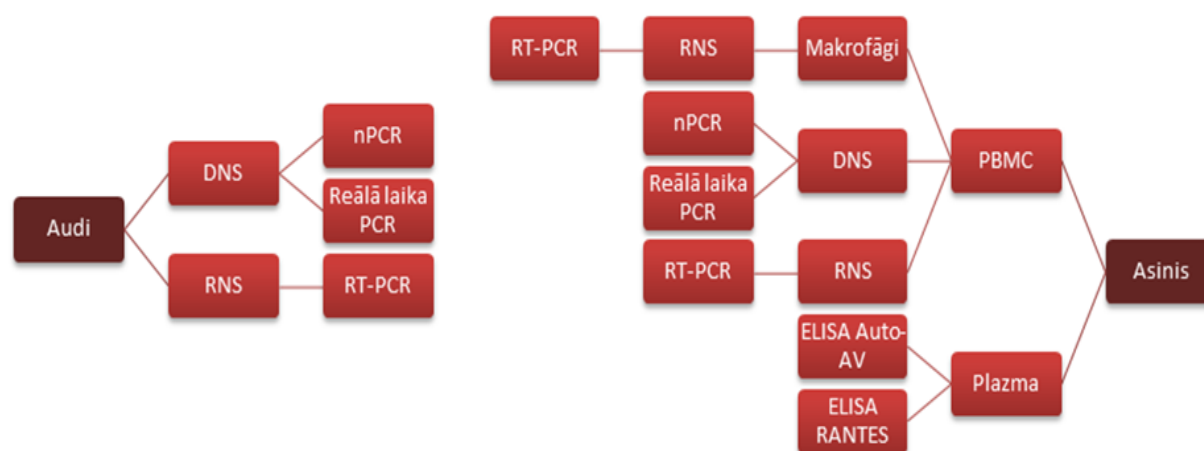
Klīniskajā pētījumā pacienti pēc hematopoētisko cilmes šūnu transplantācijas tika ārstēti ar artesunātu (ART), kas parasti tiek lietots kā zāles pret malāriju. Tas būtiski samazināja vīrusu slodzi un norādīja uz to, ka ART inhibē CMV un pacienti var tikt veiksmīgi izārstēti ar ART, kas inhibē vairākus herpesvīrusu paveidus, tajā skaitā CMV, HSV-1, EBV un ir daudzsološas zāles arī pret HHV-6, jo tam piemīt augsta biopieejamība un minimāli blakus efekti (Milbradt J. 2009).

2. METODEDES UN MATERIĀLI

2.1. Pacienti

Pētījumā tika iekļauti 60 pacienti ar autoimūno tireoidītu (57 (95%) sievietes un 3 (5%) vīrieši, vecuma mediāna 52 IQR: 42-59), kuriem tika veikta tireoīdektomija (*Thyreoidectomy totalis*). AIT diagnozi apstiprināja, veicot autoantivielu testus pret tireoglobulīnu (TG), tireoperoksidāzi (TPO) un TSH receptoriem, izmantojot ELISA reaģentu komplektus pēc ražotāja protokola (EUROIMMUN, Germany). Kā kontroles grupa - 30 autopsiju paraugi no 26 (87%) sievietēm un 4 (13%) vīriešiem (vecuma mediāna 58.50 IQR 51-67) bez raksturīgajām AIT pazīmēm vairogdziedzeru histoloģiskajos izmeklējumos, un 30 praktiski veseli asins donori (25 (83%) sievietes un 5 (17%) vīrieši, vecuma mediāna 33 IQR 27-44).

Atļauja pētījuma veikšanai tika saņemta no Rīgas Stradiņa universitātes (RSU) Ētikas komitejas un visi pētījuma dalībnieki deva rakstveida piekrišanu izmeklējumiem. Paraugi pētījumam saņemti no Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas.



5. attēls. Asins un vairogdziedzeru paraugu analizēšanas shēma.

Figure 5. Whole blood and thyroid tissue analysis scheme.

2.2. Paraugu sagatavošana

Iegūtās perifērās asinis atšķaidīja 2 reizes ar PBS buferi un akurāti uzslāņoja uz fikola gradienta attiecībā 2:1 ($q=1,077\pm 0,001$; Eurobio, Francija). Uzslāņotās asinis centrifugēja pie 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 PBS buferī pie -70°C .

Perifērās asinis ielēja trīs stobriņos pa 0,5 ml. Pārējo asins paraugu centrifugēja 15 minūtes 1400 apg./min, lai iegūtu plazmu. Pēc centrifugēšanas augšējā slāni nostājās plazma, kuru pārnesa tiros stobriņos, kurus centrifugēja 3000 apg./min 10 minūtes. Pēc tam plazmu pārlēja uz tīriem stobriņiem un centrifugēja 9000 apg./min, 10 minūtes. Pārnesa plazmu tiros stobriņos pa 200 μl katrā. Rezultātā tika iegūta plazma, kas ir brīva no šūnām. Visus paraugus lika uzglabāties -70°C līdz DNS izdalīšanai.

2.3. Makrofāgu šūnu izolēšana no perifēro asiņu mononukleārajām šūnām

Lai kultivētu monocītus/makrofāgus no perifēro asiņu mononukleārajām šūnām, tika izmantota gatava audu kultūras barotne (AKB), ieskaitot RPMI-1640 (Gibco, Vācija), papildināta ar 10% cilvēka AB serumu, $2,5\times 10^{-5}\text{ M}$ 2ME, 2 mM L-glutamīnu (Sigma Chemical Co, Minhene, Vācija), 100 U/ml penicilīnu, un 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomīnu (Sigma Chemical Co, Minhene, Vācija).

Monocīti no PBMC tika izolēti ar monocītu adherences metodi, $10\text{-}15\times 10^6$ PBMC tika izsētas uz T25 šūnu kultūru matrača un tiem ļāva adherēties 5% CO_2 inkubātorā 37°C 2 stundas 5 ml AKB. Pielīpušās šūnas tika 2x uzmanīgi mazgātas ar AKB. Pēc tam šūnas tika inkubētas līdz 48 stundām lai samazinātu limfocītu kontamināciju.

2.4. DNS izdalīšana no asinīm un audiem

Pie 0,5 ml asinīm (paraugs) pievienoja 1ml lizējošo buferi (100mM Tris HCl (pH 7.6); 5mM MgCl_2 ; 100mM NaCl), kas veicināja šūnu noārdīšanu. Lai šūnas nogulsnētos, paraugus samaisīja un centrifugēja (10000 apgr./min. 3 minūtes). Iegūto supernatantu noņēma un pie nogulsnētām šūnām pievienoja 1ml 3x destilētu ūdeni, lai tās atmazgātu. Paraugus samaisīja un centrifugēja (10000 apgr./min. 3 minūtes). Iegūto supernatantu noņēma un gan nogulsnēm, gan vairogdziedzera audu paraugiem

pievienoja 80 µl proteināzes K buferi (100mM Tris HCl (pH 8.0); 50mM EDTA (pH 8.0)) proteīnu šķelšanai. Asins paraugiem pievienoja 20 µl, audu paraugiem 30 µl 20% SDS (nātrija dodecilsulfāu), kas šķeļ leikocītu membrānas. Tad asins paraugiem pievienoja 15 µl, audu paraugiem 20 µl proteināzi K un 3x destilētu ūdeni līdz 0,5 ml atzīmei. Paraugus samaisīja un atstāja inkubēties četras stundas 55°C temperatūrā. DNS tika izdalīts, izmantojot fenola-hloroforma metodi. Pēc inkubācijas paraugiem pievienoja 0,5 ml fenola. Paraugu maisīja 10 minūtes un centrifugēja (10000 apgr./min. 10 minūtes), lai ekstrahētu DNS. Noņēma supernatantu un pārvietoja to tīrā stobriņā. Katram paraugam pievienoja 250 µl fenola un 250 µl hloroforma, maisīja tos 10 minūtes un tad centrifugēja (10000 apgr./min. 10 minūtes). Iegūto supernatantu pārvietoja uz tīru stobriņu un pievienoja 500 µl hloroforma, paraugu maisīja 10 minūtes un centrifugēja (10000 apgr./min. 10 minūtes). Iegūto supernatantu pārvietoja uz tīru stobriņu un paraugam, lai nogulsnētu DNS, pievienoja 1 ml 96% etanola un viegli samaisīja. Paraugus centrifugēja 14000 apgr./min 15 minūtes +4°C. Etanolu nolēja un nogulsnēm pievienoja 1 ml 70% etanola (atmazgāšanai) un centrifugēja 14000 apgr./min 15 minūtes +4° C. Izlēja etanolu no stobriņiem ar nogulsnēm un ļāva tiem nožūt. Izdalīto DNS šķīdināja ar 3x destilētu ūdeni. Destilēto ūdeni pievienoja atkarībā no DNS daudzuma (10-60 µl).

2.4.1. DNS un RNS koncentrācijas noteikšana

Izdalītās DNS un RNS koncentrāciju noteica ar NanoDrop 1000 spektrofotometru. Nukleīnskābes koncentrācijas noteikšanai izmantoja ND 1000 programmu. Saskaņā ar ražotāja instrukciju sistēmas kalibrēšanai lietoja 2 µl 3x destilēta ūdens mērījumu, ko atkārtoja ik pēc pieciem mērījumiem. DNS un RNS koncentrācijas mērīšanai sistēmu iestatīja uz 260 nm viļņa garumu. Koncentrācijas noteikšanai ņēma 2 µl DNS parauga. Iegūtie rezultāti tika izteikti kā ng/µl – nanograms uz mikrolitru.

2.4.2. DNS kvalitātes pārbaude

Asins un audu paraugu DNS kvalitāti noteica pārbaudot β-globīna gēnu PCR ar atbilstošiem praimeriem (Vandamme et al. 1995). DNS uzskatīja par kvalitatīvu, ja PCR produkta lielums 200 bp.

Reakcijas maisījuma pagatavošana vienam paraugam:

Reaģenti	Tilpums 25 µl	Koncentrācija
PCR buferis	2.5	10x
MgCl ₂	2.0	25mM
dNTP	0.5	10mM
Praimeris GS268	0.1	25nmol
Praimeris GS269	0.1	25nmol
Taq polimerāze	0.1	5U/ µl
3x destilēts ūdens	17.7	

Praimeru secība:

GS 268 5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGC-3'

GS 269 5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG-3'

Reakcijas maisījumam pievienoja 2 µl DNS (konc. 1 µg/ µl) un lika termālajā amplifikatorā. Amplifikācijas programma: denaturācijas posms: 95°C 3 minūtes, nākamie 40 cikli- hibridizācijas posms: 95°C 3 minūtes, 55°C 30 sekundes, 72°C 45 sekundes, pēdējais elongācijas posms ilgst 7 minūtes 72°C.

Sagaidāmais PCR produkta izmērs bija 200 bp, ko noteica, izmantojot marķieri (pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23 (MBI Fermentas, Lietuva)), un rezultāti tika vizualizēti un analizēti 1,7% elektroforēzes gēlā.

2.5. HHV-6 genoma secības klātbūtnes noteikšana

HHV-6 genoma klātbūtni asinīs un vairogdziedzera audos noteica ar nested-PCR (nPCR) metodi saskaņā ar Bandobashi K. et al. 1997. Katrā eksperimentā tika lietota pozitīvā kontrole Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, MD, USA vīrusa genoma DNS un negatīvā kontrole no HHV-6 negatīva asins donora.

Praimeru secība I ciklam:

HV61 5'-GCG-TTT-TCA-GTG-TGT-AGT-TCG-GCA-G-3'

HV62 5'-TGG-CCG-CAT-TCG-TAC-AGA-TAC-GGA-GG-3'

II ciklam:

HV63 5'-GCT-AGA-ACG-TAT-TTG-CTG-CAG-AAC-G-3'

HV64 5'-ATC-CGA-AAC-AAC-TGT-CTG-ACT-GGC-A-3'

1.cikls 50 µl		2.cikls 25 µl		
Reaktīvi	50 µl	Reaktīvi	25 µl	Konc.
PCR buferis	5.0	PCR buferis	2.5	10x
MgCl ₂	3.0	MgCl ₂ (25 mM)	1.5	(25 mM)
dNTP	1.0	dNTP (10 mM)	0.5	(10 mM)
Praimeris HV61	0,2	Praimeris HV63 (100 µM)	0.1	(100 µM)
Praimeris HV62	2.0	Praimeris HV64 (100 µM)	0.1	(100 µM)
Taq polimerāze	2.0	Taq polimerāze (5U/µl)	0.1	(5U/µl)
3x destilēts H ₂ O	30,4	3x destilēts ūdens	15.	2

2.6. HHV-6 genoma tipēšana

HHV-6 vīrusa veidu noteica paraugos, kuros konstatēta HHV-6 genoma klātbūtne ar nPCR. Vīrusu genoma tipēšana veikta saskaņā ar Lyall E.G., Cubie H.A. 1995. Izmantots pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23 marķieris (MBI Fermantas, Lietuva).

PCR maisījums vienam paraugam:

Reaktīvi	1.cikls 50 µl	Reaktīvi	2.cikls 25 µl	Konc.
	50 µl		25 µl	
PCR buferis	5.0	PCR buferis	2.5	10x
MgCl ₂	3.0	MgCl ₂	1.5	(25 mM)
dNTP	1.0	dNTP	0.5	(10 mM)
Praimeris HV661	0,2	Praimeris HV663	0.1	(100 µM)
Praimeris HV662	0.2	Praimeris HV664	0.1	(100 µM)
Taq polimerāze	0.2	Taq polimerāze	0.1	(5U/µl)
3x destilēts H ₂ O	30,4	3x destilēt ūdens	15.	2

Praimeru secība I ciklam:

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

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

II ciklam:

663: 5'-CTG-GGC-GGC-CCT-AAT-AAC-TT-3'

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

Amplifikācijas programma I ciklam: 95⁰C 4 min; 30 cikli : (4⁰C 1 min, 50⁰C 1 min, 72⁰C 1 min); 72⁰C 10 min.

Amplifikācijas programma II ciklam: 95°C 4 min; 30 cikli (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min); 72°C 10 min.

Rezultāti tika vizualizēti un analizēti 1,7% elektroforēzes gēlā. PCR sagaidāmais produktu izmērs HHV-6A vīrusam 195 bp un HHV-6B 423 bp, ko noteica ar marķieri pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23 (MBI Fermantas, Lietuva).

2.7. RNS izdalīšana no asinīm un audiem

Aodus un asinis homogenizēja, pievienojot līdz 1 ml TRI Reagent maisījumu. Samaisīja. Inkubēja istabas temperatūrā 5 minūtes. Centrifugēja 12.000 xg 10 min 4°C. Noņēma supernatantu jaunā stobriņā. Tur pievienoja 200µl hloroformu, samaisīja un inkubēja istabas temperatūrā 15 minūtes. Centrifugēja 12.000 xg 15 min 4°C. Noņēma supernatantu un ievietoja to jaunā stobriņā. Pievienoja tam 500µl izopropanolu, samaisīja 5-10s, un inkubēja 10 min istabas temperatūrā. Centrifugēja 12.000 xg 8 min 4°C. Nolēja supernatantu, lai stobriņā paliktu nogulsnes un pievienoja 1 ml 75% etanolu. Centrifugēja 7.500 xg 15 min 4°C. Nolēja etanolu un žāvēja gaisā 5 min. Pievienoja katrā stobriņā 30µl DEPC ūdeni, samaisīja ar pipeti. No paraugiem paņēma 4µl RNS koncentrācijas pārbaudei, izmantojot NanoDrop 1000 spektrofotometru.

2.8. Komplementārās DNS sintēze

Ependorfa stobriņā uz ledus pievienoja sekojošus reaģentus (kopējais maisījuma tilpums: 20 µl) : 2µl DEPC ūdeni, 10µl 2x qPCR One Step Mix SyGreen, 2µl 20x RTāzi un 6µl izdalītā RNS, samaisīja, lika termālajā amplifikātorā.

Amplifikācijas programma: reversā transkripcija: 42°C 60 min ar sekojošu posmu 70°C 5 min reakcijas apstādināšanai.

2.9. Elektroforēze agarozes gēlā

Agarozes gēlu pagatavoja no 1,7 agarozes pulvera un 100 ml 1xTEA bufera šķīduma (20 ml 50x TEA bufera šķīduma koncentrātam pievienoja līdz 1L 3x destilētu ūdeni). Agarozes gēlam pievienoja 5 µl etīdija bromīdu. Elektroforēzes aparātā ielēja 1x TEA buferi un ievietoja tajā gēla plati. 10 µl no produkta parauga iekrāsoja ar 1 µl 6x DNS Loading dye krāsu, samaisot ar pipeti, un uznesa to uz gēla plates. Paraugu rindas galā pievienoja marķieri pUC19 DNA/MspI (HpaII), (MBI Fermantas, Lietuva)

produktu garuma noteikšanai. Marķieri pagatavoja, ņemot 5µl marķiera, 5µl 6x DNS Loading Dye Solution krāsvielu un 20 µl 3x destilēta ūdens. Pēc elektroforēzes gelu novieto uz UV transiluminatora, kur var novērot iegūtos rezultātus.

2.10. ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay)

Pacientu paraugiem tika veikti ELISA- enzīmu imūnsorbcijas autoantivielu testi pret tireoglobulīnu (TG), tireoperoksidāzi (TPO) un TSH receptoriem, izmantojot ELISA reaģentu komplektus saskaņā ar ražotāju instrukciju (EUROIMMUN, Germany).

Lai noteiktu RANTES līmeni AIT pacientu un asins donoru plazmas paraugos, izmantoja Abcam RANTES Human ELISA kit (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) komerciālo reaģentu komplektu (ABCAM, UK) saskaņā ar ražotāju instrukciju.

2.11. HHV-6 slodzes noteikšana

HHV-6 pozitīvajiem paraugiem, ko noteica ar nPCR metodi, veica vīrusa slodzes noteikšanu, izmantojot komerciālo komplektu HHV-6 Real- TM Quant (Sacace Biotechnologies, Italy) saskaņā ar ražotāju instrukciju.

2.12. Imunohistoķīmija

Lai iegūtu viena veida šūnu suspensiju, tika veikta enzimatiska vairogdziedzeru audu dezintegrācija.

Mazi audu gabaliņi (~3 mm) tika ielikti 1ml PBS buferī ar 1mg/ml kolagenāzi A un 1% tripsīnu, un inkubēti 90 min 37⁰C (periodiski vorteksēti). Pēc inkubācijas šūnu suspensiju lika caur šūnu sietiņu (70 µm), lai atbrīvotos no lielākām daļiņām. Šūnas 2x mazgāja ar PBS. Sarkanās asins šūnas tika lizētas ar lizējošo buferi. Tam sekoja šūnu 2x mazgāšana ar PBS. Šūnu adhēziju uz priekšmetstikliņiem ieguva ar citocentrifūgēšanu (5min 2000rpm).

Tika izmantotas primārās un sekundārās antivielas, lai detektētu RANTES un HHV-6 gB proteīnu pēc protokola. Primārās antivielas:

- Kazas poliklonāla pret RANTES (izmantotā koncentrācija: 2µg/ml)
- Peles monoklonāla pret HHV-6 gB proteīnu (izmantotā koncentrācija 1:500)

Sekundārās antivielas:

AlexaFluor®488-konjugētā truša pret - peles (zaļa) 1:200;

AlexaFluor®647- konjugētā ēzeļa pret- kazas (red) 1:200;

Iekrāsots ar DAPI (zils); (1 µg/ml).

2.13. Izmantotie materiāli, reaģenti un iekārtas

Iekārtas un materiāli:

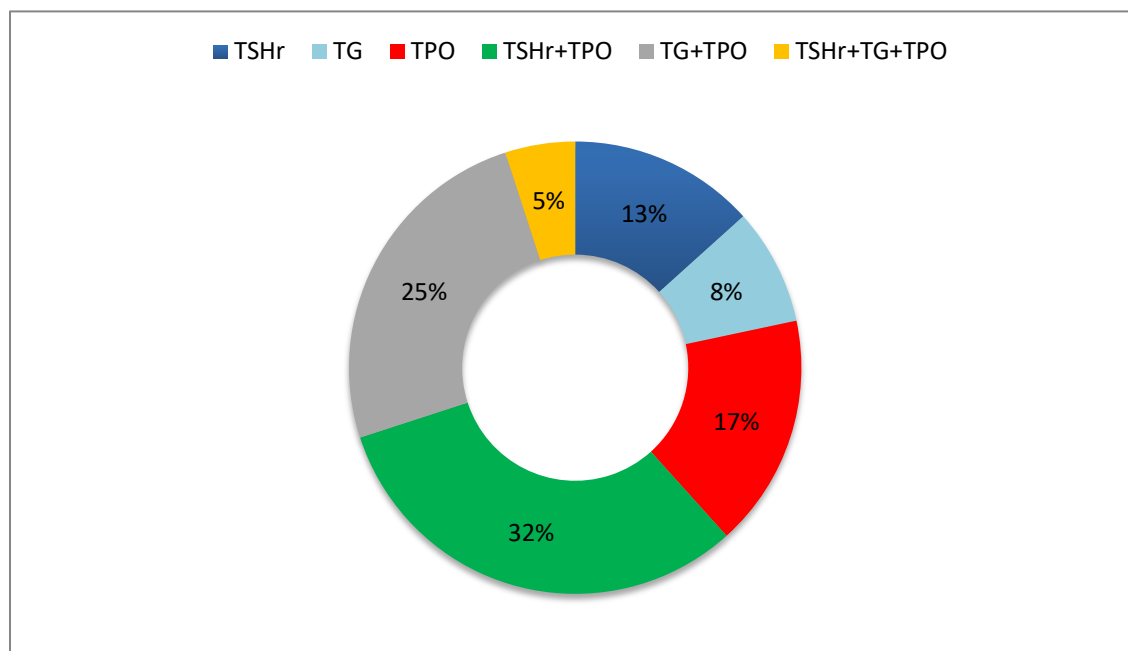
- Aukstuma centrifūga: Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Vācija.
- Centrifūga: Centrifūga: Mini Spin Eppendorf, Vācija.
- Centrifūga: Mikro 22r, Hettich, Vācija.
- Citocentrifūga CYTOPRO, ELITech, modelis 7621, ASV
- Elektroforēzes aparāts: Cambridge Protein analysis & DNA sequencing Electrophoresis, Lielbritānija.
- Konfokālais mikroskops: Nikon eclipse TI-SH-U, Japāna.
- Līdzstrāvas avots: Power Pack P25T ,Biometra, Vācija.
- Maisītājs: Bio Vortex V1, Biosan, Latvija.
- Mikroplašu ELISA fotometrs: Multiskan FC Microplate Photometer, Ascent, Thermo Scientific, Vācija.
- Mikroviļņu krāsns: Samsung selection, Dienvidkoreja.
- Mini- rotators: Bio RS-24 Mini- rotator, Biosan, Latvija.
- Reakciju stobriņi 0,5 ml, 1,5 ml un 2 ml, uzgaļi ar filtru, uzgaļi bez filtra.
- Reālā laika PCR detekcijas sistēma: CFX96 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cyclers, BIO RAD, ASV.
- Spektrofotometrs: NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, ASV.
- Stikla kolbas, šķēres, pincetes, marķieri, lateksa cimdi.
- Svari: KERN, PLJ 510 3M, Vācija.
- Termostats: Heratherm Compact Microbiological Incubator, Thermo Fisher Scientific, Vācija.
- Ultramikrotoms: Reichert-Jung, Austrija.
- UV transluminātors: Transilluminator TI2, Biometra, Vācija.

Reāģenti:

- Agarozē: D1 Agraosē, low EEO, Conda, Itālija.
- AlexaFluor®488-konjugētā truša pret - peles (zaļa) 1:200 (Abcam,UK)
- AlexaFluor®647- konjugētā ēzeļa pret- kazas (red) 1:200 (Abcam,UK)
- DAPI -4',6-diamidino-2-fenilindols (Sigma, Vācija)
- dNTP: (0,2 mM), Fermentas, Lietuva.
- Elektroforēzes marķieris: pUC19 DNA/Mslp (HpaI) Marker, 23.
- Elektroforēzes buferis: 50x TAE Electrophoresis buffer, Thermo Fisher Scientific, Vācija.
- Etanols: 96%, 70%
- Etīdija bromīds: 10 mg/ml, Sigma, Vācija.
- Fenols: Sigma, Vācija.
- HHV-6 Real-TM Qant Real-TM komplekts, Sacace Biotechnologies, Italy.
- Hloroforms: Sigma, Vācija.
- Izopropanols: Sigma, Vācija
- Kazas poliklonāla pret RANTES (Abcam,UK)
- Lizējošais buferis (0,5 ml 1M Tris HCl, 0,125 ml MgCl₂ (2M), 0,125 ml NaCl (4M), 3x destilēts ūdens līdz 50 ml).
- Loading Dye Solution: 6x, Fermentas, Lietuva.
- MgCl₂ (25 mM) - Fermentas, Lietuva.
- PBS (Sigma, Vācija)
- Peles monoklonāla pret HHV-6 gB proteīnu (Abcam,UK)
- Proteināze K: 19,6 mg/ml, Vācija.
- Proteināzes K buferis: 5,85 g NaCl pulveris, 23,98 ml EDTA (0,5 M), 3x destilēts ūdens līdz 100 ml);
- RPMI-1640 (Gibco, Vācija),
- SDS: 20g SDS, 80 ml 3x destilēts ūdens.
- TAE buferis: 20 ml Tris-acetāta 50x (TAE), 980 ml 3x destilēts ūdens.
- Taq polimerāze: 5U/μl), Fermentas, Lietuva.
- TEA: 50x, Fermentas, Lietuva.
- TRI Reagent maisījums: Sigma, Vācija.

3. REZULTĀTI

Vīsiem 60 pacientiem, kuriem tika pārbaudīta un apstiprināta AIT diagnoze ar ELISA testiem, tika noteiktas autoantivielas pret TPO, TG un TSH receptoriem dažādās kombinācijās (6. attēls).



Autoantivielu klātbūtne	TSH	TG	TPO	TSHr+TPO	TG+TPO	TSHr+TG+TPO
Pacientu skaits (n=60)	8	5	10	19	15	3

6. attēls. Vairogdziedzera specifisko autoantivielu klātbūtnes procentuāls sadalījums pacientiem ar autoimūno tireoidītu (AIT).

Figure 6. Proportional distribution in percentage of thyroid-specific auto-antibodies presence in patients with AIT.

Veicot ELISA testus pret tireoglobulīnu (TG), tireoperoksidāzi (TPO) un TSH receptoriem, visiem pacientiem ar AIT tie bija pozitīvi, savukārt nevienam no veselīem donoriem neuzrādījās autoantivielas pret TPO, TG un TSH receptoriem.

3.1. Molekulārie virusoloģijas rezultāti pacientiem ar AIT un kontroles grupām

3.1.1. HHV-6 vīrusa genoma klātbūtnes noteikšana AIT pacientiem un autopsiju paraugiem, un praktiski veseliem asins donoriem

Izdalītās DNS paraugu kvalitāti asins un audu paraugiem noteica pārbaudot β -globīna gēna klātbūtni ar polimerāzes ķēdes reakciju. DNS tika uzskatīta par kvalitatīvi attīrītu, ja PCR produkta lielums bija 200 bp Marķieris pUC19 DNA/MspI (HpaII), (MBI Fermantas, Lietuva).

HHV-6 genoma sekvenca tika atrasta 59 (98%) AIT pacientiem gan audu, gan asins DNS paraugos un 23 (77%) autopsiju paraugos ($p=0.001$). Tikai audu paraugos tika atrasta 51 (85%) AIT pacientiem, un 9 (30%) autopsiju paraugos. Nevienam AIT pacientam netika atrasts HHV-6 genoms tikai asinīs, savukārt no praktiski veseliem asins donoriem to atrada 6 (20%) paraugos. Vienā paraugā pacientiem ar AIT un septiņos kontroles grupas paraugos netika noteikta HHV-6 genoma klātbūtne (1. tabula).

9/60 (15%) AIT pacientu makrofāgu paraugos tika noteikta HHV-6 genoma secības klātbūtne.

1. Tabula

HHV-6 genoma sekvenču klātbūtne asins un audu DNS paraugos pacientiem ar AIT un autopsijas paraugos.

Table 1

Presence of HHV-6 sequence in whole blood and thyroid tissue DNA of patients with AIT patients and autopsy samples.

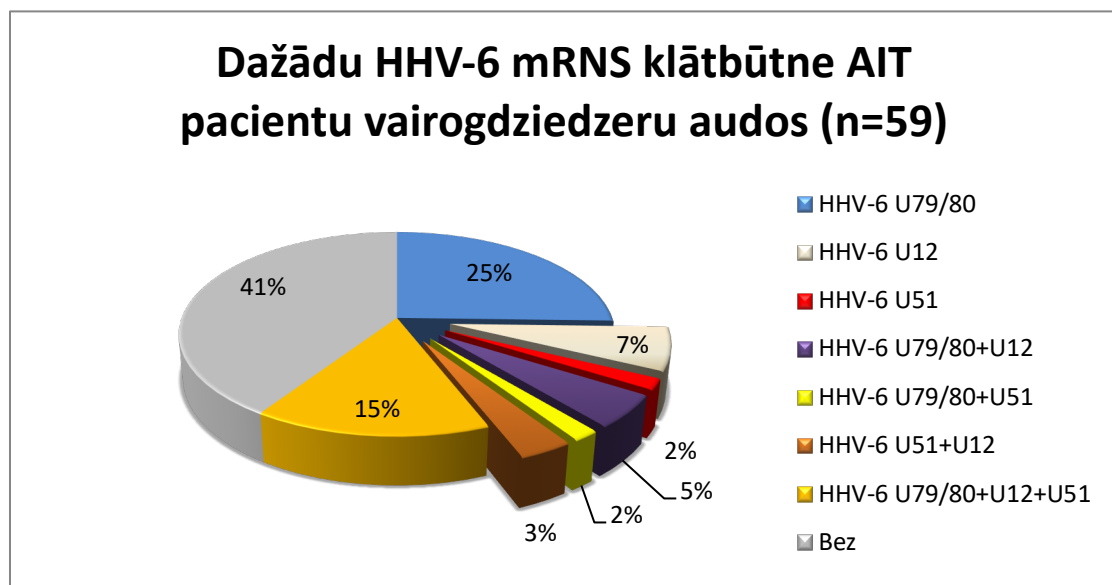
HHV-6 genoma sekvenču sadalījums paraugos	Pacienti ar AIT (n=60)	Autopsijas paraugi (n=30)
HHV-6 tikai asinīs	0	6
HHV-6 asins un audu DNS	8	8
HHV-6 tikai audu DNS	51	9
Nav atrasta HHV-6 genoma sekvenču	1	7

3.1.2. HHV-6 vīrusa tipēšana

Ar nPCR metodi noteiktajiem HHV-6 pozitīvajiem paraugiem (AIT pacientiem, praktiski veseliem asins donoriem un autopsiju paraugiem), veica vīrusa veida - HHV-6A (195 bp) vai HHV-6B (423 bp) noteikšanu. To pārbaudīja ar nPCR iepriekš noteiktajos pozitīvajos paraugos. Visos paraugos detektēja HHV-6B vīrusa secību.

3.1.3. Aktīvas HHV-6 infekcijas noteikšana

Aktīva infekcija tika noteikta 35/59 (59%) AIT pacientu vairogdziedzeru audu paraugos (8.attēls).



8. attēls. Dažādu HHV-6 mRNS klātbūtne AIT pacientu vairogdziedzeru audos (n=59)
Figure 8. Different mRNA distribution in percentage of thyroid gland tissue in patients with AIT (n=59).

Astoņos AIT pacientu perifēro asiņu mononukleāro šūnu paraugos, kuros iepriekš tika detektēta HHV-6 genoma secība, netika konstatētas HHV-6 aktīvas infekcijas mRNS.

Tikai HHV-6 U79/80 mRNS pozitīvi bija 15/59 (25%) AIT pacientu vairogdziedzera audu paraugi un 5/9 (56%) makrofāgu paraugi (9.attēls).

Tikai HHV-6 U12 pozitīvi bija 4/59 (7%) AIT pacientu vairogdziedzera audu paraugi, savukārt neviens no makrofāgu paraugiem nebija HHV-6 U12 mRNS pozitīvs.

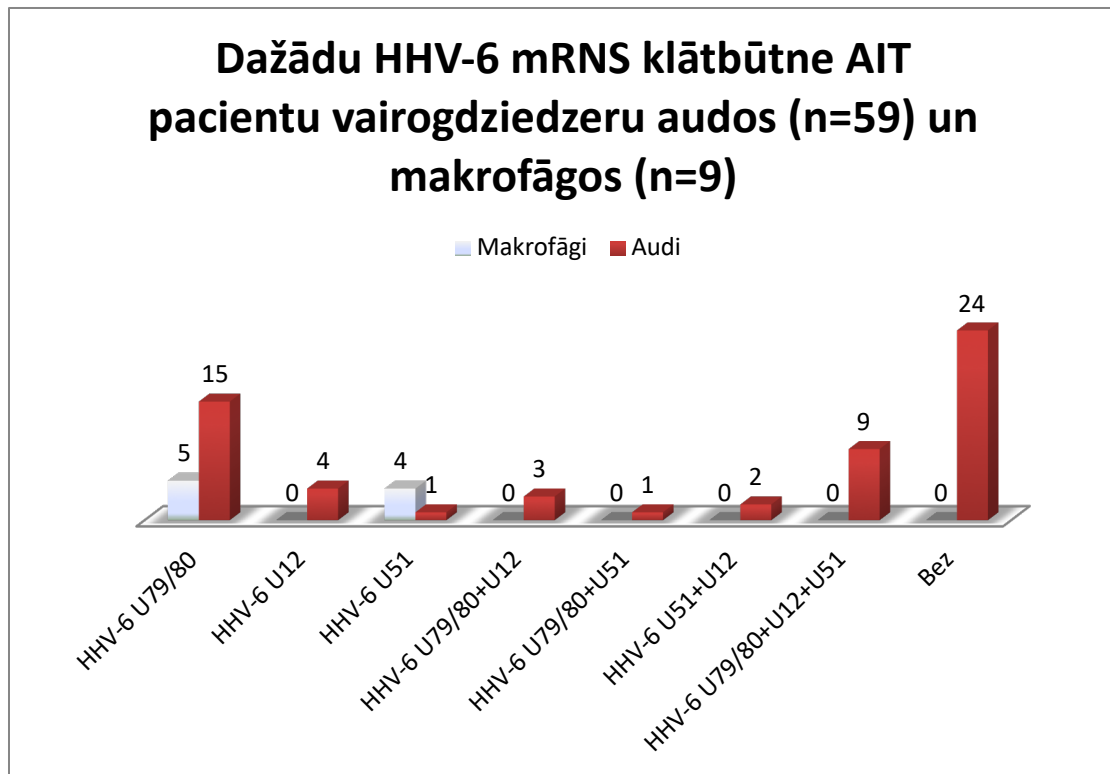
Tikai HHV-6 U51 pozitīvi bija 1/59 (2%) AIT pacientu vairogdziedzera audu paraugi un 4/9 (44%) makrofāgu paraugi.

U79/80+U12 pozitīvi bija 3/59 (5%) AIT pacientu vairogdziedzera audu paraugi, savukārt neviens no makrofāgu paraugiem nebija HHV-6 U79/80+U12 mRNS pozitīvs (9.attēls).

U79/80+U51 pozitīvs bija 1/59 (2%) AIT pacientu vairogdziedzera audu paraugi, savukārt neviens no makrofāgu paraugiem nebija HHV-6 U79/80+U51 mRNS pozitīvs.

U79/80+U12+U51 pozitīvi bija 9/59 (15%) AIT pacientu vairogdziedzera audu paraugi, savukārt neviens no makrofāgu paraugiem nebija HHV-6 U79/80+U12+U51 mRNS pozitīvs (9.attēls).

Tikai 1/17 autopsiju paraugiem tika detektēta HHV-6 U79/80 mRNS klātbūtne.



9. attēls. Dažādu HHV-6 mRNS klātbūtnes salīdzinājums AIT pacientu vairogdziedzeru audos (n=59) un makrofāgos (n=9).

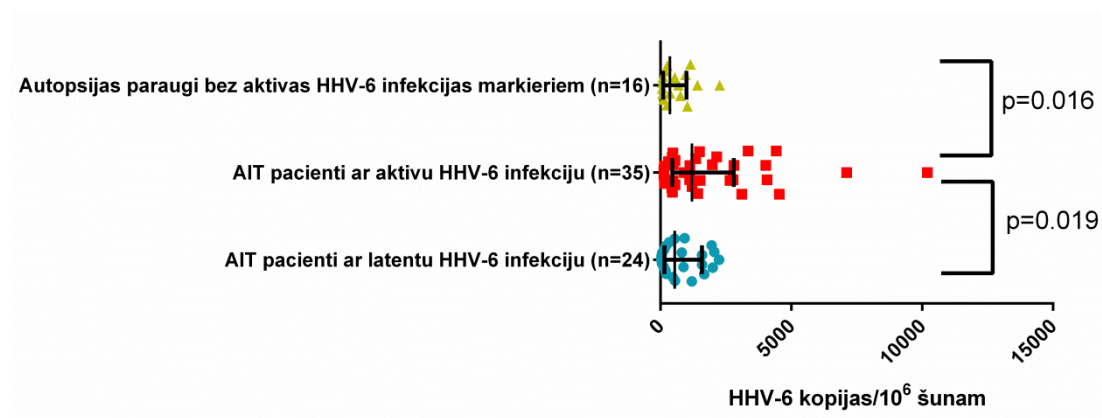
Figure 9. Different mRNA distribution in percentage comparison of thyroid gland tissue (n=59) and macrophages (n=9) in patients with AIT.

3.1.4. HHV-6 vīrusa slodzes noteikšana pacientiem ar AIT un autopsijas paraugiem

HHV-6 vīrusa slodze tika noteikta ar reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju (Real-Time PCR) AIT pacientu asins un vairogdziedzeru audu paraugos, kuriem tika veikta iekšējā praimerēšana (nPCR). Tikai trīs asins paraugos no 8 varēja noteikt vīrusa slodzi (6; 4 un 45 kopijas/ 1×10^6 šūnām), pārējie asins paraugi bija zem detekcijas limita izmantotajā komplektā (5 kopijas uz reakciju, saskaņā ar ražotāja protokolu), turpretī visos HHV-6 pozitīvajos vairogdziedzera audu paraugos vīrusa slodze bija nosakāma (mediāna 905,1 IQR: 308,2-1996 kopijas/ 1×10^6 šūnām).

19/23 HHV-6 pozitīvajos autopsiju paraugos bija nosakāma vīrusa slodze (mediāna 361 IQR: 110-1029 kopijas/ 1×10^6 šūnām).

Vīrusa slodze AIT pacientiem pie aktīvas infekcijas bija lielāka kā pie latentas infekcijas (mediāna 1206 IQR: 455-2804 pie aktīvas pret 544.5 IQR: 155-1589 kopijas/ 1×10^6 šūnām pie latentas infekcijas) (10.attēls).

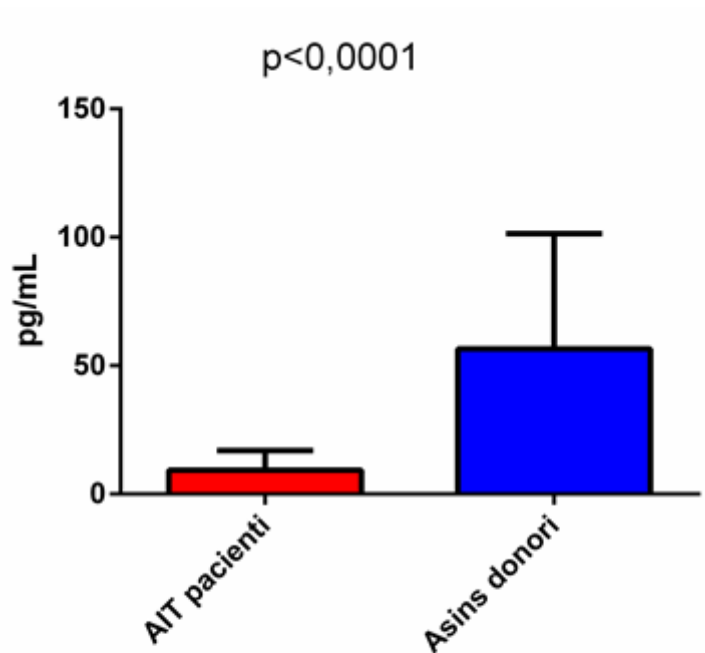


10. attēls. HHV-6 vīrusa slodzes mediānas salīdzinājums AIT pacientiem un autopsijas paraugiem ar aktīvu un latentu infekciju.

Figure 10. Comparison of Median viral load between AIT patients and autopsy samples with active and latent infection.

3.2. Imunoloģijas rezultāti

Ar ELISA metodi tika noteikts RANTES līmenis asins plazmā pacientiem ar AIT (n=60) un asins donoriem (n=30). AIT pacientiem RANTES līmenis ir statistiski zemāks (mediāna 9.267, IQR: 3.489-16.93) kā asins donoriem (mediāna 56.6, IQR: 30.71 - 101.5) (11.attēls).

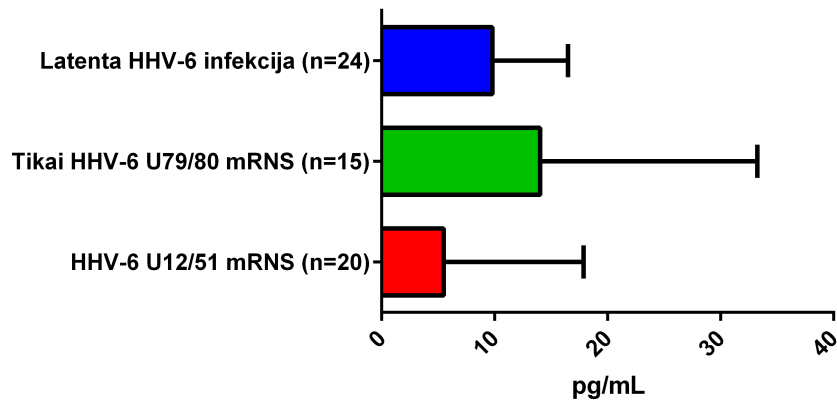


25% Procentīle	3.489	30.71
Mediāna	9.267	56.6
75% Procentīle	16.93	101.5

11. attēls. RANTES līmeņa salīdzinājums AIT pacientu asins plazmā un asins donoru paraugos.

Figure 11. RANTES level in AIT patients' blood plasma in comparison to blood donors.

AIT pacientiem ar aktīvu infekciju, kuriem tika detektēta U12 un U51 gēnu ekspresija, uzrādīja daudz zemāku RANTES līmeni, nekā pacientiem ar aktīvu vīrusa infekciju bez U12 un U51 gēnu ekspresijas. Salīdzinot latentu un aktīvu HHV-6 infekciju tikai ar U79/80 mRNS klātbūtni, latentas infekcijas gadījumā, RANTES līmenis bija zemāks, kaut gan rezultāti nav statistiski ticami ($p=0.1475$) (12.attēls).



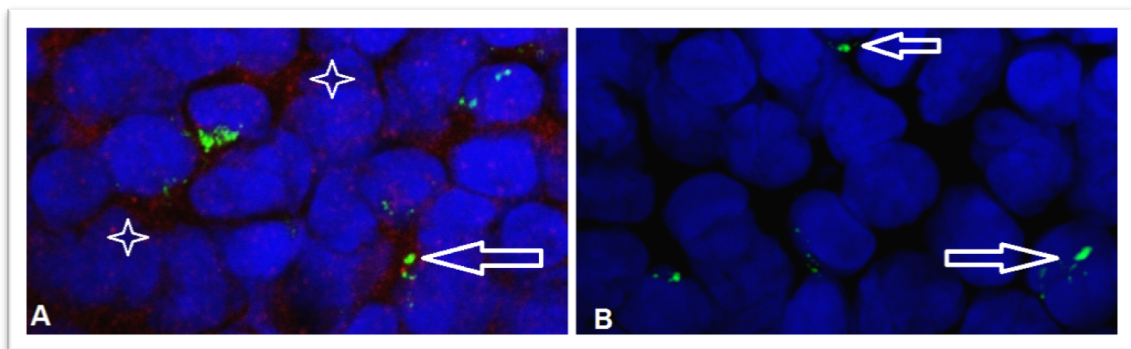
12. attēls. RANTES līmeņa salīdzinājums plazmā AIT pacientiem ar aktīvu un latentu infekciju.

Figure 12. RANTES level comparison in AIT patients' with active and latent infection.

3.3. Imunohistoķīmijas rezultāti

Visi asins donoru paraugi, kuros tika detektēta HHV-6 genoma secība, tika pārbaudīti ar imunohistoķīmijas metodi uz HHV-6 gB (gp116) un RANTES klātbūtni. Visiem 7 kontroles grupas asins donoru paraugiem tika konstatēta RANTES un HHV-6 gB (gp116) ekspresija.

AIT pacientu PBMC paraugos tika konstatēta un HHV-6 gB (gp116) ekspresija, turpretim RANTES ekspresiju konstatēta ļoti vāja (13.attēls).

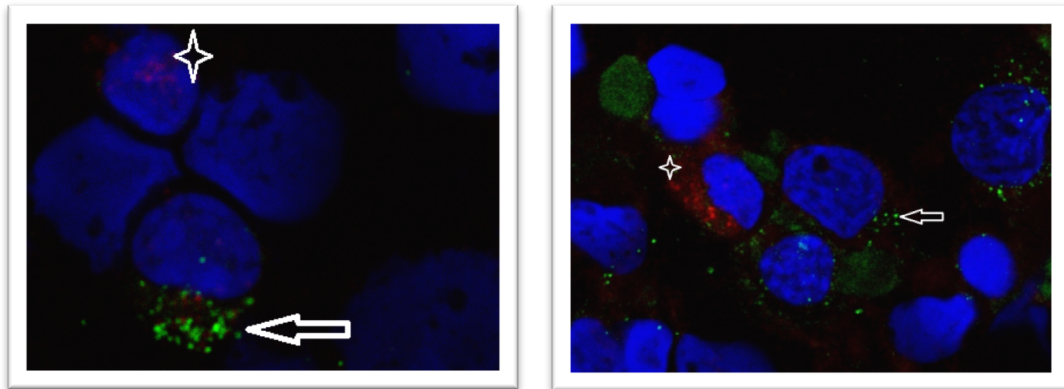


13. attēls. Imunofluorescence. HHV-6 gB (gp116) un RANTES ekspresija A: Kontroles grupas PBMC; B: AIT pacientu PBMC. Iekrāsots ar DAPI (zils); HHV-6 gB (gp116) – Alexa Fluor®488-konjugēta truša – pret peles (zaļa); RANTES - Alexa Fluor®647-konjugēta ēzeļa– pret kazas (sarkana); x100

Ar bultiņām norādīts HHV-6 gB (gp116); ar zvaigznītēm- RANTES.

Figure 13. Immunofluorescence. Expression of HHV-6 gB (gp116) and RANTES in A: Control groups' PBMC; B: AIT patients' PBMC. Counter stained with DAPI (blue); HHV-6 gB (gp116) – Alexa Fluor®488-conjugated rabbit anti - mouse (green); RANTES - Alexa Fluor®647- conjugated donkey– anti goat (red); x100
Arrows - HHV-6 gB (gp116); stars- RANTES.

Tika pārbaudīti 14 AIT pacientu audu paraugi, kuros iepriekš tika noteikta HHV-6 genoma sekvenses klātbūtne. Visos paraugos tika konstatēta HHV-6 gB (gp116) un RANTES ekspresija (14.attēls).



14. attēls. Immunofluorescence. HHV-6 gB (gp116) un RANTES ekspresija AIT pacientu audos. Iekrāsots ar DAPI (zils); HHV-6 gB (gp116) – Alexa Fluor®488-konjugēta truša – pret peles (zaļa); RANTES - Alexa Fluor®647-konjugēta ēzeļa– pret kazas (sarkana); x100

Ar bultiņām norādīts HHV-6 gB (gp116); ar zvaigznītēm- RANTES.

Figure 14. Immunofluorescence. Expression of HHV-6 gB (gp116) and RANTES in AIT patients' thyroid gland. Counter stained with DAPI (blue); HHV-6 gB (gp116) – Alexa Fluor®488-conjugated rabbit anti - mouse (green); RANTES - Alexa Fluor®647- conjugated donkey– anti goat (red); x100
Arrows - HHV-6 gB (gp116); stars- RANTES

4. DISKUSIJA

Ar cilvēka sesto herpesvīrusu raksturo divus dažādus, bet tuvu radnieciskus vīrusus - HHV-6A un 6B. Tie pieder pie β herpesvīrusiem, un ir tuvu radnieciski arī ar citomegalovīrusu. Ar HHV-6B inficējas agri bērnībā, un šī infekcija izpaužas ar simptomiem kā drudzi un *Roseola infantum* (Halme L. et al. 2013). Seropozitivitāte pasaules iedzīvotāju vidū ir tuva 100%. Lai gan tas notiek reti, HHV-6 infekcija spēj izsaukt arī febrilas lēkmes un encefalītu, kas ir raksturīga HHV-6A (Yoshikava T. et al. 2009).

HHV-6 ir limfotrops vīruss, kas replicējas CD4+ T- limfocītos, bet tas var inficēt arī monocītus/makrofāģus, astrocītus, fibroblastus un dažādas endoteliālās vai epiteliālās izcelsmes šūnas (Halme L. et al. 2013).

Pēc primārās infekcijas HHV-6 paliek organismā latentā stāvoklī, un uzturas galvenokārt PBMC un makrofāģos. Šajā laikā HHV-6 ekspresē specifiskus virālos transkriptus, kā U94, kas tiek uzskatīts par latentuma marķieri (Di Luca et al. 1994).

HHV-6 spēj atkārtoti reaktivēties plaušās, sirdī, nierēs, GI traktā, smadzenēs u.c., galvenokārt imunosupresētiem pacientiem un pacientiem, kuriem tiek veikta transplantācija.

HHV-6 persistē arī kā hroniska infekcija, tomēr to ir ārkārtīgi grūti noteikt ar mūsdienās pieejamiem diagnostiskajiem testiem. Šai subakūtai HHV-6 formai vistīcamāk ir loma dažādu slimību, asociētu ar HHV-6, patoloģijā.

Pieaugošs pētījumu skaits norāda uz iespējamo HHV-6 saistību ar dažādām hroniskām un autoimūnām slimībām, viena no tām- autoimūno tireoidītu. 2012.gada pētījuma dati norāda uz HHV-6A saistību ar bieži sastopamā autoimūnā tireoidīta (AIT) – Hašimoto tireoidīta attīstību, taču vēl aizvien ir nepieciešami papildus pierādījumi. Vairogdziedzeru audu paraugi un asinis no Hašimoto tireoidīta pacientiem un kontrolēm uzrādīja augstu HHV-6A sastopamības biežumu un slodzi pacientu audos (Caselli et al., 2012). Arī šajā pētījumā HHV-6 genoma secības klātbūtne tika biežāk detektēta AIT pacientu audu paraugos 59 (98%), kas norāda uz vairogdziedzeri kā persistentas infekcijas atrašanās vietu, savukārt visos paraugos tika detektēts HHV-6B, kas liecina par ģeogrāfiskajām vīrusa izplatības atšķirībām. Tie ir papildus pierādījumi iespējamai šīs vīrusinfekcijas saistībai ar autoimūnā tireoidīta attīstību. Turklāt, vīrusa

slodze vairogdziedzeru audos bija lielāka, salīdzinājumā ar perifērajām asinīm, kas arī ir papildus pierādījums tā persistences vietai. Noteiktā vīrusa slodze bija lielāka AIT pacientiem pie aktīvas infekcijas, salīdzinot ar latentu infekciju (mediāna 1206 IQR: 455-2804 pie aktīvas pret 544.5 IQR: 155-1589 kopijas/ 1×10^6 šūnām pie latentas infekcijas), kas aptiprina HHV-6 aktivāciju.

AIT etiopatogēnēze vēl līdz galam nav skaidra, jo šī slimība ir multifaktorāla. Tirocīti ekspresē plašu spektru ar imunoloģiski aktīvām molekulām, kuras varētu būt iesaistītas autoimūnā procesa veicināšanā. Autoimūnais tireoidīts izpaužas ar limfocitāru infiltrāciju un audu fibrozi. Tā ir salīdzinoši izplatīta slimību grupa – skar aptuveni 5 – 15 % sievietes un 1 – 5 % vīriešus. To patogēnēzē tiek minēti dažādi faktori - ģenētiskie un vides.

Infekciozie aģenti var ierosināt autoimūnos procesus vairogdziedzerī ar dažādiem mehānismiem, kā piemēram, ierosināt pašu antigēnu modifikācijas, mimikrējot organisma molekulas, ierosināt poliklonālo T šūnu aktivāciju u.c. mehānismiem (Thomas D. et al. 2008). HHV-6 kodē divus virālo hemokīnu receptorus U12 un U51, kuri ir strukturāli līdzīgi ar šūnu G-proteīna saistītajiem receptoriem (Menotti L. et al. 1999), tomēr šo gēnu loma nav pietiekami izprasta. U12 un U51 ir funkcionāli līdzīgi daudz labāk izpētītajam CMV proteīnam US28 (pUS28), kas uzlabo CMV infekcijas norisi. Par cik tas ir CCR homologs, pUS28 dimerizē ar vairākiem saimniekorganisma hemokīnu receptoriem, tajā skaitā CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, un CXCR4 (Kugn D.E. et al. 1995). HHV-6 GPCRs nav pietiekami pētīti, tāpēc rodas jautājums, vai šie proteīni ir iesaistīti autoimūnā procesa attīstībā, kā arī, kā tas ietekmētu saimniekorganisma imūno sistēmu, ja tas spētu dimerizēt ar saimniekorganisma hemokīnu receptoriem, kuri ir līdzīgi ar hCMV proteīnu US28.

Proteīni, kurus kodē HHV-6 U12 un U51 gēni, var tikt ekspresēti uz epiteliālo un dažu perifēro asiņu mononukleāro šūnu populāciju virsmas, kas padara tās par potenciālu iemeslu, kāpēc tiek ierosināts autoimunitātes process un saimnieka organisma GCR kā auto-reaktīvo T un B limfocītu mērķi, kā arī, in vitro HHV-6 specifiskais GCR var mijiedarboties ar citokīnu signālceļu, izraisot RANTES lejupregulāciju (Isegawa Y. et al. 1998). Abi šie fakti padara U12 un U51 proteīnus par ideāli piemērotiem, lai pētītu HHV-6 iesaisti autoimūnā tireoidīta attīstībā.

Šajā pētījumā ir parādīts, ka 33% no AIT pacientu vairogdziedzeru audu paraugiem satur HHV-6 U12 un/vai U51 mRNS. Tas nozīmē, ka trešdaļai AIT pacientu vairogdziedzeru audi ekspresē virālo hemokīnu receptorus, lai gan ir nepieciešams veikt papildus eksperimentus, lai gūtu pierādījumus par HHV-6 proteīnu klātbūtni uz tirocītu virsmas ar tādām metodēm kā Western blot vai imunofluorescenci. Tomēr, lai iegūtu skaidrus pierādījumus, ir nepieciešamas specifiskas antivielas, kas pašreiz nav pieejamas pasaules tirgū. Šo antivielu trūkums varētu būt skaidrojams ar to, ka ir sarežģīti iegūt antigēnus imunizācijai, jo šie proteīni ir transmembranāli un to attīrīšana sagādā grūtības. Šo problēmu varētu atrisināt, lietojot daudz dažādus sintētiskos peptīdus (veidotus no HHV-6 aminoskābju sekvencēm), kuri tiks testēti kā antigēni priekš imunizācijas. Antigēni sintētisko peptīdu formā tiktu izmantoti, lai pārbaudītu AIT pacientu plazmu uz potenciālām specifiskām antivielām un, lai iegūtu poliklonālās/monoklonālās antivielas pret HHV-6 U12, kā arī U51 proteīniem. Šāda veida pētījumi tika uzsākti RSU A. Kirhenšteina mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā, pēcdoktorantūras granta īstenošanā. Šī iemesla dēļ šajā pētījumā tika iekļautas metodes, kuras nodrošināja netiešus pierādījumus HHV-6 U12/51 gēnu ekspresijas iesaistei AIT attīstībā.

ELISA RANTES mērījumi AIT pacientu un asins donoru plazmas paraugos uzrādīja statistiski ticamu ($p < 0.0001$) zemāku šī hemokīna līmeni pacientiem ar AIT. Tas norāda uz iespējamiem traucējumiem RANTES signālceļā pacientiem ar AIT.

Pacientiem ar aktīvu HHV-6 infekcijas klātbūtni U12/51 gēnu ekspresija tika noteikta ar viszemāko RANTES mediānu, salīdzinot ar pacientiem, kuriem bija aktīva vīrusa infekcija bez U12/51 gēnu ekspresijas vai ar pacientiem, kuriem bija latentā HHV-6 infekcija. Lai gan šie rezultāti nebija statistiski ticami, tie uzrāda iespējamu HHV-6 U12/gēnu ekspresiju RANTES lejupregulācijā un iespējamu saistību AIT attīstībā.

Papildus, pozitīva imūnokrāsošana tajās pašās vairogdziedzeru audu šūnās, kuras ieguva no AIT pacientiem ar abiem- gan RANTES, gan HHV-6 antigēnu, uzrāda iespējamu mijiedarbību starp virāliem proteīniem un RANTES. Lai veiktu galējos secinājumus par HHV-6 U12/51, ir nepieciešami papildus pētījumi, izmantojot virālos antigēnus (kā rekombinantus proteīnus vai sintētiskos peptīdus) un specifiskas antivielas.

5. SECINĀJUMI

1. RANTES statistiski nozīmīgi zems līmenis AIT pacientu asins plazmas paraugos, salīdzinot ar asins donoriem, norāda uz iespējamu šī hemokīna signālceļa iesaisti autoimūnā tireoidīta attīstībā.
2. Aktīva HHV-6 infekcija AIT pacientiem varētu būt viena no galvenajiem iemesliem RANTES lejupregulācijā, it sevišķi U51 un U12 gēnu ekspresijas gadījumā, un tas norāda uz iespējamu šo gēnu un RANTES mijiedarbību.
3. Augstāks HHV-6 genoma sekvenču detekcijas biežums, augstāka vīrusa slodze un aktīvas HHV-6 infekcijas marķieri vairogdziedzeru audos, salīdzinājumā ar perifēro asiņu paraugiem un izolētajiem makrofāgiem, norāda uz vairogdziedzeri kā vienu no HHV-6 persistences vietām.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt lielu pateicību mana darba vadītājam vadošai pētniecei Alīnai Sultanovai un Maksimam Čistjakovam par veltīto laiku, ieguldīto darbu un palīdzību darba izstrādes koordinēšanā un praktisko iemaņu apgūšanā laboratorijā.

Pateicos institūta direktora pilnvarotajam p.i. izpildītājam un vadošai pētniecei Modrai Murovscai par iespēju veikt šo darbu un strādāt RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūtā.

RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūta Maģistra darbs veikts valsts pētījumu programmas „Biomedicīna sabiedrības veselībai (BIOMEDICINE)” projekta „Inovatīvu infekcijas procesa regulācijas un modulācijas stratēģiju izveide” un pēcdoktorantūras projekta 1.1.1.2/VIAA/1/16/202 (1.1.1.2/16/1/001) “Post-doctoral Research Aid” Investigation of possible immunomodulating mechanisms of human Herpes virus-6 in the development of autoimmune thyroiditis” ietvaros.

6. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Adams M.J., Lefkowitz E.J., King A.M., Bamford D.H. 2012. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses, *Arch Virol* 157:1411–1422
2. Agut H., Bonnafous P., Gautheret-Dejean A. 2015. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections- *Clin Microbiol Rev.*, 28(2):313-35.
3. Antonelli A., Ferrari S.M., Corrado A., Di Domenicantonio A. et al. 2015. Autoimmune thyroid disorders-*Autoimmunity Reviews* 14(2):174-180
4. Bandobashi K., Daibata M., Kamioka M., Tanaka Y. et al. 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.
5. Becerra A., Gibson L., Stern L., Calvo-Calle J.M. 2014. Immuneresponse to HHV-6 and implications for immunotherapy- *Curr.Opin.Virol.*, 0: 154–161.
6. Bindra A. et Braunstein G.D. 2006. Thyroiditis-*Am Fam Physician*, 73(10):1769-1776
7. Bressollette- Bodin C., Nguyen T.V., Illiaquer M., Besse B. et al. 2014. Quantification of two viral transcripts by real time PCR to investigate human herpesvirus type 6 active infection-*J Clin Virol*. 59(2):94-9.
8. Campadelli-Fiume G., Mirandola P., et Menotti L. 1999. Human Herpesvirus 6: An Emerging Pathogen - *EID journal*, Volume 5, Number 3
9. Cappa M., Bizzarri C., Crea F. 2011. Autoimmune Thyroid Diseases in Children- *Journal of Thyroid Research*, Article ID 675703, 13 pages
10. Carbone I., Lazzarotto T., Ianni M., Porcellini E. et al. 2014. Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease- *PubMed*, 35(1):122-9.
11. Caselli E., D'Accolti M. , Soffritti I. , Zatelli M.C. et al. 2017. HHV-6A in vitro infection of thyrocytes and T cells alters the expression of miRNA associated to autoimmune thyroiditis - *Virology Journal*, 14(1):3
12. Caselli E., Zatelli M.C., Rizzo R., Benedetti S. et al. 2012. Virologic and Immunologic Evidence Supporting an Association between HHV-6 and Hashimoto's Thyroiditis - *PLoS Pathog*, 8(10): e1002951

13. Chen T. et Hudnall D. 2006. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection- *Modern Pathology*, 19, 726–737
14. Clark D. A. et Griffiths P. D. 2003. Human herpesvirus 6: relevance of infection in the immunocompromised host –*British Journal of haematology*, Vol. 120, Issue3, pages: 384-395
15. Cone RW, Huang ML, Hackman RC, Corey L. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J Clin Microbiol.* 1996 Apr;34(4):877-81.
16. Crawford A., Angelosanto J.M. , Nadwodny K. L., Blackburn S. D. et al. 2011. A Role for the Chemokine RANTES in Regulating CD8 T Cell Responses during Chronic Viral Infection - *PLoS Pathog.*, 7(7): e1002098
17. Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood.* 1999 Sep 1;94(5):1545-9.
18. De Bolle L., Naesens L., De Clercq E. 2005. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy- *Clin Microbiol Rev.*, 18(1): 217–245
19. Di Luca D., Dolcetti R., Mirandola P., De Re V., et al. 1994. Human herpesvirus 6: a survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders - *J Infect Dis* 170(1):211–215
20. Fatourech V. 2012. Thyroid dermopathy and acropachy- *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(4):553-65.
21. Fujita M., Takahashi A., Imaizumi H., Hayashi M. et al. 2015. Drug-induced Liver Injury with HHV-6 Reactivation - *Intern Med* 54: 1219-1222.
22. Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin ME, Efstathiou S, Craxton M, Macaulay HA. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology.* 1995 May 10;209(1):29-51.
23. Gorniak R.J., Young G.S., Wiese D.E., Marty F.M. et al. 2006. MR imaging of human herpesvirus-6-associated encephalitis in 4 patients with anterograde amnesia after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation- *AJNR Am J Neuroradiol* 27:887–91.
24. Greninger A. L., Roychoudhury P., Makhsous N., Hanson D. et al. 2018. Copy Number Heterogeneity, Large Origin Tandem Repeats, and Interspecies

Recombination in Human Herpesvirus 6A (HHV-6A) and HHV-6B Reference Strains
- *J Virol.*, 92(10) e00135-18

25. Hall C. B., Caserta M. T., Schnabel, K. C., Long C. et al. 1998. Human herpesvirus 6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *New England Journal of Medicine*, 331, 432–438
26. Halme L., Loginov R., Arola J., Turunen U. et al. 2013. HHV-6 antigen and HHV-6 DNA expression in sporadic adenomatous polyps of the colon - *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 48: 1423–1427
27. Hasegawa A., Yasukawa M., Sakai, I. et Fujita, S. 2001. Transcriptional downregulation of CXC chemokine receptor 4 induced by impaired association of transcription regulator YY1 with c-myc in human herpesvirus 6-infected cells - *Journal of Immunology*, 166, 1125–1131
28. Hill J.A., Mayer B.T., Xie H., Leisenring W.M. et al. 2017. Kinetics of Double-Stranded DNA Viremia After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation - *Clinical Infectious Diseases*, Volume 66, Issue 3, pp 368–375
29. Hill J.A., Sedlak R.H., Jerome K.R. 2014. Past, present, and future perspectives on the diagnosis of Roseolovirus infections- *Opinion in Virology*, 9:84–90
30. Hirata Y., Kondo K. et Yamanishi K. 2001. Human herpesvirus 6 downregulates major histocompatibility complex class I in dendritic cells - *Journal of Medical Virology*, 65, 576–583.2001
31. Hopp R. J. 1994. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils - *American Academy of Pediatrics article*, Volume 94 / Issue 2
32. Yagasaki H., Kato M., Shimizu N., Shichino H. et al. 2010. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV-6)- *Annals of hematology*, 90(7):851-2.
33. Yamanishi K., Okuno T., Shiraki K., Takahashi M. et al. 1988. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum- *Lancet*, 14;1(8594):1065-7.
34. Iannaci G., Luise R., Sapere P., Coluccino V. et al. 2013. Fibrous Variant of Hashimoto's Thyroiditis as a Diagnostic Pitfall in Thyroid Pathology- *Case Reports in Endocrinology*, Volume 2013 Article ID 308908, 5 pages
35. Iddah M., Macharia B., 2013. Autoimmune Thyroid Disorders- *ISRN Endocrinology*- Volume 2013 (2013), Article ID 509764,10.1155/509764

36. Yoshida R., Imai T., Hieshima K., Kusuda J. et al. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine EB11-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EB11, CCR7 - *Journal of Biological Chemistry*, 272, 13803–13809
37. Yoshikawa T., Ohashi M., Miyake F., Fujita A. et al. 2009. Exanthem Subitum-Associated Encephalitis: Nationwide Survey in Japan – Elsevier, 10.1016/j.pediatrneurol.2009.05.012
38. Yoshikawa T., Asano Y., Akimoto S., Ozaki T. et al. 2002. Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis - *Journal of Medical Virology*, 66, 497–505
39. Yoshikawa T., Ihira M., Suzuki K., Suga S. et al. 2001. Primary human herpesvirus 6 infection in liver transplant recipients - *J Pediatr.*, 138(6):921-5
40. Isegawa Y., Ping Z., Nakano K., Sugimoto N. et al. 1998. Human Herpesvirus 6 Open Reading Frame U12 Encodes a Functional β -Chemokine Receptor- *J Virol.*, 72(7): 6104–6112.
41. Isegawa Y., Mukai T., Nakano K., Kagawa M. et al. 1999. Comparison of the Complete DNA Sequences of Human Herpesvirus 6 Variants A and B- *Journal of Virology*, 8053–8063.
42. Jenkins F., Hoffman L. 2000. Infectious causes of cancer: targets for intervention Goedert J.J. Overview of Herpesviruses, Ed. 2000, Humana Press, 33-43 pp.
43. Kaufer B., Flamand L. 2014. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology- *Current Opinion in Virology*, 9:111–118
44. Kledal TN, Rosenkilde MM, Schwartz TW. Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28. *FEBS Lett.* 1998 Dec 18;441(2):209-14.
45. Krueger G., Ablashi D. 2006. Human Herpesvirus-6 : *General Virology, Epidemiology and Clinical Pathology*, Ed.: 2nd ed. Amsterdam : Elsevier Science.
46. Kuhn DE, Beall CJ, Kolattukudy PE. The cytomegalovirus US28 protein binds multiple CC chemokines with high affinity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jun 6;211(1):325-30.
47. Lamoth F., Jayet P.Y., Aubert J.D., Rotman S. et al. 2008. Case report: human herpesvirus 6 reactivation associated with colitis in a lung transplant recipient- *J Med Virol.*, 80(10):1804-7.

48. Lea J., Ganttb S., 2013. Human Herpesvirus 6, 7 and 8 in Solid Organ Transplantation- American Journal of Transplantation 2013; 13: 128–137
49. Leibovitch E.C, Brunetto G. S., Caruso B., Fenton K. et al. 2014. Coinfection of Human Herpesviruses 6A (HHV-6A) and HHV-6B as Demonstrated by Novel Digital Droplet PCR Assay - PLoS One 9(3): e92328
50. Leroy B., Gillet L., Vanderplasschen A., Wattiez R. 2016. Structural Proteomics of Herpesviruses- Viruses (1999-4915). Vol. 8 Issue 2, p1-17. 17p.
51. Lyall E.G., Cubie H.A. 1995. Human herpesvirus-6 DNA in the saliva of paediatric oncology patients and controls- Journal of Medical Virology, vol 47, no. 4, pp. 317-22.
52. Luiz H.V., Gonçalves D., Silva T.N., Nascimento I. et al. 2014. IgG4-related Hashimoto's thyroiditis--a new variant of a well known disease- Arq Bras Endocrinol Metabol., 58(8):862-8
53. Lusso P. 2006. HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape- Journal of Clinical Virology, 37 Suppl 1:S4-10.
54. Menotti L., Mirandola P., Locati M., Campadelli-Fiume G. et al. 1999. Trafficking to the plasma membrane of the seven-transmembrane protein encoded by human herpesvirus 6 U51 gene involves a cell-specific function present in T lymphocytes - J Virol., 73:325–333
55. Milbradt J., Auerochs S., Korn K., Marschall M. 2009. Sensitivity of human herpesvirus 6 and other human herpesviruses to the broad-spectrum anti-infective drug artesunate- Institute for Clinical and Molecular Virology, 46(1):24-8.
56. Milne RS, Mattick C, Nicholson L, Devaraj P, Alcamì A, Gompels UA. 2000. RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 b-chemokine receptor. J Immunol 164:2396–2404.
57. Nakano K., Tadagaki K., Isegawa Y., Aye M. M. et al. 2003. Human Herpesvirus 7 Open Reading Frame U12 Encodes a Functional β -Chemokine Receptor - J Virol. 77(14): 8108–8115.
58. Nitsche A., Müller C. W., Radonic A., Landt O. et al. 2001. Human herpesvirus 6A DNA Is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation - Journal of Infectious Diseases, 183, 130–133

59. Okuno T., Oishi H., Hayashi K., Nonogaki M., et al. 1995. Human herpesviruses 6 and 7 in cervixes of pregnant women - *J Clin Microbiol* 33:1968–1970
60. Pirags V., Bērziņa A., Dzīvīte I., Marga M. et al. 2002. Vairogdziedzera slimību diagnostika un ārstēšana. *Rīga, Latvijas endokrinologu asociācija* 19-20; 28; 43-44
61. Principi N., Beriooli M.G., Bianchini S. et Esposito S. 2017. ype 1 diabetes and viral infections: What is the relationship? - *J Clin Virol.*, doi: 10.1016/j.jcv.2017.09.003
62. R. R. Razonable, 2013. Human Herpesviruses 6, 7 and 8 in Solid Organ Transplant Recipients - *American Journal of Transplantation*, 13: 67–78
63. Ranganathan R., Thiagarajan B. 2015. Hašimoto's thyroiditis a review- *Online Journal of Otolaryngology*, Volume 5 Issue 3.5
64. Razonable R., Paya C. 2003. The Impact of Human Herpesvirus-6 and -7 Infection on the Outcome of Liver Transplantation- *Liver Transplantation*, Volume 8, Issue 8
65. Roush K. S., Domiati-Saad R. K., Margraf L. R., Krisher K. 2001. Prevalence and cellular reservoir of latent human herpesvirus 6 in tonsillar lymphoid tissue - *American Journal of Clinical Pathology*, 116, 648–654
66. Sallusto F., Mackay C. R., Lanzavecchia A. 2000. The Role of Chemokine Receptors in Primary, Effector, and Memory Immune Responses - *Annual Review of Immunology*, Vol. 18:593-620
67. Schirmer E.C., Wyatt L.S., Yamanishi K., Rodriguez W.J. et al. 1991. Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6- *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88(13): 5922–5926.
68. Siddon A., Lozovatsky L., Mohamed A., Hudnall S.D. 2012. Human herpesvirus 6 positive Reed-Sternberg cells in nodular sclerosis Hodgkin lymphoma- *Br J Haematol.*, 158(5):635-43.
69. Singh S. K., Mishra K. M., Eltoun I. E. A., Bae S. et al. 2018. CCR5/CCL5 axis interaction promotes migratory and invasiveness of pancreatic cancer cells - *Scientific Reports* Vol. 8: 1323
70. Strausbaugh L. J., Caserta M. T., Mock D. J., Dewhurst S. 2001. Human herpesvirus 6 - *Clinical Infectious Diseases*, Volume 33, Issue 6, 15 September 2001, Pages 829–833

71. Tadagaki K., Nakano K., et Yamanishi K. 2005. Human Herpesvirus 7 Open Reading Frames U12 and U51 Encode Functional -Chemokine Receptors – Journal of virology, p. 7068–7076 Vol. 79
72. Tesini B.L., Epstein L.G., Caserta M.T. 2014. Clinical impact of primary infection with roseoloviruses- Current Opinion in Virology, 9:91–96
73. Thomas D., Karachaliou F., Kallergi K., Vlachopapadopoulou E. et al. 2008. Herpes virus antibodies seroprevalence in children with autoimmune thyroid disease- Endocrine, 33(2):171-175.
74. Thomas D., Liakos V., Michou V., Kapranos N. et al. 2006. Detection of Herpes Virus DNA in Post-operative Thyroid Tissue Specimens of Patients with Autoimmune Thyroid Disease - Exp Clin Endocrinol Diabetes, 10.1055/s-2007-956171
75. Unnikrishnan A G. Hashitoxicosis: A clinical perspective. Thyroid Res Pract, 10, Suppl S1:5-6
76. Vandamme A.M., Fransen K., Debaisieux L., Marissens D. et al. 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.
77. von Luetlichau I., Nelson P.J., Pattison J.M., van de Rijn M. et al. 1996. RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues – Cytokine, Volume 8, Issue 1, pages 89-98
78. Zhen Z., Bradel-Tretheway B., Sumagin S., Bidlack J. M. et al. 2005. The Human Herpesvirus 6 G Protein-Coupled Receptor Homolog U51 Positively Regulates Virus Replication and Enhances Cell-Cell Fusion In Vitro – Journal of Virology, Vol. 79, No. 18, p. 11914–11924

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs „HHV-6 un CCL5 iekaisuma hemokīnu iesaiste autoimūnā tireoidīta attīstībā” izstrādāts Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtūtā.
Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Ildze Ventīņa

Datums:

Paraksts:

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.med. Alīna Sultanova

Datums:

Paraksts:

Recenzents:

Datums:

Paraksts:

Darbs iesniegts Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā

Iesiegšanas datums:

Metodiķe:

Paraksts:

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

Aizstāvēšanas datums:

Vērtējums:

Komisijas sekretāre:

Paraksts: