

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MIKROBIOLOĢIJAS KATEDRA

**6. HERPESVĪRUS UN AUTOIMŪNAIS  
TIREOIDĪTS: ĪSTS DRAUDS VAI  
PĀRSPĪLĒJUMS?  
HUMAN HERPESVIRUS 6 AND AUTOIMMUNE  
THYROIDITIS: REAL THREAT OR  
OVERSTATEMENT?**

BAKALaura DARBS

Autors: Ildze Ventīņa

Stud.apl.Nr. ik09040

Darba vadītājs: Mag. biol. Maksims Čistjakovs

RĪGA 2016

## SATURS

SATURS .....	2
ANOTĀCIJA .....	4
SUMMARY .....	5
APZĪMĒJUMU SARAKSTS .....	6
IEVADS .....	7
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	9
1.1. Cilvēka herpesvīrusu klasifikācija un HHV-6 atklāšana .....	9
1.2. Cilvēka herpesvīrusu morfoloģija un replikācijas cikls .....	9
1.2.1 Cilvēka herpesvīrusu struktūra .....	9
1.2.2. HHV-6 genoma struktūra .....	10
1.2.3 HHV-6 replikācijas cikls .....	12
1.3. HHV-6 raksturojums .....	13
1.3.1. Šūnu tropisms .....	13
1.3.2. Hromosomāli integrētais HHV-6 .....	14
1.3.3. HHV-6A un HHV-6B .....	15
1.3.4 Transmisija .....	15
1.3.5 Epidemioloģija .....	16
1.4 HHV-6 infekcijas veidi .....	16
1.4.1 Primāra infekcija .....	16
1.4.2 Persistenta infekcija .....	17
1.4.3. Latenta infekcija .....	17
1.4.4 Aktīva infekcija .....	17
1.5 HHV-6 ietekme uz imūnsistēmu .....	18
1.5.1 Imūnatbilde pēc primārās infekcijas .....	18
1.6 Klīniskās izpausmes .....	19
1.6.1 Ar HHV-6 asociētās slimības .....	19
1.6.2 Ar HHV-6 asociētās autoimūnās slimības .....	19
1.7. Ar vairogdziedzeri asociētās autoimūnās slimības .....	19
1.7.1 Hronisks autoimūns tireoidīts .....	20

1.7.2. Greivsa slimība .....	21
1.8. HHV-6 diagnostika un ārstēšana .....	22
1.8.1 HHV-6 diagnostika .....	22
1.8.2 HHV-6 ārstēšana .....	23
2. METODES UN MATERIĀLI .....	24
2.1. Pacienti .....	24
2.2. Paraugu sagatavošana .....	25
2.3. DNS izdalīšana no asinīm un audiem .....	25
2.3.1. DNS koncentrācijas noteikšana .....	26
2.3.2. DNS kvalitātes pārbaude .....	26
2.4. HHV-6 genoma secības klātbūtnes noteikšana .....	27
2.5. HHV-6 genoma tipēšana .....	28
2.5. RNS izdalīšana no asinīm un audiem .....	29
2.6. Elektroforēze agarozes gēlā .....	30
2.7. ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay) .....	30
2.8. HHV-6 slodzes noteikšana .....	31
2.9. Gaismas mikroskopija .....	31
2.10. Izmantotie materiāli, reaģenti un iekārtas .....	31
3. REZULTĀTI .....	34
3.1. Molekulārie virusoloģijas, imunoloģijas un histoloģijas rezultāti pacientiem ar AIT .....	35
3.2. Molekulārie virusoloģijas, imunoloģijas un histoloģijas rezultāti kontroles grupas un autopsiju materiālu paraugos .....	42
3.3. Pacientu un kontroles grupas indivīdu salīdzinošā analīze .....	43
4. DISKUSIJA .....	47
5. SECINĀJUMI .....	49
PATEICĪBAS .....	50
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	51

## ANOTĀCIJA

Šī darba ietvaros tika pētīta 6. herpesvīrusa (HHV-6) infekcijas iespējamā loma autoimūnā tireoidīta (AIT) izraisīšanā. Pētījumā iesaistīti 52 pacienti ar AIT, kuriem veikta tireoīdektomijas (*Thyreoidectomy totalis*) operācija, 30 autopsiju paraugi un 30 veseli asins donori kā kontroles grupa.

DNS no asinīm un audiem tika izdalīts, izmantojot fenola- hloroforma metodi. HHV-6 vīrusu genoma secības klātbūtne asinīs un audos noteica ar polimerāzes ķēdes reakciju ar iekšējo praimerēšanu (nPCR). PCR produkti tika analizēti ar elektroforēzi agarozes gēlā. Lai apstiprinātu iegūtos nPCR rezultātus, plazmas paraugos tika noteiktas HHV-6 specifiskās IgG klases antivielas, izmantojot komerciālo ELISA reaģentu komplektu. Lai noteiktu autoantivielas pret tireoglobulīnu (TG), tireoperoksidāzi (TPO) un TSH receptoriem, izmantoja ELISA reaģentu komplektus. HHV-6 pozitīvajiem paraugiem veica vīrusa slodzes noteikšanu ar HHV-6 Real-Time reaģentu komplektu. Histoloģiskos preparātus analizēja ar gaismas mikroskopu.

Veicot ELISA testus pret tireoglobulīnu (TG), tireoperoksidāzi (TPO) un TSH receptoriem, visiem pacientiem ar AIT tie bija pozitīvi, savukārt nevienam no veseliem donoriem neuzrādījās autoantivielas pret TPO, TG un TSH receptoriem. Salīdzinot ar kontroles grupu, persistentas HHV-6 infekcijas klātbūtne pacientiem ar AIT bija ievērojami lielāka ( $p=0.0031$ ), attiecīgi 69% un 31%. HHV-6 U79/80 mRNS sastopamības biežums AIT vairogdziedzera audu paraugos bija ievērojami lielāks (24/51 (47%) salīdzinot ar 1/17 (6%);  $p=0.0028$ ) kontroles grupu. Vidējā HHV-6 vīrusa slodze, salīdzinot aktīvas un latentas infekcijas pacientus, bija augstāka pacientiem ar aktīvu vīrusa infekciju (2147 IQR: 971-4188 pret 551 IQR: 145-1589 kopijas/ $10^6$  šūnām). Visos paraugos detektēja HHV-6B vīrusa secību.

Darba saturu veido 5 nodaļas ar apakšnodaļām. Kopumā darba izstrādāšanai izmantoti 44 literatūras avoti, 16 attēli un 2 tabulas. Darba apjoms sastāv no 55 lapaspusēm. Bakalaura darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā.

Atslēgvārdi: HHV-6; autoimūnais tireoidīts; U79/80; virālā slodze

## SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the potential role of human herpesvirus 6 (HHV-6) infection as a trigger of AIT disease. This study included 52 AIT patients, 30 autopsied subjects without thyroid pathologies and 30 healthy donors as controls.

DNA was extracted from peripheral blood by the phenol-chloroform method, followed by nested PCR for detection of HHV-6. The PCR products were observed by electrophoresis in agarose gel. To confirm nPCR results, antibody responses against anti-HHV-6 IgG antibody were tested using ELISA kits. ELISA kits were also used to determine autoantibodies against TPO, TG and TSH receptors. Based on PCR product size and sequencing, the HHV-6 A or B subtypes were characterized. Viral load was analyzed using quantitative real-time polymerase chain reaction. Histological samples were observed and analyzed using light microscopy.

Auto-antibodies against TPO, TG and THS<sub>r</sub> in various combinations were detected in all 52 patients with AIT. Mentioned auto-antibodies were not detected in any of healthy blood donors. The presence of persistent HHV-6 infection in AIT patients was significantly higher (69% vs 31%, respectively,  $p=0.0031$ ) than in the control group. Also, significantly higher frequency of HHV-6 activation marker (U79/80 mRNA) was found in patients thyroid gland tissue samples with AIT in comparison with control group (24/51 (47%) vs. 1/17 (6%), respectively;  $p=0.0028$ ). Median HHV-6 load was found higher in patients with active viral infection than in patients without it (2147 IQR: 971-4188 vs. 551 IQR: 145-1589 copies/ $1 \times 10^6$  cells). HHV-6B type was detected in all samples.

The thesis has 5 chapters with subdivisions. The total amount of 44 references, 16 figures and 2 graphic charts are used in this thesis. This work was done in Rigas Stradins University August Kirhenstein Institute of Microbiology and Virology.

Key words: HHV-6; autoimmune thyroiditis; U79/80; viral load

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AIT- autoimūnais tireoidīts

bp – bāžu pāri

CMV- citomegalovīruss

DNS- dezoksiribonukleīnskābe

HHV-6 – cilvēka sestais herpesvīruss

HT- Hasimoto tireoidīts

kb- kilobāzes

MgCl<sub>2</sub> – magnija hlorīds

ml – mililitri, µl – mikrolitri

nm- nanometri

nPCR - polimerāzes ķēdes reakcija ar iekšējo praimerēšanu

PCR – polimerāzes ķēdes reakcija (polymerase chain reaction)

SDS – nātrija dodecilsulfāts

TAE – Tris-Acetāts

Tag – Tag polimerāze

HLA- cilvēka leikocītu antigēns

DR- tiešais atkārtojums (direct repeat)

TSHr- vairogdziedzera stimulējošā hormona receptors

TG- tireoglobulīns

TPO- tireoperoksidāze

## IEVADS

Vīrusa infekcijas tiek bieži minētas kā svarīgi vides faktori autoimūnā tireoidīta (AIT) izraisīšanā. HHV-6 tiek turēts aizdomās AIT patoģenēzē tā imunomodulējošo īpašību dēļ. HHV-6 inficē tirocītus, ierosinot HLA-II virsmas antigēnu ekspresiju, līdz ar to tirocīti izturas kā antigēna prezentējošās šūnas. (Caselli E. et al. 2012). Inficēšanās ar HHV-6 ir ļoti izplatīta, tā seropozitivitāte pasaules iedzīvotāju vidū ir tuvu 100%, lai gan pastāv ģeogrāfiskās atšķirības. Primārā infekcija, kuru izraisa HHV, norisinās agri bērnībā un izpaužas kā ekzantēma jeb trīsdienu drudzis (*exanthema subitum*), ar kuru ir inficējušies lielākā daļa cilvēku līdz piecu gadu vecumam (R. R. Razonable, 2013).

Pēc primārās infekcijas HHV-6 spēj palikt visu mūžu saimnieka organismā persistejošā stāvoklī, un atkāroti aktivēties dažādu eksogēno faktoru dēļ (Razonable R., Paya C. 2003). Vīrusa reaktivācija visbiežāk norisinās asimptomātiski, izņemot gadījumos, kad inficētam indivīdam tiek nomākta imunitāte, piemēram asinsrades cilmes šūnu transplantācijas gadījumā (Bodin C. et al. 2014).

Ar HHV-6 ir asociētas vairākas autoimūnās slimības, tajā skaitā Hašimoto tireoidīts, Sjogrena sindroms, multiplā skleroze, reimatoīdais artrīts un sistēmas sarkanā vilkēde, purpura fulminans, autoimūnās saistaudu slimības un smags autoimūnais hepatīts (Caselli et al. 2012). Vīrusa infekcijas tiek minētas kā vienas no vides faktoriem autoimūnā Hašimoto tireoidīta izraisīšanā. Tas izpaužas ar limfocitāru infiltrāciju vairogdziedzera parenhīmā, folikulāro šūnu atrofiju, granulāro tirocītu klātbūtni (onkocītiskās jeb Hurtle šūnas) un fibrozi. (Iddah M., Macharia B., 2013). Hašimoto tireoidīta gadījumā 95% pacientu konstatē av-TPO un av-TG titru paaugstināšanos, kas ir hroniska autoimūna tireoidīta diagnostiskie marķieri, 15-20% pacientu ar hronisku autoimūnu tireoidītu konstatē paaugstinātu TSH receptoru bloķējošo antivielu titru (Pirags V. et al. 2002).

**Darba mērķis:** noskaidrot, HHV-6 infekcijas lomu autoimūnā tireoidīta attīstībā.

**Darba uzdevumi:**

1. Veikt autoantivielu testus pret tireoglobulīnu (TG), tireoperoksidāzi (TPO) un TSH receptoriem asins plazmā.
2. Izdalīt DNS no vairogdziedzeru asinīm un audiem.
3. Pārbaudīt DNS kvalitāti un kvantitāti izdalītajiem paraugiem.
4. Noteikt HHV-6 genoma klātbūtni vairogdziedzeru asins un audu DNS paraugos.
5. Paraugos, kuros noteikta HHV-6 genoma klātbūtne, veikt vīrusa tipēšanu un vīrusa slodzes noteikšanu.
6. Pārbaudīt anti-HHV-6 specifisko IgG klases autoantivielu klātbūtni asins plazmā.
7. Izdalīt RNS no audiem un asinīm, kuros ir iepriekš noteikta HHV-6 genoma klātbūtne.
8. Noteikt HHV-6 aktīvas infekcijas klātbūtni vairogdziedzeru audu un asins DNS paraugos, nosakot U79/80 mRNS klātbūtni ar nPCR metodi.

## 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  $\alpha$  herpesvīrusiem pieder herpes simplex vīruss 1 (HSV-1), herpes simplex 2 (HSV-2) un varicella zoster (VZV). Pie  $\beta$  herpesvīrusu apakšdzimtas pieder cilvēka citomegalovīruss (CMV), cilvēka herpesvīruss-6 (HHV-6) un cilvēka herpesvīruss-7 (HHV-7).  $\gamma$ - herpesvīrusi ir Epstein-Barr vīruss (EBV, HHV-4) un cilvēka 8. herpesvīruss (HHV-8) (Jenkins F., Hoffman L. 2000).

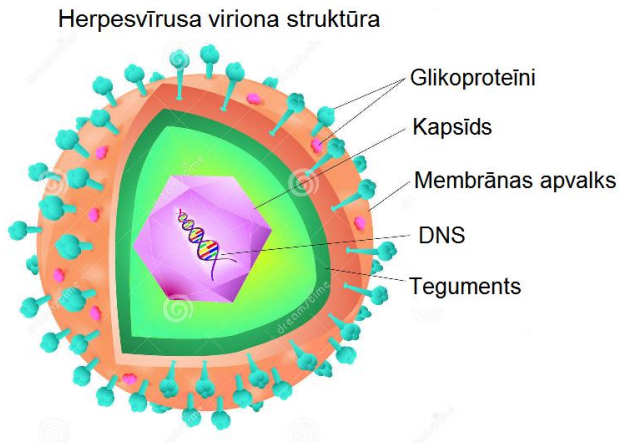
HHV-6 pirmo reizi izolēja 1985. gadā Zaki Salahuddin no AIDS pacientu perifēro asiņu mononukleārajām šūnām un liesas audiem (Krueger G., Ablashi D. 2006).

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

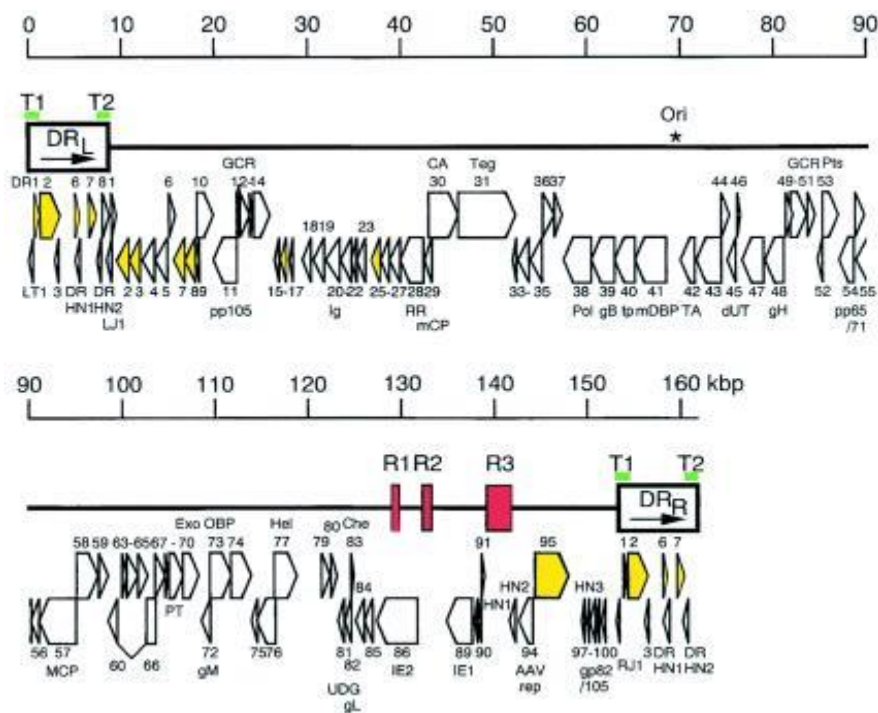
Visi herpesvīrusi sastāv no trim galvenajiem strukturālajiem elementiem: nukleokapsīda ar diametru 90- 110 nm un ikosaedrisku simetriju, centrā ir koks, kas satur virālo DNS genomu, kapsīda, kura satur virālos glikoproteīnus, un teguments, kas sastāv no proteīnu kompleksa, kas aizņem vietu starp membrānas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



1. Attēls. Herpesvīrusa viriona struktūra.

Figure 1. Structure of the Herpesvirus virion<sup>1</sup>

### 1.2.2. HHV-6 genoma struktūra



2. Attēls. HHV-6B genoma shematisks attēlojums.

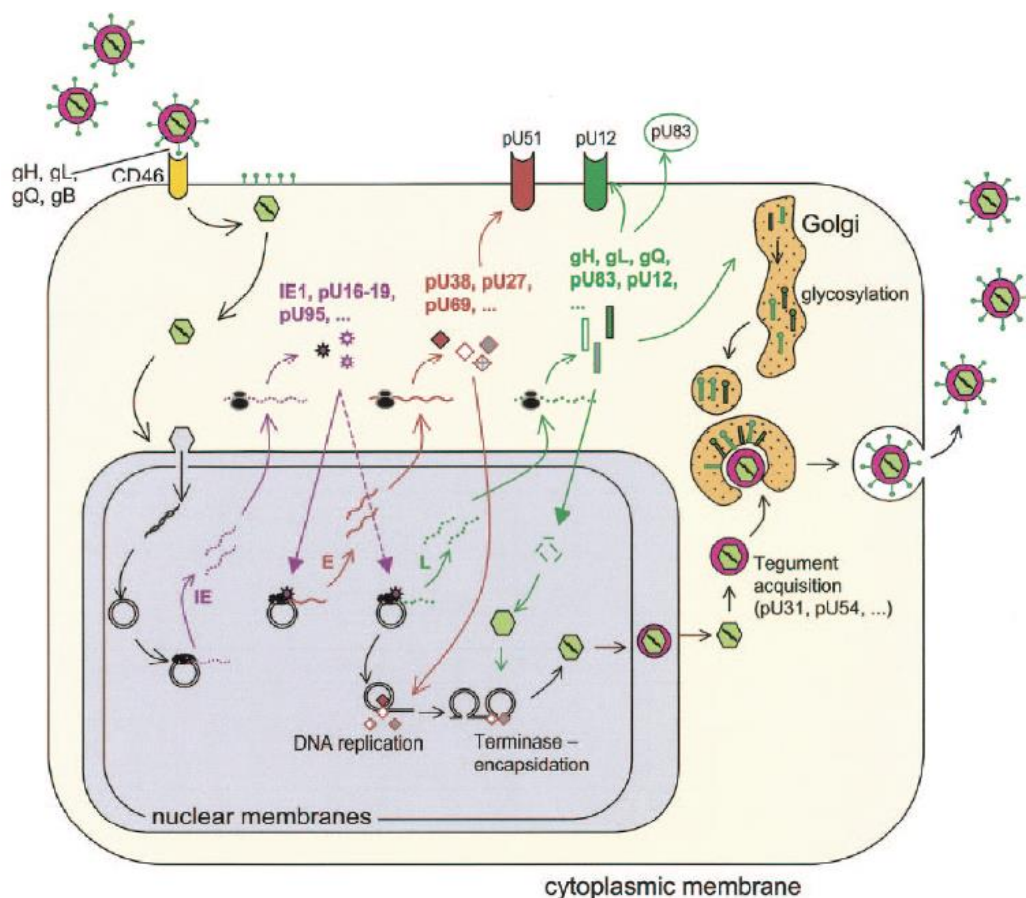
Figure 2. Schematic representation of the HHV-6B genomic organization<sup>2</sup>

<sup>1</sup><http://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photo-herpes-virus-structure-image27182865> © Designua

<sup>2</sup>Bolle L. et al. 2005. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy-

HHV-6 genoms ir lineāra, dubultspirāles DNS molekula, 160 to 162 kb liela, un sastāv no 143- līdz 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 (GGTTA)<sub>n</sub> 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 cycle<sup>3</sup>

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-6AgH-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

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

Clin Microbiol Rev., 18(1): p. 220

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 (Boelle L. et al. 2015).

### **1.3. HHV-6 raksturojums**

#### **1.3.1. Šūnu tropisms**

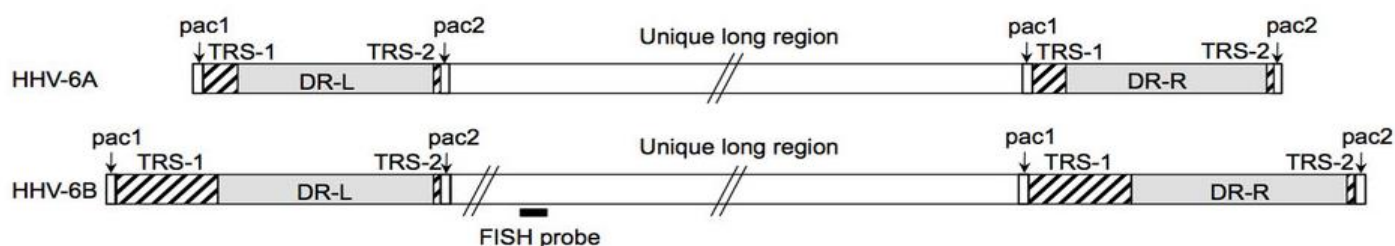
CD4+ T limfocīti ir primārās mērķšūnas gan HHV-6A, gan HHV-6B, ierosinot citopātisku infekciju, kas norāda uz iespējamu loma HHV-6 imunosupresijas izraisīšanā. Tomēr pastāv atšķirības šo abu vīrusu šūnu tropismā: HHV-6A, salīdzinot ar 6B, daudz efektīvāk replicējas dažādu veidu citotoksiskajās efektoršūnās- 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 dziedzerā, deguna gļotādā, mandelēs), plaušu audos (plaušās un pleirā), vairogdziedzera un virsnieru dziedzerā, 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 (gamētās). 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).

### 1.3.3. HHV-6A un HHV-6B



4. attēls. Shematiska HHV-6 genoma struktūra.<sup>4</sup>

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).

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 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.

### 1.3.4 Transmisija

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

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

fakts, ka bērniem, kuriem konstatēts vīruss, ir siekalu saskarsme ar māsām, brāļiem un vecākiem. Nesen kā viens no iespējamiem 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 vīruss tiek iegūts caurtransplacentāro infekciju (Tesini B. et al. 2014).

### **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 infekcijas veidi**

Tāpat kā pārējiem herpesvīrusiem, arī trīs herpesvīrusiem no  $\beta$  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).

### **1.4.1 Primāra infekcija**

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

rādītājiem lielākā daļa cilvēku līdz piecu gadu vecumam ir inficējušies ar HHV-6. 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. Izsitumi, kas saglabājas no pāris stundām līdz divām dienām, sākumā parādās uz kakla, tad rumpja un izplatās uz ekstremitātēm. Lielāko daļu primāro infekciju izraisa HHV-6B. HHV-6A izraisa neiroloģiskus traucējumus kā drudža lēkmes un meningoencefalītu (R. R. Razonable, 2013).

#### **1.4.2 Persistenta infekcija**

Persistentā infekcijā vīrusa darbība netiek pilnībā pārtraukta, tas turpina uzturēties inficētā saimniekorganismā 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).

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

#### **1.4.4 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 inducēšanā 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).

## **1.5 HHV-6 ietekme uz imūnsistēmu**

### **1.5.1 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 izmaiņšanu 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 (Lusso P. 2006).

## **1.6 Klīniskās izpausmes**

### **1.6.1 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). Epstein-Barr vīruss un HHV-6 tiek minēti kā iespējamie vides riska faktori kognitīviem traucējumiem un Alcheimera 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 patoģenēzē (Siddon et al. 2012).

### **1.6.2 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.

### **1.7. Ar vairogdziedzeri asociētās autoimūnās slimības**

Autoimūnām vairogdziedzera slimībām (AITD) ir divi galvenie izpausmes veidi: Greivsa slimība (GD) un Hasimoto 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 izpaužas 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 vairogdziedzera audu preparātu izmeklējumā uzrādījās limfocitāra infiltrācija, folikulāro šūnu atrofija, granulāro tirocītu klātbūtne (onkocītiskās jeb Hurtle šūnas) un fibroze. (Iddah M., Macharia B., 2013).

### 1.7.1 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, Hasimoto 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 Hasimoto 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, B<sub>12</sub> 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).

Hasimoto 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 limfoplazmacītisko infiltrāciju (Luiz H.V. et al. 2014).

Hasimoto toksikoze ir pārejoša hipertireozes fāze. Tā ir tireotoksikozes/ hipertireoīdisma 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 pacientēmpirms atlabšanas fāzes skar hipotireoīdisms (Bindra A. et al. 2006).

### **1.7.2. 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 autoantivielas pret TSH receptoru stimulē vairogdziedzera hormonu hipersekreciju vairogdziedzera folikulārā epitēlija šūnās un vairogdziedzera hipertrofiju. Šīs autoantivielas ir atrodamas Greivsa slimības pacientu asins

sērumā. 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.

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 glikoaminoqlikānu 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).

## 1.8. HHV-6 diagnostika un ārstēšana

### 1.8.1 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). Komerčiālais ELISA tests nosaka anti-HHV-6 imūnglobulīna G antivielu klātbūtni.

### 1.8.2 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, un tās ir izstrādātas pret citām virālām infekcijām. 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).

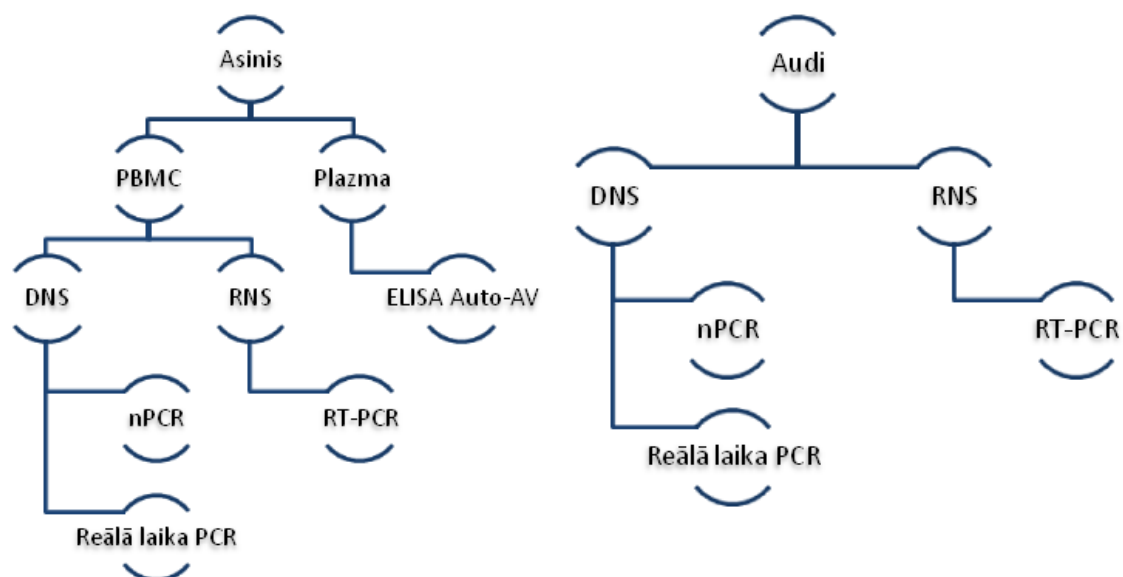
Klīniskajā pētījumā pacienti pēc hematopoētisko cilmes šūnu transplantācijas tika ārstēti ar artesunātu (ART), kas parasti tiek lietots kā zāles pret malāriju. Tas būtiski samazināja vīrusu slodzi un norādīja uz to, ka ART inhibē CMV un pacienti var tikt veiksmīgi izārstēti ar ART, kas inhibē vairākus 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, 2009).

## 2. METODEDES UN MATERIĀLI

### 2.1. Pacienti

Lai veiktu pareizu pacientu grupas atlasī un apstiprinātu AIT diagnozi, tika veikti papildus autoantivielu testipret tireoglobulīnu (TG), tireoperoksidāzi (TPO) un TSH receptoriem, izmantojot ELISA reaģentu komplektus pēc ražotāja protokola (EUROIMMUN, Germany).

No visiem pacientiem ar vairogdziedzera saslimšanām, pētījumā tika iekļauti 52 pacienti ar autoimūno tireoidītu (49 (94%) sievietes un 3 (6%) vīrieši, vecuma mediāna 47.00 IQR: 38.50-57.00), kuriem tika veikta tireoīdektomija (*Thyreoidectomy totalis*), 30 auopsiju paraugi no 26(87%) sievietēm un 4 (13%) vīriešiem (vecuma mediāna 58.50 IQR 51.50-67.00) bez raksturīgajām AIT pazīmēm vairogdziedzeru histoloģiskajos izmeklējumos, un 30 veseli asins donori kā kontroles grupa (25 (83%) sievietes un 5 (17%) vīrieši, vecuma mediāna 33.50 IQR 27.75-44.25). Atļauja pētījuma veikšanai tika saņemta no Rīgas Stradiņa universitātes (RSU) Ētikas komitejas un visi pētījuma dalībniekideva rakstveida piekrišanuizmeklējumiem. 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 fikolagrādienta 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  $-70^{\circ}\text{C}$ .

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 tīros stobriņos, kurus centrifugēja 3000 apg./min 10 minūtes. Pēc tam plazmu pārlēja uz tīriem stobriņiem un centrifugēja 9000 apg./min, 10 minūtes. Pārnesa plazmu tīros stobriņos pa 200  $\mu\text{l}$  katrā. Rezultātā tika iegūta plazma, kas ir brīva no šūnām. Visus paraugus lika uzglabāties  $-70^{\circ}\text{C}$  līdz DNS izdalīšanai.

## 2.3. DNS izdalīšana no asinīm un audiem

Pie 0,5 ml asinīm (paraugs) pievienoja 1ml lizējošo buferi (100mM Tris HCl (pH 7.6); 5mM  $\text{MgCl}_2$ ; 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  $\mu\text{l}$  proteināzes K buferi (100mM Tris HCl (pH 8.0); 50mM EDTA (pH 8.0)) proteīnu šķelšanai. Asins paraugiem pievienoja 20  $\mu\text{l}$ , audu paraugiem 30  $\mu\text{l}$  20% SDS (nātrija dodecilsulfāu), kas šķeļ leikocītu membrānas. Tad asins paraugiem pievienoja 15  $\mu\text{l}$ , audu paraugiem 20  $\mu\text{l}$  proteināzi K un 3x destilētu ūdeni līdz 0,5 ml atzīmei. Paraugus samaisīja un atstāja inkubēties četras stundas  $55^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  fenola un 250  $\mu\text{l}$  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).

### **2.3.1. DNS koncentrācijas noteikšana**

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

### **2.3.2. DNS kvalitātes pārbaude**

Asnis 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 $\mu$ l	Koncentrācija
PCR buferis	2.5	10x
MgCl <sub>2</sub>	2.0	25mM
dNTP	0.5	10mM
Praimeris GS268	0.1	25nmol
Praimeris GS269	0.1	25nmol
Taq polimerāze	0.1	5U/ $\mu$ l
3x destilēts ūdens	17.7	

Praimeru secība:

GS 268 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'

GS 269 5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG-3'

Reakcijas maisījumam pievienoja 2  $\mu$ l DNS (konc. 1  $\mu$ g/  $\mu$ l) un lika termālajā aplifikatorā. Aplifikācijas 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 gelā.

#### 2.4. 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'

<b>1.cikls 50 µl</b>		<b>2.cikls 25 µl</b>		
<b>Reaktīvi</b>	<b>50 µl</b>	<b>Reaktīvi</b>	<b>25 µl</b>	<b>Konc.</b>
PCR buferis	5.0	PCR buferis	2.5	10x
MgCl <sub>2</sub>	3.0	MgCl <sub>2</sub> (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 <sub>2</sub> O	30,4	3x destilēts ūdens	15.2	

## **2.5. 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 Fermants, Lietuva).

PCR maisījums vienam paraugam:

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 <sub>2</sub>	3.0	MgCl <sub>2</sub>	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 <sub>2</sub> 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: 95<sup>0</sup>C 4 min; 30 cikli : (4<sup>0</sup>C 1 min, 50<sup>0</sup>C 1 min, 72<sup>0</sup>C 1 min); 72<sup>0</sup>C 10 min.

Amplifikācijas programma II ciklam: 95<sup>0</sup>C 4 min; 30 cikli (94<sup>0</sup>C 1 min, 60<sup>0</sup>C 1 min, 72<sup>0</sup>C 1 min); 72<sup>0</sup>C 10 min.

Rezultāti tika vizualizēti un analizēti 1,7% elektroforēzes gelā. 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).

## 2.5. RNS izdališana no asinīm un audiem

Audus 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.

## **2.6. 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 marķieripUC19 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.

## **2.7. ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay)**

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

Lai apstiprinātu iegūtos PCR rezultātus, plazmas paraugos tika noteiktas HHV-6 specifiskās IgG klases antivielas, izmantojot komerciālo ELISA reaģentu komplektu (Panbio, Sinnamon 106 Park, QLD, Australia)saskaņā ar ražotāju instrukciju.

## **2.8. HHV-6 slodzes noteikšana**

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

## **2.9. Gaismas mikroskopija**

Vairogdziedzera audu paraugi no pacientiem ar AIT tika fiksēti 24 h ar 4% glutāraldehīda fosfātu buferšķīdumu un 24 h ar osmija tetraoksīdu. Pēc dehidratācijas acetonā (70% - 100%) paraugi tika apstrādāti 24 h 50°C acetona-epoksīdsveķu (Durcupan1) maisījumā bez katalizatora un tālāk mērcēti epoksīdsveķu maisījumā (Durcupan 2) ar katalizatoru. Ar ultramikrotomu sagrieza vidēji biezus (0.5µm) griezumus slāņus. Ar metāla cilpu tos pārnesa uz priekšmetstikliņa ar destilēta ūdens pilienu. Tos žāvēja 10 minūtes 50°C un iekrāsoja ar centrifugētu, sakarsētu toluidīna zilo krāsvielu. Priekšmetstikliņus noskaloja ar destilētu ūdeni un nožāvēja istabas temperatūrā. Preparātus analizēja ar gaismas mikroskopu un attēlus ieguva ar mikroskopam pievienotu digitālo fotokameru. Iekrāsotie materiāli tika izmantoti vispārējai morfoloģiskai apskatei un tālākai attēla analizēšanai tika izmantots transmisijas elektronu mikroskops. Visus ķīmiskos materiālus iegādājās no Sigma Aldrich Chemie GmbH, Vācija.

## **2.10. 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.
- Elektroforēzes aparāts: Cambridge Protein analysis & DNA sequencing Electrophoresis, Lielbritānija.
- Gaismas mikroskops: Leica DM 500B, Wetzlar, Vācija

- 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 Cycler, 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 transiluminātors:Transilluminator TI2, Biometra, Vācija.

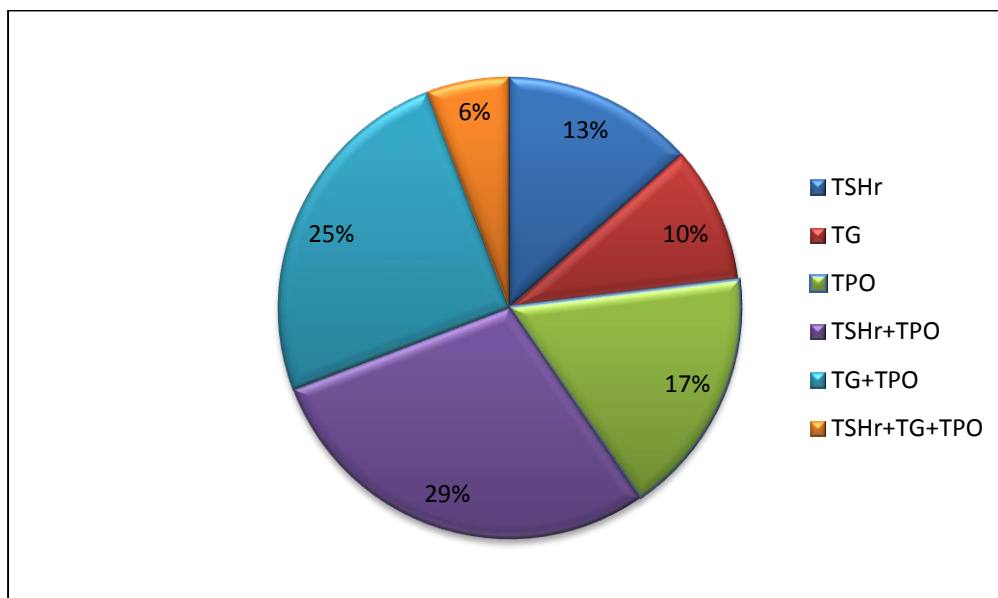
### **Reāģenti:**

- Agarozē: D1 Agraose, low EEO, Conda, Itālija.
- dNTP: (0,2 mM), Fermentas, Lietuva.
- Elektroforēzes marķieris: pUC19 DNA/Mslp (HpaII) 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.
- Lizējošais buferis (0,5 ml 1M Tris HCl, 0,125 ml MgCl<sub>2</sub> (2M), 0,125 ml NaCl (4M), 3x destilēts ūdens līdz 50 ml).
- Loading Dye Solution: 6x, Fermentas, Lietuva.

- $\text{MgCl}_2$  (25 mM) - Fermentas, Lietuva.
- Izopropanols: Sigma, Vācija
- 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)
- SDS: 20g SDS, 80 ml 3x destilēts ūdens.
- TAE buferis: 20 ml Tris-acetāta 50x (TAE), 980 ml 3x destilēts ūdens.
- Taq polimerāze: 5U/ $\mu\text{l}$ ), Fermentas, Lietuva.
- TEA: 50x, Fermentas, Lietuva.
- TRI Reagent maisījums: Sigma, Vācija.

### 3. REZULTĀTI

Visiem 52 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	TSHr	TG	TPO	TSHr+TPO	TG+TPO	TSHr+TG+TPO
Pacientu skaits (n=52)	7	4	9	15	13	3

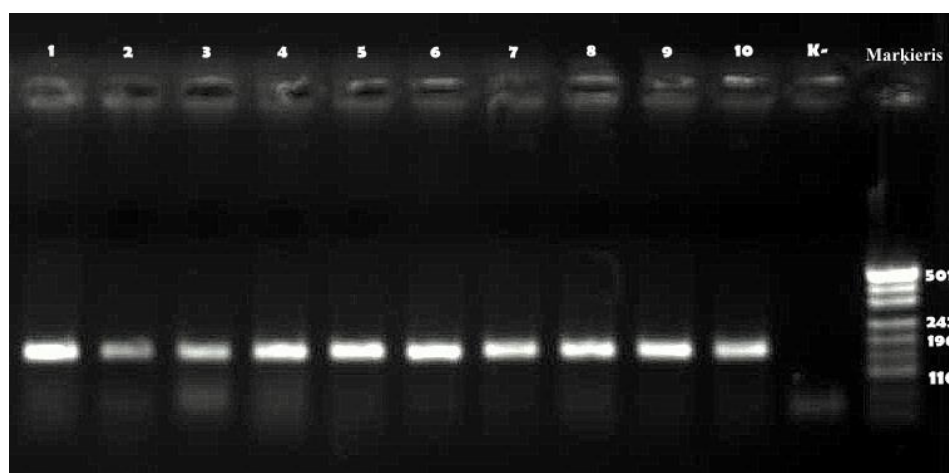
6. attēls. Vairogdziedzera specifisko autoantivielu klātbūtnes procentuāls sadalījums pacientiem ar autoimūno tireoidītu (AIT).

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

### 3.1. Molekulārie virusoloģijas, imunoloģijas un histoloģijas rezultāti pacientiem ar AIT

#### 3.1.1. HHV-6 vīrusa genoma klātbūtnes noteikšana AIT pacientiem

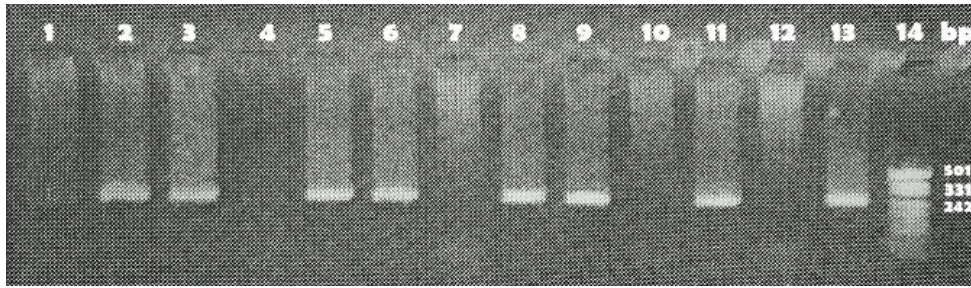
Izdalītās DNS paraugu kvalitāti asins un audu paraugiem noteica pārbaudot  $\beta$ -globīna gēna klātbūtni ar polimerāzes ķēdes reakciju. DNS tika uzskatīta par kvalitatīvi attīrītu, ja PCR produkta lielums bija 200 bp. Visos izdalītajos DNS paraugos tika konstatēta  $\beta$ -globīna gēna secības klātbūtne.



7. attēls.  $\beta$ -globīna gēna amplifikācijas produkta elektroforēzes analīze 1.7% agarozes gēlā. 1.-10. Vairogdziedzera audu DNS paraugi, kas satur  $\beta$ -globīna gēna secības. K- negatīvā ūdens kontrole. Marķieris pUC19 DNA/MspI (HpaII), (MBI Fermantas, Lietuva).

Figure 7. Electrophoretic analysis of  $\beta$ -globin gene amplification product in 1.7% agarose gel. 1.- 10. Thyroid tissue samples with  $\beta$ - globin gene sequence K- negative water control. Marker (pUC19 DNA/MspI (HpaII), (MBI Fermantas, Lithuania).

HHV-6 genoma sekvenču tika atrasta 51 no 52 asins un/vai vairogdziedzera audu DNS paraugos: 25 (48%) pacientiem gan audu, gan asins DNS paraugos, bet 26 (51%) pacientiem tikai audu DNS paraugos. Nevienam pacientam netika atrasts HHV-6 genoms tikai asinīs, un tikai vienam HHV-6 genoms netika atrasts ne asinīs, ne audos (1. tabula).



8.attēls. HHV-6 specifiskās amplifikācijas produkta elektroforēzes analīze 1,7% agarozes gēlā. 1. Negatīvā ūdens kontrole, 2.-3.; 5.-6.; 8.-9.; 11. Vairogdziedzera audi paraugi, kuri satur HHV-6 genoma secību (258 bp) 4., 7., 10. Asins paraugi, kuri nesatur HHV-6 genoma secību. 12.Kontrole, kas nesatur HHV-6 vīrusa secību. 13. Pozitīvā kontrole. 14. Marķieris pUC19 DNA/MspI (HpaII), (MBI Fermantas, Lietuva).

Figure 8. Electrophoretic analysis of HHV-6 specific amplification product in 1.7% agarose gel. 1.Negative water control, 2.-3.; 5.-6.; 8.-9.; 11. Thyroid tissue samples with HHV-6 genome sequence (258 bp). 4., 7., 10. Blood DNA samples without HHV-6 genome sequence. 12.Control sample without HHV-6 viral sequence.13. Positive control. 14. Marker (pUC19 DNA/MspI (HpaII), (MBI Fermantas, Lithuania).

1. Tabula

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

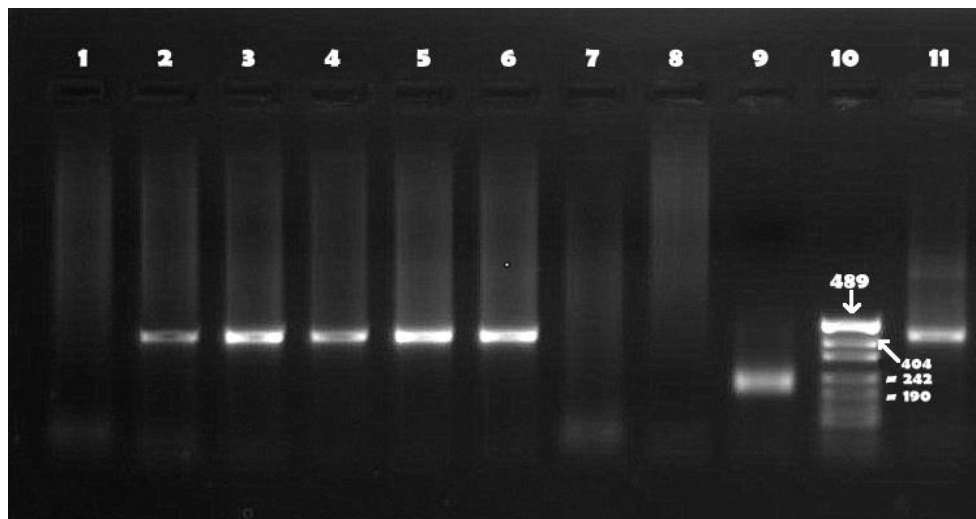
Table 1

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

HHV-6 genoma sekvenses sadalījums paraugos	AIT pacientu paraugi (n=52)
HHV-6 tikai asins paraugos	0
HHV-6 asins un audu paraugos	25
HHV-6 tikai audu paragos	26
Paraugi, kuros nav HHV-6 genoms	1

### 3.1.3. HHV-6 vīrusa tipēšana

Ar nPCR metodi noteiktajiem HHV-6 pozitīvajiem paraugiem, veica vīrusa veida (HHV-6A vai HHV-6B) noteikšanu. To pārbaudīja ar nPCR iepriekš noteiktajos pozitīvajos paraugos. Visos paraugos detektēja HHV-6B vīrusa secību.

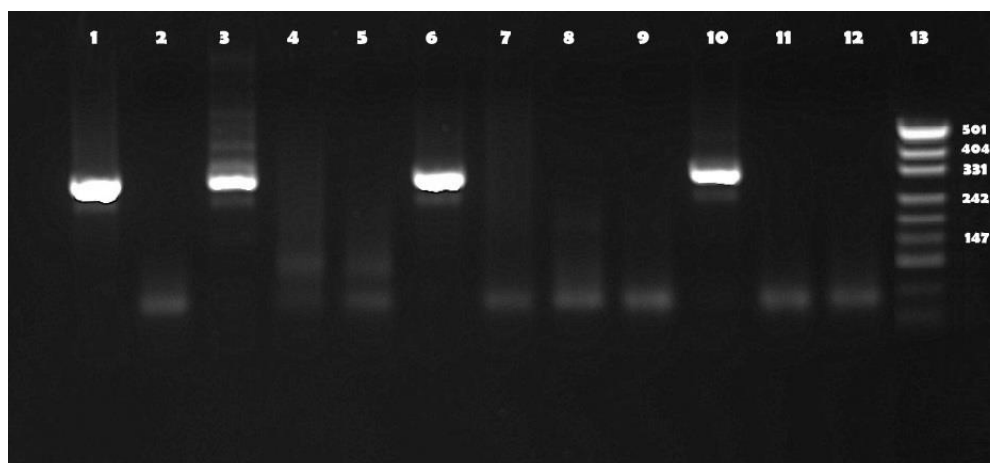


9. Attēls.HHV-6A un HHV-6B specifiskās amplifikācijas produkta elektroforēzes analīze 1,7% agarozes gēlā. 1., 8.Negatīvā ūdens kontrole. 2.-6.; 11. Vairogdziedzera audu DNS paraugi, kas satur HHV-6B vīrusa secību (423 bp). 7.Kontrolē, kas nesatur HHV-6 vīrusa secību 9. Pozitīvā kontrole HHV-6A (195 bp.) 11. Pozitīvā kontrole HHV-6B (423 bp). 10. Marķieris (pUC19DNA/MspI (HpaII)).

Figure 9.Electrophoretic analysis of HHV-6A and HHV-6B specific amplification product in 1.7% agarose gel. 1., 8. Negative water control. 2.-6.; 11. Thyroid tissue samples with viral HHV-6B sequence(423 bp). 7. Control sample without HHV-6 viral sequence. 9. Positive control ofHHV-6A(195 bp). 10. Marker (pUC19DNA/MspI (HpaII)). 11. Positive control of HHV-6B (423 bp).

### 3.1.4. Aktīvas HHV-6 infekcijas noteikšana

U79/80 pozitīvi bija 24/51 (47%) vairogdziedzera audu paraugi pacientiem ar AIT. Neviens no perifēro asiņu mononukleāro šūnu paraugiem nebija HHV-6 U79/80 mRNS pozitīvs.



10. attēls. U79/80 specifiskās amplifikācijas produkta elektroforēzes analīze 1,7% agarozes gēlā. 1. Pozitīvā kontrole, 2. Negatīvā ūdens kontrole, 3., 6., 10. U79/80 pozitīvi vairogdziedzera audu paraugi. 4.-5.; 7.-9. U79/80 negatīvi vairogdziedzera audu paraugi. 11. Negatīvā ūdens kontrole. 12. Kontrole, kas nesatur HHV-6 vīrusa secību.

Figure 10. Electrophoretic analysis of U79/80 specific amplification product in 1.7% agarose gel. 1. Positive control. 2. Negative water control. 3., 6., 10. U79/80 positive thyroid tissue samples. 4.-5.; 7.-9. U79/80 negative thyroid tissue samples. 11.. Negative water control. 12 Control sample without HHV-6 viral sequence.

### 3.1.5. HHV-6 vīrusa slodzes noteikšana pacientiem ar AIT

HHV-6 vīrusa slodze tika noteikta ar reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju (Real-Time PCR) asins un vairogdziedzera audu paraugos, kuriem tika veikta iekšējā praimerēšana (nPCR). Tikai divos asins paraugos no 26 varēja noteikt vīrusa slodzi (46 un 181 kopijas/ $1 \times 10^6$  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 1110 IQR: 271-2027 kopijas/ $1 \times 10^6$  šūnām).

Vīrusa slodze pie aktīvas infekcijas bija lielāka kā pacientiem pie latentas infekcijas (mediāna 2147 IQR: 971-4188 pie aktīvas pret 551 IQR: 145-1589 kopijas/ $1 \times 10^6$  šūnām pie latentas infekcijas).

### **3.1.6. Specifisko anti-HHV-6 IgG klases antivielu klātbūtnes noteikšana**

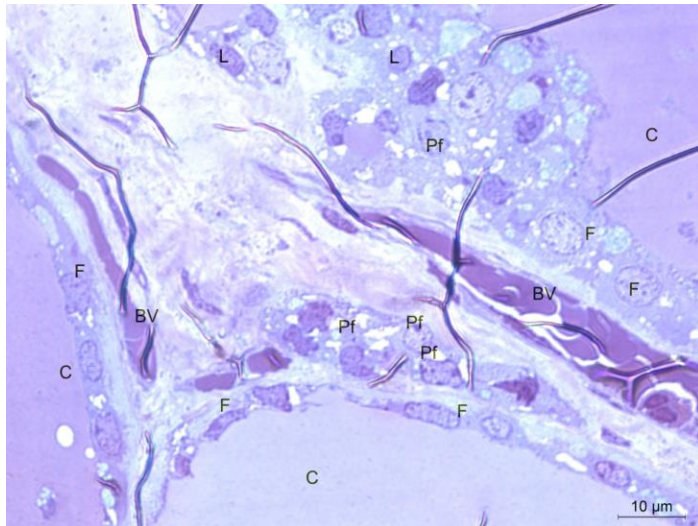
Lai gan ne visi asins paraugi uzrādīja HHV-6 genoma sekvenses klātbūtni, 98% (51/52) bija pozitīvi uz anti- HHV-6 IgG klases antivielām.

### **3.1.7. Vairogdziedzeru audu histoloģiskā izmeklēšana pacientiem ar AIT**

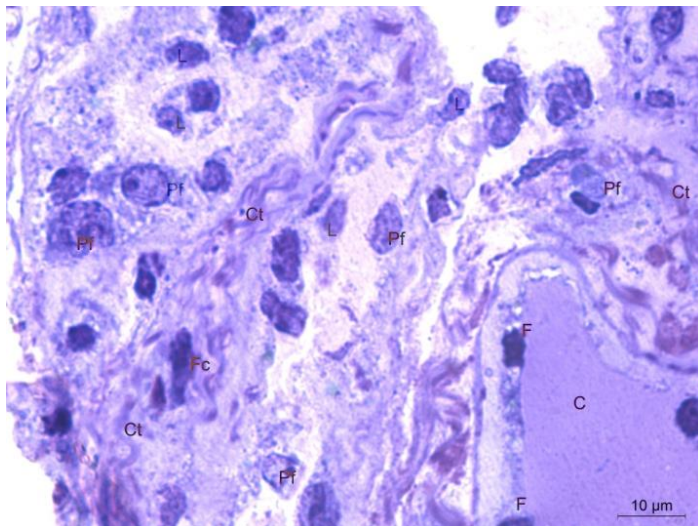
Mikroskopiskā izmeklēšana atklāj plašu parenhīmas infiltrāciju ar mononukleāriem iekaisuma infiltrātiem, kas satur mazus limfocītus, plazmas šūnas un labi attīstītus germinālos centrus. Vairogdziedzera folikuli ir mazi, pildīti ar blīvu koloīdu un izklāti ar zvīņveida un kubveida epitēlijšūnām ar pārlietu eozinofilu, granulāro citoplazmu- sauktas par Hurthle šūnām. Dažiem pacientiem novērojama parenhimāla atrofija un fibroze. Intraepiteliāli limfocīti bija reti redzami. Dažos vairogdziedzera folikulos varēja novērot lielus intrafolikulāru makrofāgu sakopojumus un koloīda zudumu.

Vairogdziedzera parenhīmas mikroskopiskie izmeklējumi uzrādīja dažādas folikulāro bojājumu un deģenerācijas stadijas, kas izpaudās kā folikulu un šūnu formas izmaiņas, samazināta koloīdālā šķīduma krāsošanās, plaša limfocitāra infiltrācija, blakus esošo folikulu saaugšana un neliela intersticiāla fibroze.

Pie diagnozes makrofolikulāra koloīdāla struma, vairogdziedzera folikuli sastāvēja galvenokārt no vairāk vai mazāk saplacinātiem tirocītiem (folikulārā epitēlija), kur dažām šūnām bija palielināti vai pārklājās, un koloīda centrālās masas ar dažādu krāsojumu. (11. a,b un 12. Attēls). Mikrofolikulāras koloīdālas strumas un folikulāras adenomas gadījumos (13. attēls) tika novēroti vairogdziedzera folikuli ar kubveida epitēliju gredzenveida izkārtojumā, tie bija neliela izmēra un samazinātos daudzumos. Preparātos varēja novērot arī viegla krāsojuma vakuolizētas šūnas ar polimorfiskiem, fragmentētiem vai piknotiskiem kodoliem, kas morfoloģiski raksturo tirocītu šūnu bojāeju (11. a,b un 13. attēlā). Pie redzamas pamatnes slāņa parafolikulārās šūnas (C-šūnas), kas ir ārpus lūmena. Ap folikuliem un parenhimālajām šūnām un koloīdā vērojama limfocītu šūnu migrācija (12. Attēls), kā arī tās ir redzamas interstīcijā AIT pacientu preparātos. Bojājumi variēja no sākotnējām izmaiņām parenhīmā līdz fibrozes progresam ap atlieku folikuliem un fibrotiskām saistaudu kārtām, kas satur kapilāru tīklu (11.b un 13.attēls).



a



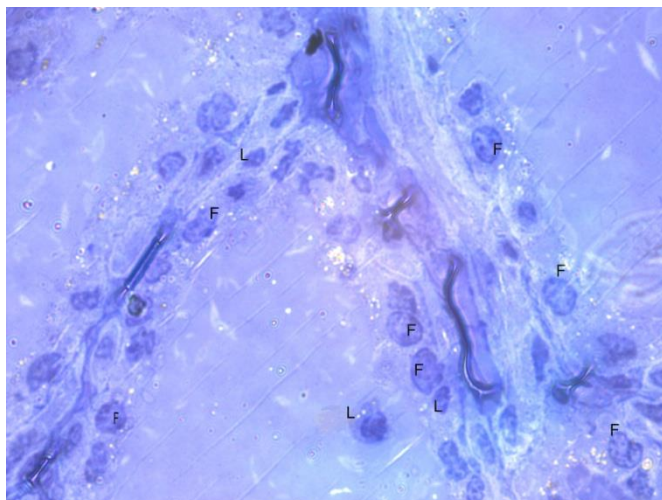
b

11. Attēls (a,b). Dažādu stadiju folikulāri bojājumi un limfocitāra infiltrācija vairogdziedzerī pacientiem ar AIT.

Figure. 11. Different stages of follicular damage and lymphoid infiltration in thyroid glands of patients diagnosed with autoimmune thyroiditis.

Dilatācija un normālas folikulu formas zudums, saplacināts epitēlijs un samazināta koloīda krāsošanās dažos folikulos, saistaudu fibroze, makrofolikulāra koloidāla struma (a); blakus esošo folikulu saaugšana, fokāla nekroze un fibrotiskas saistaudu joslas intersticiālajos saistaudos (b); F-folikulārās šūnas, Pf- parafolikulārās šūnas, L- limfocīdālās šūnas, Ct- fibrotiskas joslas saistaudos, Fc-fibroci, C-koloīds, Bv-asinsvadi;

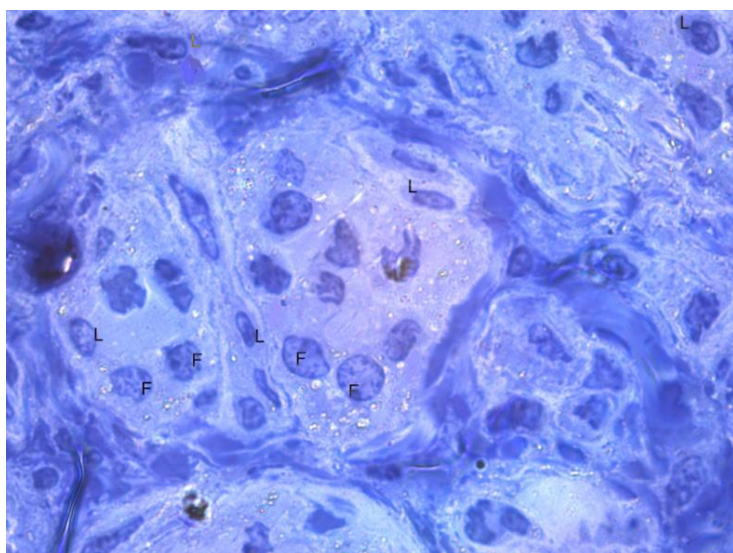
vidēja biezuma griezumā (0.5 μm), gaismas mikroskops Leica DM 5000B, x100, Westzlar, Vācija.



12. Attēls. Vairogdziedzera struktūra pacientam, kas diagnosticēts ar AIT un makrofolikulāru koloidālu strumu.

Figure 12. Thyroid gland of patient diagnosed with autoimmune thyroiditis and macrofollicular colloid struma.

Vairogdziedzera folikuli ar saplacinātu folikulāro epitēliju un sarukušām parenhīmas šūnām ar piknotiskiem vai fragmentētiem kodoliem. Folikulārā koloīdā limfocītāra migrācija; vidēji plāni griezumā (0.5 μm), gaismas mikroskops Leica DM 5000B, x100, Westzlar, Vācija.



13. Attēls. Vairogdziedzera struktūra pacientam, kas diagnosticēts ar AIT un folikulāro adenomu.

Figure 13. Thyroid gland of patient diagnosed with autoimmune thyroiditis and follicular adenoma.

Redzami atrofiski un mazi folikuli ar lielu daudzumu kubveida un zemu daudzkārtainu epitēliju un limfoidālām šūnām. Koloīda reducēšanās; fokālas nekrozes un intersticiālas fibrozes joslas. F- folikulārās šūnas, L- limfoidālās šūnas; vidēji plāni griezumi (0.5 μm), gaismas mikroskops Leica DM 5000B, x100, Westzlar, Vācija.

### 3.2. Molekulārie viroloģijas, imunoloģijas un histoloģijas rezultāti kontroles grupas un autopsiju materiālu paraugos

#### 3.2.1. HHV-6 vīrusa genoma klātbūtnes noteikšana autopsiju materiālos

HHV-6 genoma sekvenca tika atrasta 23 no 30 (77%) DNS paraugos, kas tika izdalīti no kontroles grupas autopsiju materiāla: 8 (34%) gadījumos no asinīm un audiem, 9 (39%) tikai dziedzerā un 6 (26%) tikai no asins DNS paraugiem.

2. Tabula

HHV-6 genoma sekvenču klātbūtne kontroles grupas autopsiju materiālā.

Table 2

Presence of HHV-6 sequence in control group's autopsy material.

HHV-6 genoma sekvenču sadalījums paraugos	Kontroles grupas paraugi (n=30)
HHV-6 tikai asins paraugos	6
HHV-6 asins un audu paraugos	8
HHV-6 tikai audu paraugos	9
Paraugi, kuros nav HHV-6 genoms	7

### **3.2.2. Aktīvas HHV-6 infekcijas noteikšana**

Lai noskaidrotu, vai kādā no kontroles grupas autopsiju paraugiem ir aktīva HHV-6 infekcija, ar reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakciju tika noteikts HHV-6 mRNS. Kontroles grupas autopsiju paraugos U79/80 pozitīvs bija 1/17 (6%) paraugiem.

### **3.2.3.HHV-6 vīrusa slodzes noteikšana**

Tikai vienam pacientam no kontroles grupas bija aktīva HHV-6 vīrusa infekcija ar vīrusa slodzi 4511 kopijas/ $1 \times 10^6$  šūnām.

### **3.2.4.Kontroles grupas autopsiju materiālu histoloģiskā izmeklēšana**

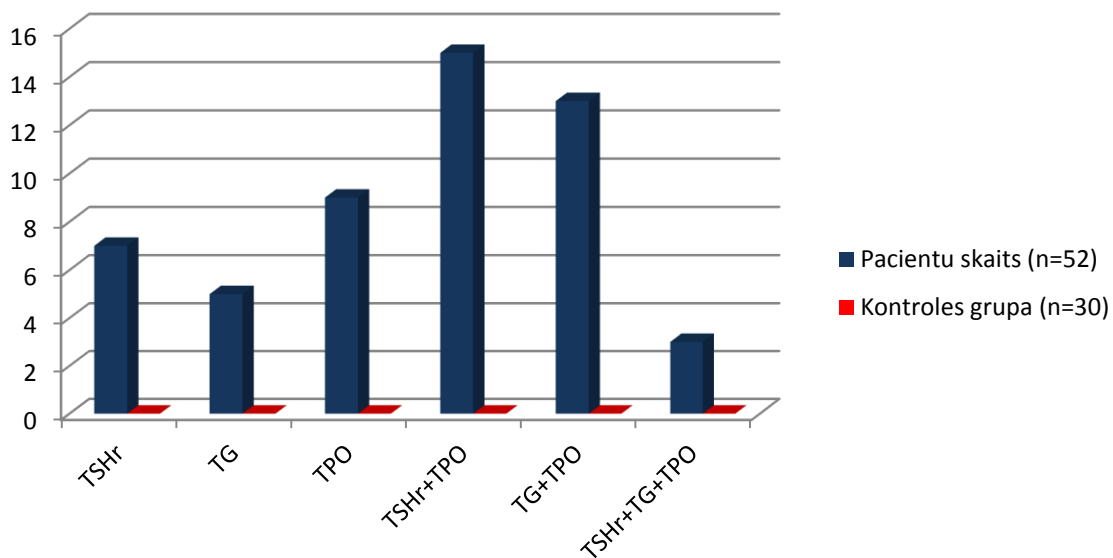
Kontroles grupas autopsiju vairogdziedzeru audu histoloģiskajos preparātos nenovēroja patoloģiskas izmaiņas.

### **3.2.5.Autoantivielu noteikšana praktiskiveseliem asins donoriem**

Paraugiem no praktiski veseliem asins donoriem tika veikti ELISA testi uz autoantivielu noteikšanu. Nevienam no veseliem donoriem neuzrādījāsTPO, TG un TSH receptoru autoantivielas.

## **3.3. Pacientu un kontroles grupas indivīdu salīdzinošā analīze.**

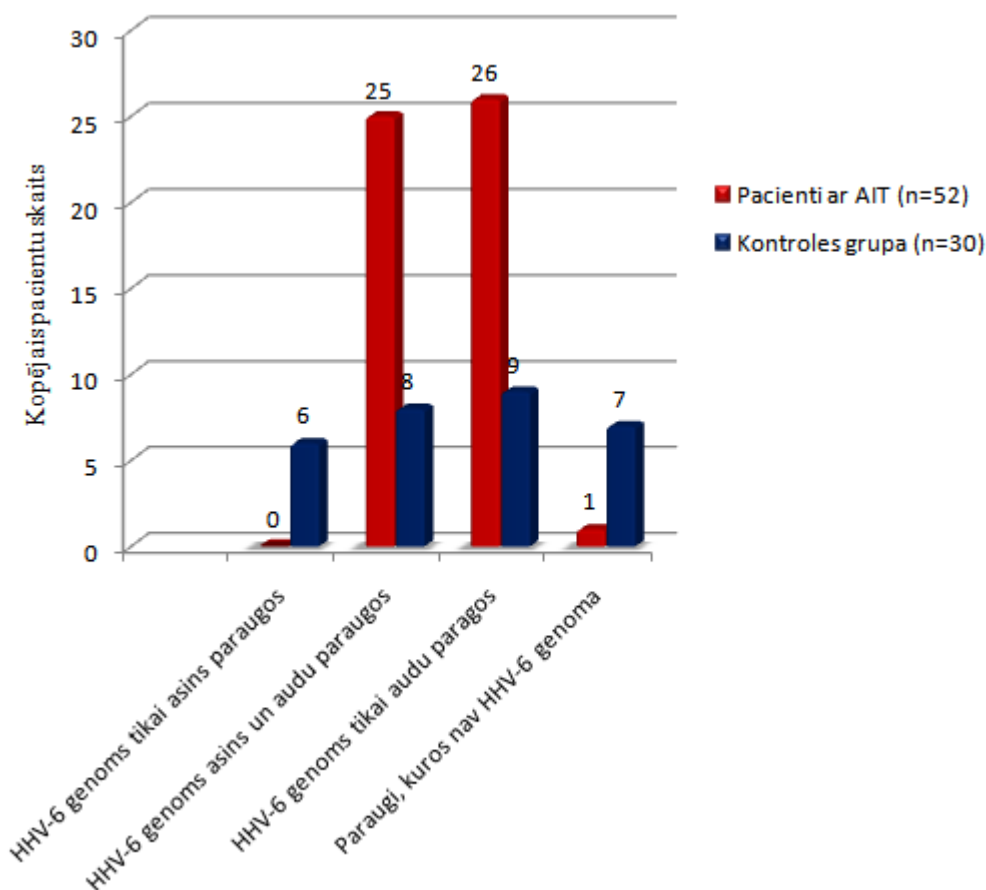
Veicot ELISA testus pret tireoglobulīnu (TG), tireoperoksidāzi (TPO) un TSH receptoriem,visiem pacientiem ar AIT tie bija pozitīvi, savukārt nevienam no veseliem donoriemneuzrādījās autoantivielas pret TPO, TG un TSH receptoriem.



14. attēls. Vairogdziedzera specifisko autoantivielu klātbūtne kontroles grupai un pacientiem ar autoimūno tireoidītu (AIT).

Figure 14. Presence of thyroid-specific auto-antibodies in control group and patients with AIT.

Salīdzinot ar kontroles grupu, persistentas HHV-6 infekcijas klātbūtne pacientiem ar AIT bija ievērojami lielāka ( $p=0.0031$ ), attiecīgi 69% un 31%.



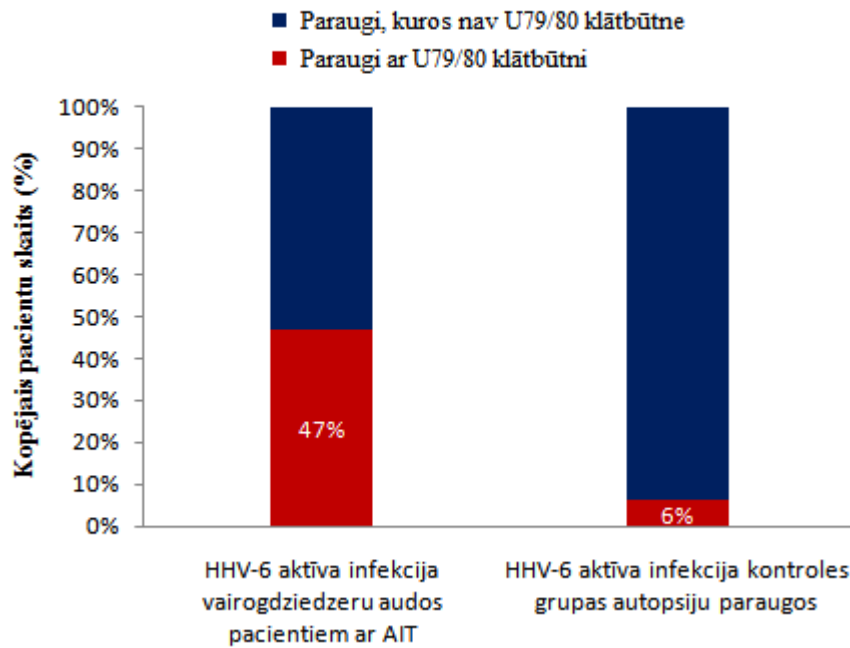
15. attēls. AIT pacientu un kontroles grupas HHV-6 genoma sekvenču klātbūtnes salīdzinājums asinīs un audos.

Figure 15. Comparison of HHV-6 genome presence in control group and patients with AIT.

HHV-6 genoma sekvenču tika atrasta 25 (48%) pacientiem gan audu, gan asins DNS paraugos un 8 (27%) kontroles grupas pacientiem (p=0.0395) DNS tikai audu paraugos tika atrasta 26 (51%) AIT pacientiem, un 9 (30%) paraugos no kontroles grupas. Nevienam AIT pacientam netika atrasts HHV-6 genoms tikai asinīs, savukārt no kontroles grupas to atrada 6 (20%) paraugos. Vienā paraugā no pacienta ar AIT un septiņos kontroles grupas paraugos netika noteikta HHV-6 genoma klātbūtne.

Analizējot mRNS, HHV-6 aktīvas infekcijas (U79/80) biežums bija ievērojami lielāks AIT vairogdziedzera audu paraugos (24/51 (47%) salīdzinot ar 1/17 (6%); p=0.0028) kontroles grupas pacientiem.

## U79/80



16. attēls. U79/80 pozitīvi paraugi kontroles grupā un vairogdziedzera audos pacientiem ar AIT.

Figure 16. U79/80 positive samples in control group and patients with AIT.

Vidējā HHV-6 vīrusa slodze, salīdzinot aktīvas un latentas infekcijas pacientus, bija augstāka pacientiem ar aktīvu vīrusa infekciju (2147 IQR: 971-4188 pret 551 IQR: 145-1589 kopijas/ $1 \times 10^6$  šūnām). Vienam indivīdam no kontroles grupas ar aktīvu HHV-6 infekciju virālā slodze bija 4511 kopijas/ $1 \times 10^6$  šūnām.

#### 4. DISKUSIJA

Vairākos pētījumos ir minēta iespējamā HHV-6 infekcijas loma AIT izraisīšanā.

Thomas et al. (2008), pētot pēc-operāciju vairogdziedzeru audu paraugus pacientiem ar autoimūnām vairogdziedzera slimībām, ar PCR metodi konstatēja HHV-6 klātbūtni 2 no 15 (13.3%) Hashimoto tireoidīta pacientiem, savukārt tā klātbūtne netika atrasta nevienā audu paraugā pacientiem ar Greivsa slimību.

Šī pētījuma rezultāti atspoguļo ievērojami lielāku persistēntas HHV-6 infekcijas klātbūtni pacientiem ar AIT (51/52, 98%), salīdzinot ar kontroles grupu (23/30, 77%), ( $p=0.0031$ ).

Neviens no veselīgiem asins donoriem neuzrādīja vairogdziedzera specifiskās autoantiviēlas, apstiprinot to, ka šīs antiēviēlas visbiežāk ir raksturīgas pacientiem ar AIT.

Šajā pētījumā 51 pacientam tika atrasta HHV-6 genomiskā sekēnce vairogdziedzeru audu DNS, savukārt 26 iegūtie asins DNS paraugi bija HHV-6 negatīvi, bet visiem tika konstatētas anti-HHV-6 IgG klases antiēviēlas.

Iegūtie dati liecina par ārkārtīgi zemu virālo slodzi asinīs, ko nevar noteikt pat ar nPCR metodi, lai gan nevar izslēgtiespēju, ka pastāv citas HHV-6 persistēntas infekcijas atrašanās vietas organismā. Arī Chen T., Hudnall D. 2006. gada pētījuma informācija par herpesvīrusu anatomiskajām atrašanās vietām organismā atbalsta šos rezultātus, arī viņi neatrada HHV-6 asinīs 5/6 *post mortem* indivīdiem, lai gan to noteica dažādos organisma audos, tajā skaitā vairogdziedzerī.

Šī pētījuma rezultāti parādīja, ka 26/52 (48%) pacientu HHV-6 genomiskā sekēnce ir tikai vairogdziedzeru audu DNS paraugos, kas varētu liecināt par HHV-6 persitentu infekciju vairogdziedzerī. Arī reālā laika PCR iegūtie rezultāti uzrāda to, ka HHV-6 vīrusa slodze ir augstāka vairogdziedzeru audu paraugos nekā asinīs, lai gan nevarētu izslēgt iespēju, ka HHV-6 DNS klātbūtne ir limfocītisko audu infiltrātos.

HHV-6 U79/80 mRNS klātbūtni atrada tikai vairogdziedzeru audu paraugos, nevienā no perifēro asiņu paraugiem to neatrada, kas atbalsta iespējamību, ka HHV-6 ir saistīts ar AIT attīstību.

Lai gan HHV-6 virālās slodzesmediānabija lielāka vairogdziedzeru audu paraugos pacientiem ar aktīvu infekciju (mediāna 2147 IQR: 971-4188 kopijas/ $1 \times 10^6$  šūnām) kā pacientiem ar latentu infekciju (mediāna 551 IQR: 145-1589 kopijas/ $1 \times 10^6$  šūnām), vīrusa slodze, salīdzinot ar citām aktīvām injekcijām, ir samērā zema priekš aktīvas vīrusa infekcijas. To varētu skaidrot ar HHV-6 izplatības taktiku no šūnas uz šūnu -vīruss spēj pārvietoties no šūnas uz šūnu nenonākot ārpusšūnu vidē. Šī metode ne tikai ļauj vīrusam ātri izplatīties, bet arī izvairīties no imūnsistēmas šūnām un izraisīt infekciju, šī izplatības taktika ir kopīga visām herpesvīrusu infekcijām.

Zhen et al. (2005) parādīja, ka U51 spēj pastiprināt vezikulārā stomatīta vīrusa G proteīna (VSV-G) iekšējo šūnu saplūšanas aktivitāti, minot iespēju, ka U51 pozitīvais efekts uz HHV-6 replikāciju varētu rasties kā sekas U51 spējas pastiprināt no šūnas uz šūnu izplatību šim šūnu asociētam cilvēka herpesvīrusam. Tas arī varētu izskaidrot ārkārtīgi zemo virālo slodzi asins paraugos, jo virioni neizkļūst asins plūsmā.

Izmaiņas vairogdziedzeru folikulos, to sienu struktūrā un, visbeidzot, HHV-6 pozitīvo intrafolikulāro šūnu izskatā, dod jaunus ieskatus, lai saprastu un identificētu visu šūnu veidus, kas piedalās vīrusa izplatībā. Izmaiņas vairogdziedzeru folikulos, to sienu struktūrā un, visbeidzot, HHV-6 pozitīvo intrafolikulāro šūnu izskatā, dod jaunus ieskatus, lai saprastu un identificētu visu šūnu veidus, kas piedalās vīrusa izplatībā. Šie atklājumi norāda uz HHV-6 saistību AIT attīstībā, bet ir nepieciešama turpmāka izpēte.

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. Abi šie fakti padara U12 un U51 proteīnus kā ideālus objektussavā maģistra darbā, lai pētītu HHV-6 lomu AIT attīstībā.

## 5. SECINĀJUMI

1. HHV-6 genoma secības klātbūtne ir biežāk sastopamavairogdziedzera audos pacientiem ar AIT nekā kontroles grupas indivīdiem, tādēļ nevar izslēgt šīs vīrusinfekcijas saistību ar autoimūnā tireoidīta attīstību.
2. HHV-6 genoms ir sastopams vairāk vairogdziedzera audos kā asinīs, kas varētu norādīt uz persistentas infekcijas atrašanās vietu.
3. Vīrusa slodze ir lielāka vairogdziedzera audu paraugos pacientiem ar AIT, un ir detektēta HHV-6 U79/80 gēnu ekspressija, kas liecina par aktīvas infekcijas norisi audos, kas varētu liecināt par nozīmīgu HHV-6 lomu AIT etiogēnēzē.
4. Pacientiem, kuriem veica HHV-6 vīrusa tipēšanu, visos paraugos atrada HHV-6B vīrusu, kas liecina par to, ka Latvijā tas ir izplatītāks kā HHV-6A.

## **PATEICĪBAS**

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

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

RSU A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūta Bakalaura darbs veikts valsts pētījumu programmas „Biomedicīna sabiedrības veselībai (BIOMEDICINE)” projekta „Inovatīvu infekcijas procesa regulācijas un modulācijas stratēģiju izveide” ietvaros.

## 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. Cappa M., Bizzarri C., Crea F. 2011. Autoimmune Thyroid Diseases in Children- *Journal of Thyroid Research*, Article ID 675703, 13 pages
9. 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.
10. 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
11. Chen T. et Hudnall D. 2006. Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection- *Modern Pathology*, 19, 726–737
12. 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
13. Fatourechi V. 2012. Thyroid dermopathy and acropachy- *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(4):553-65.

14. Fujita M., Takahashi A., Imaizumi H., Hayashi M. et al. 2015. Drug-induced Liver Injury with HHV-6 Reactivation- *Intern Med* 54: 1219-1222.
15. 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.
16. 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
17. 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
18. Iddah M., Macharia B., 2013. Autoimmune Thyroid Disorders- *ISRN Endocrinology*- Volume 2013 (2013), Article ID 509764,10.1155/509764
19. 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.
20. Isegawa Y., Ping Z., Nakano K., Sugimoto N. et al. 1998.Human Herpesvirus 6 Open Reading Frame U12 Encodes a Functional  $\beta$ -Chemokine Receptor- *J Virol.*, 72(7): 6104–6112.
21. 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.
22. Kaufer B., Flamand L. 2014. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology- *Current Opinion in Virology*, 9:111–118
23. Krueger G., Ablashi D. 2006. Human Herpesvirus-6 : *General Virology, Epidemiology and Clinical Pathology*, Ed.: 2nd ed. Amsterdam : Elsevier Science.
24. Kuo T., Wang C., Badakhshan T., Chilukuri S. et al. 2014. Review: The challenges and opportunities for the development of a T-cell epitope-based herpes simplex vaccine- *Vaccine*. 32, 6733-6745.

25. 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.
26. Lea J., Ganttb S., 2013. Human Herpesvirus 6, 7 and 8 in Solid Organ Transplantation- *American Journal of Transplantation* 2013; 13: 128–137
27. Leroy B., Gillet L., Vanderplasschen A., Wattiez R. 2016. Structural Proteomics of Herpesviruses- *Viruses* (1999-4915). Vol. 8 Issue 2, p1-17. 17p.
28. 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
29. Lusso P. 2006. HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape- *Journal of Clinical Virology*, 37 Suppl 1:S4-10.
30. 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.
31. Milbradt J., Auerochs S., Korn K., Marschall M. 2009. Sensitivity of human herpesvirus 6 and other human herpesviruses to the broad- spectrum antiinfective drug artesunate- *Institute for Clinical and Molecular Virology*, 46(1):24-8.
32. 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
33. R. R. Razonable, 2013. Human Herpesviruses 6, 7 and 8 in Solid Organ Transplant Recipients- *American Journal of Transplantation*, 13: 67–78
34. Ranganathan R., Thiagarajan B. 2015. Hasimoto's thyroiditis a review- *Online Journal of Otolaryngology*, Volume 5 Issue 3.5
35. 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
36. Sattentau Q. 2008. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses- *Nat Rev Microbiol.*, 6(11):815-26.

37. 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.
38. 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.
39. Tesini B.L., Epstein L.G., Caserta M.T. 2014. Clinical impact of primary infection with roseoloviruses- *Current Opinion in Virology*, 9:91–96
40. 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.
41. Unnikrishnan A G. Hashitoxicosis: A clinical perspective. *Thyroid Res Pract*, 10, Suppl S1:5-6
42. 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.
43. 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.
44. 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.

## DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs „HHV-6 iespējamā loma vairogdziedzera autoimūno slimību 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

01.06.2016.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Mag.biol.Maksims Čistjakovs

01.06.2016.

Recenzents: Dr. Med. Liene Ņikitina-Zaķe

Darbs iesniegts Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā 01.06.2016.

Metodiķe:

Darbs aizstāvēts kursa darbu gala pārbaudījuma komisijas sēdē 08.06.2016.

Komisijas sekretāre: