



**LATVIJAS  
UNIVERSITĀTE**

**Promocijas darba  
kopsavilkums**

---

**Summary  
of Doctoral Thesis**

**Vitālijs Borisovs**

**DNS BOJĀJUMU ĢENĒTISKAIS  
FONS MULTIPLĀ SKLEROZĒ UN  
BRĪVO RADIKĀĻU VEIDOŠANĀS  
MULTIPLAS SKLEROZES UN 1. TIPA  
DIABĒTA PACIENTIEM**

**GENETIC BACKGROUND OF DNA DAMAGE IN  
MULTIPLE SCLEROSIS AND FREE RADICAL  
PRODUCTION IN MULTIPLE SCLEROSIS AND  
TYPE I DIABETES MELLITUS PATIENTS**

Rīga 2023



# LATVIJAS UNIVERSITĀTE

BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE

**Vitālijs Borisovs**

## **DNS BOJĀJUMU ĢENĒTISKAIS FONSS MULTIPLĀ SKLEROZĒ UN BRĪVO RADIKĀĻU VEIDOŠANĀS MULTIPLAS SKLEROZES UN 1. TIPA DIABĒTA PACIENTIEM**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Doktora grāda iegūšanai bioloģijas nozarē

Apakšnozare: molekulārā bioloģija

Rīga 2023

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē, Bioķīmijas katedrā laika posmā no 2017. gada līdz 2021. gadam.

Pētījums izstrādāts ar Eiropas Reģionālās attīstības fonda projekta Nr. 1.1.1.1/16/A/016 “Ar preasomām saistīto multiplās sklerozes ģenētisko, epigenētisko un klīnisko marķieru noteikšana” atbalstu.

NACIONĀLAIS  
ATTĪSTĪBAS  
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA  
Eiropas Reģionālās  
attīstības fonds



LATVIJAS  
UNIVERSITĀTE

I E G U L D Ī J U M S T A V Ā N Ā K O T N Ē

Darbs sastāv no ievada, četrām nodaļām, secinājumiem, aizstāvamā tēžu saraksta, oriģinālo publikāciju saraksta, pētījuma abrobācības, darba autora izglītības un pieredzes apraksta, pateicībām, atsauču saraksta, diviem pielikumiem.

Darba forma: disertācija bioloģijas nozarē, molekulārās bioloģijas apakšnozarē.

Darba zinātniskais vadītājs: *prof. Dr. habil. biol. Nikolajs Sjakste.*

Darba recenzenti:

- 1) *Dr. med. Šimons Svirskis*, Rīgas Stradiņa universitāte
- 2) *Dr. biol. Una Riekstiņa*, Latvijas Universitāte
- 3) *PhD Lada Živkovič*, Belgradas Universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2023. gada 30. jūnijā plkst. 13:00 Latvijas Universitātes Bioloģijas zinātņu nozares promocijas atklātā sēdē Dabaszinātņu akadēmiskajā centrā, Jelgavas ielā 1.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Unviersitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU Bioloģijas zinātņu  
nozares promocijas  
padomes priekšsēdētājs/-a

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /  
(paraksts)

promocijas padomes sekretārs/-e

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /  
(paraksts)

© Vitālijs Borisovs, 2023  
© Latvijas Universitāte, 2023

ISBN 978-9934-36-017-6

ISBN 978-9934-36-018-3 (PDF)

## KOPSAVILKUMS

Multiplā skleroze (MS) un 1. tipa diabēts (1TD) ir hroniskas autoimūnas slimības. Abu slimību progresēšanai ir kopīgs autoimūns raksturs, bet mērķa orgāni ir atšķirīgi. MS gadījumā autoimunitāte tieši ietekmē neironu mielīna apvalku, pakāpeniski samazinot signāla pārraidi smadzenēs, tādējādi ierobežojot pacienta pamatspējas. 1TD gadījumā tiek mērķētas aizkuņģa dziedzera šūnas, kā rezultātā rodas insulīna deficīts un nespēja metabolizēt glikozi. Daži pētījumi liecina, ka MS pacientiem ir augstāka iespēja attīstīt 1TD, tāpēc abām slimībām var būt daži kopīgi mehānismi. Tā kā 1TD skar vairāk cilvēku visā pasaulē nekā MS, tā ir salīdzinoši labi pētīta slimība, ja salīdzina abas. No otras puses, MS joprojām ir daudz neskaidrību patofizioloģijā. MS var diagnosticēt ar galvas smadzeņu vai muguras smadzeņu MRI skenēšanu, un, lai veiksmīgi palēninātu progresēšanu, var izmantot uz interferonu balstītas terapijas. Tomēr MS tiek diagnosticēta tikai tad, ja parādās dažāda smaguma simptomi, un pašlaik nav praktiskas metodes kā identificēt MS tās agrīnajā stadijā.

Šī pētījuma galvenais mērķis bija pārbaudīt vairākus bioķīmiskos un ģenētiskos biomarķierus to pielietošanai agrīnai diagnostikai. MS un 1TD slimniekiem tika savāktas asinis, izolēti limfocīti, ekstrahēta DNS un veikti bioķīmiskie un ģenētiskie testi. Pētījuma grupā (MS un 1TD pacienti), salīdzinot ar veselīgu cilvēkiem, tika novērots ievērojams DNS bojājumu un NO līmeņa pieaugums MS gadījumā, savukārt 1TD pacientiem NO līmeni bija pazemināti. Malondialdehīda (MDA) līmeņa novērtējums uzrādīja būtisku samazinājumu pētījuma grupā, kas varētu būt saistīts ar slimību modificējošu terapiju (DMT) ietekmi. Genotipēšana tika veikta svarīgākajiem viena nukleotīda polimorfismiem (SNP) DNS reparācijas gēnos (ATM, PARP1, XPC, XPA un XRCC1). Rezultātus apstiprināja ar nākamās paaudzes sekvencēšanu (NGS) ar 100% rezultātu atbilstību. Ar NGS analizēja arī SNP potenciālajos MS kandidātģēnos (ADAR, GRIA3, ZFAT, CIT, IFNAR2, STARD13, ZFH4), kā arī SNP NOS1 un NOS2 gēnos. Statistiski nozīmīgi rezultāti tika novēroti PARP1 un XRCC1 asociācijām ar MS pacientu NOx un MDA līmeņiem. NOS1 SNP saiknes nelīdzsvarotības analīze arī parādījusi daudzsološu statistisko nozīmīgumu. Turklāt tika veikta zema pārklājuma kopiju skaita variāciju (CNV) analīze un dots ieskats nākotnes perspektīvā.

# SATURA RĀDĪTĀJS

KOPSAVILKUMS .....	3
SAĪSINĀJUMI .....	5
1. IEVADS .....	6
1.1. Multiplās sklerozes etioloģija un mehānisms. ....	6
1.2. Multiplās sklerozes progresēšana un novērtēšana .....	6
1.3. Saistība starp 1. tipa diabētu un multiplo sklerozi .....	6
1.4. Vielmaiņas produkti kā oksidatīvā un nitrozatīvā stresa indikatori .....	7
1.5. DNS bojājumi un aktīvie skābekļa radikāļi. ....	8
1.6. Potenciāli iesaistītie gēni .....	8
2. MĒRĶI UN UZDEVUMI .....	11
3. METODES .....	12
3.1. Pētījuma plāns un pacientu izvēle katram eksperimentam .....	12
3.2. Laboratorijas metodes. ....	12
3.2.1. Plazmas un seruma sagatavošana .....	12
3.2.2. Perifēro asiņu mononukleāro šūnu (PBMC) un DNS izdalīšana. . .	13
3.2.3. Vienas šūnas gēla elektroforēze (sārmainais komētu tests) .....	13
3.2.4. NO noteikšana ar EPR spektroskopiju .....	14
3.2.5. Nitrītu un nitrātu mērījumi serumā un plazmā .....	14
3.2.6. MDA noteikšana ar TBARS testu .....	14
3.2.7. Viena nukleotīda polimorfismu (SNP) genotipēšana .....	15
3.2.8. Nākamās paaudzes sekvencēšana .....	15
3.3. Statistiskā analīze. ....	15
4. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	17
4.1. DNS bojājumi un oksidēto DNS bāzu līmenis .....	17
4.2. Slāpekļa oksīda koncentrācija asinīs .....	18
4.3. Nitrītu un nitrātu koncentrācija plazmā un serumā .....	19
4.4. MDA līmenis plazmā un serumā .....	20
4.5. DNS bojājumi un slāpekļa oksīda metabolīti ITD .....	21
4.6. Saistības starp MS bioķīmiskiem marķieriem .....	22
4.7. Genotipēšana. ....	22
4.8. SNP korelācija ar bioķīmiskajiem marķieriem .....	23
4.9. Zema pārklājuma NGS CNV analīze .....	24
4.10. Ar MS saistīto un slāpekļa oksīda sintāžu gēnu SNP .....	25
5. SECINĀJUMI .....	27
6. TĒZES AIZSTĀVĒŠANAI .....	28
7. PUBLIKĀCIJAS .....	29
8. PĒTĪJUMA APROBĀCIJA .....	30
9. AUTORA IZGLĪTĪBA UN ZINĀTNISKĀ PIEREDZE .....	31
10. PATEICĪBAS .....	32
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	65

## SAĪSINĀJUMI

ITD –	1. tipa diabēts	<i>PARP1</i> –	poli [ADP-ribozes] polimerāze 1
<i>ADAR</i> –	RNS specifiska adenozīna deamināze	<i>PBMNC</i> –	perifēro asiņu mononukleārās šūnas
<i>ANOVA</i> –	dispersijas analīze	<i>PPMS</i> –	primāri rogresējoša multiplā skleroze
<i>ATM</i> –	mutācijas ataksija-telangiektāzija	<i>PRMS</i> –	progresējoši recidivējoša multiplā skleroze
<i>BER</i> –	bāzu ekscīzijas reparācija	<i>ROS</i> –	aktīvie skābekļa rdikāļi
<i>Chr</i> –	hromosoma	<i>RRMS</i> –	recidivējoši remitējoša multiplā skleroze
<i>CIT</i> –	ar citronu Rho mijiedarbojošā serīna/treonīna kināze	<i>SEM</i> –	vidējās vērtības standartklūda
<i>CNV</i> –	kopiju skaita variācija	<i>SIRT6</i> –	sirtuīns 6
<i>DMT</i> –	slimību modificējoša terapija	<i>SNP</i> –	viena nukleotīda polimorfisms
<i>DNS</i> –	dezoksiribonukleīnskābe	<i>SPMS</i> –	sekundāri progresējoša multiplā skleroze
<i>DSB</i> –	divpavedienu pārrāvums	<i>SSB</i> –	vienpavediena pārrāvums
<i>EDTA</i> –	etilēndiamīntetraetiķskābe	<i>TBA</i> –	tiobarbitūrskābe
<i>EPR</i> –	elektronu paramagnētiskā rezonanse	<i>TBARS</i> –	ar tiobarbitūrskābi reaģējošas vielas
<i>EtOH</i> –	etanols	<i>XPC</i> –	<i>Xeroderma Pigmentosum</i> , komplementācijas grupa C
<i>gDNS</i> –	ģenētiskā DNS	<i>XRCCI</i> –	rentgena staru reparācijas krusteniski komplementārais proteīns 1
<i>GRIA3</i> –	glutamāta receptors, jonotrops, <i>AMPA</i> 3	<i>ZFAT</i> –	cinka pirkstu un AT āķa domēns,
<i>HWE</i> –	Hārdija-Veinberga līdzsvars	<i>ZFH4</i> –	cinka pirkstu homeobokss 4
<i>MDA</i> –	malondialdehīds		
<i>MS</i> –	multiplā skleroze		
<i>NGS</i> –	nākamās paaudzes sekvencēšana		
<i>NO</i> –	slāpekļa oksīds		
<i>NOS</i> –	slāpekļa oksīda sintāze		

# 1. IEVADS

## 1.1. Multiplās sklerozes etioloģija un mehānisms

Multiplā skleroze (MS) ir hroniska autoimūna neirodeģeneratīva slimība, kas ietekmē centrālo nervu sistēmu. Precīzs MS cēlonis joprojām nav skaidrs, tomēr ir plaši aprakstīti iespējamie MS attīstības patofizioloģiskie faktori. Viens no MS cēloņiem ir demielinizācija, ko izraisa limfocīti, kas šķērso hematoencefālisko barjeru un izraisa lokālu iekaisumu (Balasa *et al.*, 2021; Tafti *et al.*, 2022).

Sievietes ir apmēram divas reizes uzņēmīgākas pret MS nekā vīrieši. Šī slimība galvenokārt skar cilvēkus vecumā no 20 līdz 40 gadiem, un vairāk nekā 2 miljoni cilvēku visā pasaulē cieš no MS.

Mielīns ir mielīna apvalka galvenā sastāvdaļa, kas pārklāj nervu šūnu ķermeņi un atbalsta signāla pārnesanu no vienas nervu šūnas uz otru (Mallucci *et al.*, 2015). Samazināta signāla pārraide izraisa nervu sistēmas bojājumu un ierobežo organisma sensomotorisko funkciju. Atkarībā no tā, kurš neirons ir bojāts, izrietošie simptomi ir atšķirīgi, sākot no atmiņas traucējumiem līdz vispārējam nogurumam (Garg and Smith, 2015). Visbiežāk sastopamie demielinizācijas (īpaši MS) simptomi ir vājums, sāpīgas muskuļu spazmas, nogurums, neiralģija, depresija, smalkas kognitīvās grūtības un krampji .

## 1.2. Multiplās sklerozes progresēšana un novērtēšana

70–80 % pacientu cieš no recidivējoši remitējošas MS (RRMS). Recidīvi izraisa jaunas neiroloģiskas problēmas vai pasliktina jau esošo stāvokli. Vairumā gadījumu recidīvi ilgst vairāk nekā 48 stundas un attīstās dažu dienu vai nedēļu laikā (Lane and Yadav, 2020; Tafti *et al.*, 2022).

10 līdz 15 gadu laikā pēc MS sākuma 50% RRMS pacientu sākas progresējoša slimības fāze. MS simptomi nepārtraukti pastiprinās šajā fāzē, ko sauc par sekundāri progresējošu MS (SPMS). Trešajai MS formai, ko sauc par primāri progresējošu MS (PPMS), raksturīga progresējoša pasliktināšanās no tās sākuma, un tā rodas 15–20% MS gadījumu. Ceturtais MS veids ir pazīstams kā progresējoši recidivējoša MS (PRMS), tā sastopama 5% pacientu, un to raksturo pakāpeniska deģenerācija un pārklājoši recidīvi (Lane and Yadav, 2020; Tafti *et al.*, 2022).

## 1.3. Saistība starp 1. tipa diabētu un multiplo sklerozi

1. tipa diabētam (1TD) un MS ir kopīgs hronisks un autoimūns raksturs (Pozzilli *et al.*, 2022). Lai gan 1TD un MS tiek uzskatītas par autoimūnām slimībām, kas ir specifiski vērstas uz dažādiem orgāniem, abām slimībām, kā paredzēts, ir kopīgas etioloģiskas un patoloģiskas pazīmes (Handel *et al.*, 2009).

Pētījumi liecina, ka pacienti ar MS ir vairāk pakļauti ITD attīstībai, salīdzinot ar vispārējo populāciju (Pozzilli *et al.*, 2022; Tettey *et al.*, 2015).

Autoimunitāti parasti apraksta no balto asins šūnu perspektīvas, kur T-šūnas, B-šūnas un makrofāgi ir imūnās atbildes galvenie komponenti (Dong *et al.*, 2016; Ingwersen *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2019; Zacca *et al.*, 2021). Interesanti, ka eritrocītiem var būt arī svarīga loma autoimūno slimību patoģenēzē. Baltās asins šūnas veido aptuveni 1% no kopējā asins tilpuma. Atlikušās asinsrites sastāvdaļas ir plazma ar aptuveni 55% no kopējā tilpuma un sarkanās asins šūnas (RBC), kas veido aptuveni 45% no kopējā tilpuma (Geiger *et al.*, 2022). Neskatoties uz to, ka eritrocīti ir izplatīti asinsritē, tie parasti netiek izskatīti kā daļa no imūnās atbildes, jo tiem trūkst kodola vai iekšējo organelļu. Organelļu trūkumu kompensē dažādi funkcionāli aktīvi receptori un transportieri šūnas membrānā (Crisp *et al.*, 2016). Ir arī zināms, ka RBC piedalās galveno imūnās atbildes molekulu ATP un slāpekļa oksīda (NO) izdalīšanā. Pētījumi ir parādījuši noteiktas novirzes šo molekulu līmeņos autoimūno slimību gadījumos (Geiger *et al.*, 2022).

#### **1.4. Vielmaiņas produkti kā oksidatīvā un nitrozatīvā stresa indikatori**

Nekontrolēts oksidatīvais stress, prooksidantu un antioksidantu neatbilstība var izraisīt oksidatīvus bojājumus šūnām, audiem un orgāniem. Ir zināms, ka, piemēram, lipidus ietekmē radikāļi un to starpā aktīvie skābekļa radikāļi (ROS). Ir daudzi mehānismi, kas izraisa ROS veidošanos, tostarp enzīmu reakcijas un/vai dažādu savienojumu, piemēram, kateholamīnu un hidrohinona, autooksidācija. Galvenie ROS avoti ir mitohondriji, plazmas membrāna, endoplazmatiskais tīkls un peroksisomas (Jankū *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020). Ir svarīgi atzīmēt, ka aknās veidojas ROS daudzu eksogēnu avotu, tostarp jonizējošā starojuma, ultravioleto staru, tabakas dūmu, patogēnu infekciju, vidē esošo ķīmisko vielu un herbicīdu/insekticīdu ietekmes rezultātā.

Daudzus gadus, kopš omega-3 un omega-6 taukskābju lipīdu peroksidāciju var viegli noteikt, izmantojot MDA kombinācijā ar tiobarbitūrskābi (TBA), MDA tiek izmantots kā lēts biomarkieris lipīdu peroksidācijai (Ito *et al.*, 2019; Mas-Bargues *et al.*, 2021). Kad TBA reaģē ar MDA, veidojas intensīvas sarkanas krāsas hromogēns fluorescējošs addukts. Šo metodi sākotnēji izstrādāja pārtikas ķīmiķi, lai novērtētu tauku un eļļu autooksidatīvo noārdīšanos. Jāatzīmē, ka tiobarbitūrskābes reaģējošo vielu (TBARS) tests ir ļoti nespecifisks, un tas ir izraisījis ievērojamas domstarpības par tā izmantošanu kā līdzekli MDA līmeņa noteikšanai no *in vivo* paraugiem.

NO, radikālam, kas izraisa nitrozatīvo stresu, ir svarīga loma daudzos cilvēku veselības aspektos, tostarp eksitotoksicitātē, olbaltumvielu modifikācijā un citos patofizioloģiskos procesos. Slāpekļa oksīda sintāze (NOS) zidītājiem ražo NO, šķeļot L-arginīnu L-citrulīna un NO molekulās (Akanji *et al.*, 2020;



Correa-Aragunde *et al.*, 2018). Ir zināmas trīs NOS izoformas – endotēliālā NOS (eNOS), inducējamā NOS (iNOS) un neironālā NOS (nNOS) (Wang *et al.*, 2020).

Nav šaubu, ka NO spēlē nozīmīgu lomu cilvēka organisma normālā funkcionalitātē, taču tam ir arī patofizioloģiska ietekme uz organismu. Izmantojot dažādus mehānismus, NO reaģē ar ROS šūnu vidē, veidojot ļoti reaktīvas molekulas, kas bojā šūnu komponentus molekulārā līmenī (Fairless *et al.*, 2021).

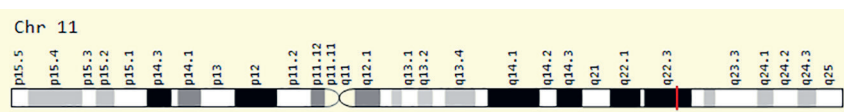
## 1.5. DNS bojājumi un aktīvie skābekļa radikāļi

Ir divi galvenie DNS bojājumu veidi: endogēns un eksogēns. Endogēnā DNS bojājuma laikā ROS un ūdens, kas dabiski atrodas šūnās, tiek iesaistīti hidrolītiskās un oksidatīvās reakcijās ar ķīmiski aktīvo DNS. Vairākas ģenētiskas slimības un sporādiskus vēža veidus izraisa šis raksturīgās mijiedarbības starp DNS un tās tuvākās apkārtnes molekulām. Pretstatā endogēniem DNS bojājumiem eksogēni DNS bojājumi rodas, ja fiziski, ķīmiski un vides faktori bojā DNS. Šo vielu piemēri ir alkilētāji, UV un jonizējošais starojums un šķērssaistīšanas līdzekļi (Chatterjee and Walker, 2017).

Dažādi ķīmiski un fizikāli faktori var izraisīt ļoti bīstamos DNS divpavedienu pārrāvumus (DSB) (Cannan and Pederson, 2016). Daudzas cilvēku slimības, ieskaitot ļaundabīgos audzējus, ir saistīti ar neregulāriem DSB (Tiwari and Wilson, 2019).

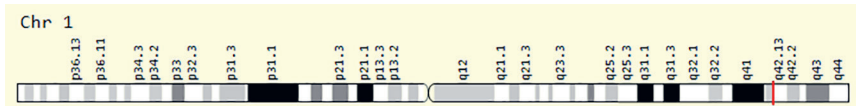
## 1.6. Potenciāli iesaistītie gēni

ATM gēns atrodas 11. hromosomā: 108 223 044-108 369 102; 11q22.3 (1. att.), tas ir 146 059 bāzes liels un orientēts plus pavedienā (“Gene: ATM (ENSG00000149311) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107”).



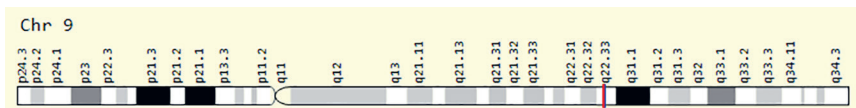
1. attēls. ATM gēna lokalizācija genomā: joslas saskaņā ar Ensembl, atrašanās vietas saskaņā ar GeneLoc (Gene: ATM (ENSG00000149311) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107).

PARP1 gēns atrodas 1. hromosomā: 226 360 210-226 408 154; 1q42.12 (2. att.), tas ir 47 403 bāzes liels un orientēts mīnus pavedienā (“Gene: PARP1 (ENSG00000143799) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107”).



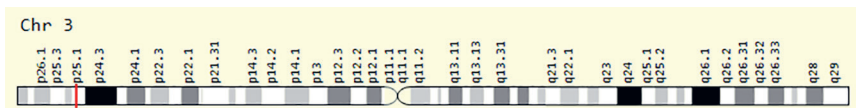
2. attēls. PARP1 gēna lokalizācija genomā: joslas saskaņā ar Ensembl (*Gene: PARP1 (ENSG00000143799) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107*)

XPA atrodas 9. hromosomā: 97 654 398-97 697 340; 9q22.33 (3. att.), tas ir 47 403 bāzes liels un ir orientēts mīnus pavedienā (“Gene: XPA (ENSG00000136936) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107”).



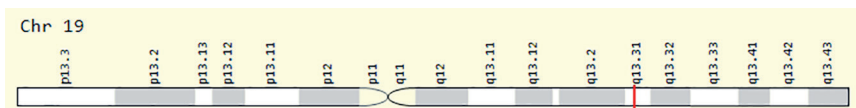
3. attēls. XPA gēna lokalizācija genomā: joslas saskaņā ar Ensembl (*Gene: XPA (ENSG00000136936) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107*).

XPC gēns atrodas 3. hromosomā: 14,145,147-14,178,621; 3p25.1 (4. att.), tas ir 33 475 bāzes liels un orientēts mīnus pavedienā (“Gene: XPC (ENSG00000154767) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107”).



4. attēls. XPC gēna lokalizācija genomā: joslas saskaņā ar Ensembl (*Gene: XPC (ENSG00000154767) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107*)

XRCC1 gēns atrodas 19. hromosomā: 43 543 311-43 580 473; 3p25.1 (5. att.), tas ir 37 163 bāzes liels un orientēts mīnus pavedienā (“Gene: XRCC1 (ENSG00000073050) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107”).



5. attēls. XRCC1 gēna lokalizācija genomā: joslas saskaņā ar Ensembl (*Gene: XRCC1 (ENSG00000073050) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107*).

SIRT6 gēna kodētais proteīns pieder sirtuīnu saimei – NAD atkarīgiem enzīmiem, kam ir galvenā loma rezistencē pret šūnu stresu, genoma stabilitātē, novecošanā un enerģijas homeostāzē. DNS reparācija, telomēru hromatīna uzturēšana, iekaisumss, lipīdu un glikozes metabolisms ir dažas no šī gēna kodētā proteīna funkcijām. Transkripti, kas kodē dažādas izoformas, var veidoties alternatīvā splaisinga rezultātā (*SIRT6 sirtuin 6 [Homo sapiens (human)] – Gene – NCBI*).

Visa genoma izpēte, ko publicēja Comabella ar kolēģiem 2009. gadā, aprakstīja SNP saistību ar atbildi IFN- $\beta$  terapijai (Comabella *et al.*, 2009). Visaugstāk novērtētie SNP ir šādos gēnos: cinka pirksti, kas satur AT āķa domēnu (*ZFAT*); jonotropais glutamāta receptors, AMPA 3 (*GRIA3*); ar StAR saistītais lipīdu pārneses (*START*) domēna proteīns 13 (*STARD13*); RNS specifiskā adenozīna deamināze, (*ADAR*); cinka pirkstu homeobokss 4 (*ZFX4*); interferona ( $\alpha$ ,  $\beta$  un  $\omega$ ) receptors 2 (*IFNAR2*) un ar citronu Rho mijiedarbojošā serīna/ treonīna kināze (*CIT*) (Bourguiba-Hachemi *et al.*, 2016).

## 2. MĒRĶI UN UZDEVUMI

**Pētījuma mērķis:** Pārbaudīt dažādus bioķīmiskos un ģenētiskos biomarķierus, un noteikt to saistību ar autoimunitāti attiecībā uz MS un T1D.

### **Uzdevumi mērķa sasniegšanai:**

1. Novērtēt DNS bojājumus MS un ITD, un oksidētās bāzes MS pacientu asinīs un limfocītos un salīdzināt to ar veseliem cilvēkiem
2. Novērtēt NO līmeni MS un ITD pacientu plazmā un serumā un salīdzināt to ar veseliem cilvēkiem.
3. Novērtēt MDA līmeni MS pacientu plazmā un serumā.
4. Izpētiet saistību starp katru bioķīmisko marķieri
5. Izpētīt saistību starp bioķīmiskiem marķieriem un pacienta klīniskajiem parametriem
6. Identificēt iespējamus SNP DNS reparācijas gēnos ATM, PARP1, XPC, XPA, XRCC1 un novērtēt to nozīmi.
7. Izpētīt SNP saistību ar bioķīmiskiem marķieriem.
8. Novērtēt iespējamo CNV ar zema pārklājuma NGS un identificējiet citus SNP, kas varētu būt saistīti ar šī pētījuma tēmu, izmantojot 30x pārklājuma NGS.

### 3. METODES

Asinis ņēma profesionāli medicīnas darbinieki Latvijas Jūras medicīnas centrā. Šī pētījuma veikšanai tika saņemta Latvijas Republikas Centrālās medicīnas ētikas komitejas atļauja Nr.1/17-10-10 (saņemts 10.10.2017). No katra pētījuma dalībnieka tika iegūta informēta piekrišana.

#### 3.1. Pētījuma plāns un pacientu izvēle katram eksperimentam

Asinis tika iegūtas ar vēnas punkciju un savāktas plastmasas kapilāros ar heparīnu (Microvetter CB 300, Sarstedt, Vācija) EPR spektrometrijai un ar EDTA (BD Vacutainer K2E EDTA 10,8 mg, BD-Plymouth, Apvienotā Karaliste) komētu testam.

SNP genotipēšana tika veikta 96 pacientiem kā kohortas pētījums. Bioķīmisko analīžu (komētu tests, NO noteikšana, nitrātu un nitrītu līmeņi, MDA līmeņi) pētījuma grupā piedalījās 26 brīvprātīgie no ārsta pieraksta un tās pašas 96 pacientu kolekcijas.

96 paraugu pētījuma grupā bija 78,1% sieviešu un 21,9% vīriešu, sieviešu un vīriešu attiecība bija aptuveni 4:1. 43,8% pacientu bija RRMS apakštips, un 56,2% pacientu attīstījās SPMS stadija. Pētījuma grupas vidējais vecums bija  $50,7 \pm 10,7$  gadi ar vidējo vērtību 51,5 un IQR 16 gadi.

Veseli subjekti bija brīvprātīgie, kuri piekrita piedalīties pētījumā un parakstīja informētu piekrišanu. Veselas personas tika izmantotas kā kontroles tikai tad, ja nebija dokumentētu pierādījumu par hroniskām un autoimūnām slimībām. Komētu testa un EPR kontroles grupā bija 22 veseli subjekti: 7 vīrieši un 15 sievietes vecumā no 21 līdz 55 gadiem (grupas vidējais vecums  $30,6 \pm 3,2$  gadi). Slāpekļa oksīda metabolītu un MDA kontroles grupā bija 25 veseli subjekti: 4 vīrieši un 21 sieviete vecumā no 20 līdz 43 gadiem (grupas vidējais vecums  $34,2 \pm 1,7$  gadi).

ITD pētījuma grupā bija 71 pacients (45 vīrieši un 55 sievietes) ar vidējo vecumu 33 (27,0–44,5) gadi. T1D kontroles grupā bija 57 veseli subjekti (39 vīrieši un 61 sieviete) ar vidējo vecumu 24 (21–31) gadi.

60 paraugi no 96 paraugu kolekcijas tika jauši izvēlēti NGS CNV analīzei un 12 DNS paraugi 30x pārklājuma NGS analīzei.

#### 3.2. Laboratorijas metodes

##### 3.2.1. Plazmas un seruma sagatavošana

Asinis tika savāktas ar EDTA apstrādātās mēģenēs BD Vacutainer K2E EDTA 10,8 mg (BD-Plymouth, Apvienotā Karaliste) plazmas sagatavošanai, kā arī EDTA nesaturošās mēģenēs (BD-Plymouth, Apvienotā Karaliste) seruma sagatavošanai. Pēc tam paraugus centrifugēja ar ātrumu  $1500 \times g$ , noņēma supernatantu un sagatavoja 0,5 ml alikvotas daļas.

### 3.2.2. Perifēro asiņu mononukleāro šūnu (PBMC) un DNS izdalīšana

PBMC izolācija tika veikta saskaņā ar standarta Hitopaque-1077 protokolu, ko nodrošināja *Sigma-Aldrich*.

DNS izdalīšana tika veikta saskaņā ar standarta tehniku, atdalot šķidro fāzi no šūnu nogulsnēm un pēc tam pievienojot 3 ml līzes buferšķiduma (10 mM TRIS, 0,4 M HCl, 0,32 M saharozes, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton-X 100, pH = 7,5). Pēc līzei sekojošas centrifugēšanas nogulsnes tika atkārtoti suspendētas 1,5 ml resuspensijas buferšķidumā (120 mM NaCl, 15 mM EDTA, pH = 8,0). Resuspensijai pievienoja proteināzi K, RNāzi, 10% SDS un inkubēja 2 stundas 56 °C. Pievienoja 5 M NaCl šķidrumu, maisījumu centrifugēja, supernatantu pārnesa jaunā mēģenē un pievienoja 96% ledus aukstu EtOH. Pēc vienas nakts inkubācijas –20 °C šūnu nogulsnes tika atdalītas un mazgātas ar 70% EtOH. Supernatants tika izmests, un nogulsnes tika atkārtoti suspendētas ūdenī.

### 3.2.3. Vienas šūnas gēla elektroforēze (sārmains komētu tests)

Mikroskopa stikla priekšmetstikliņus iepriekš pārklāja ar 0,5% III tipa agarozī (*Sigma-Aldrich*, Vācija). Svaigas asinis (vai izolētas PBMC) sajauc ar 120 μl iepriekš uzkaršētu 1% zemas kušanas agarozī (*Sigma-Aldrich*, Vācija) un uz priekšmetstikliņa uznesa 100 μl maisījuma. Šūnu membrānas tika lizētas, ievietojot priekšmetstikliņu aukstā līzes buferšķidumā (2,5 M NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, pH 10 [*AppliChem*, Vācija], 1% Triton-X 100, 5% DMSO [*Sigma-Aldrich*, Vācija]) uz 1–24 stundām. Pēc lizēšanas šūnas ievietoja elektroforēzes kamerā, kas piepildīta ar attīšanas buferšķidumu (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH, pH 13,2) un 20 minūtes turēja pilnīgā tumsā 4 °C temperatūrā. Pēc tam elektroforēzi veica tajā pašā buferšķidumā 20 minūtes pie 300 mA un 1 V/cm. Tad priekšmetstikliņus žāvēja gaisā un skaloja ar 0,4 M Tris buferšķidumu (pH 7,5) divas reizes pa 5 minūtēm. Pēc tam priekšmetstikliņus neitralizēja un 10 minūtes fiksēja ar 96% EtOH un tad iekrāsoja ar etīdija bromīdu. Paraugi tika analizēti ar fluorescences mikroskopu (Leica DFC295, Vācija), kas aprīkots ar 515 – 560 nm ierosmes filtru un 590 nm barjerfiltru. Šūnas tika vizuāli iedalītas piecās klasēs (A0 – A4) no 0. klases (nesabojātas, nav saskatāmas astes) līdz 4. klasei (gandrīz visa DNS astē, nenozīmīga galva). DNS bojājumu indekss (D) nosacītās vienībās tika aprēķināts šādi:  $D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4$ .

Modificētajā komētas testā tika ievērota iepriekšminētā procedūra, pievienojot inkubācijas etapu ar enzimatiskām reakcijām (40 ml HEPES [*Sigma-Aldrich*, Vācija], 0,1 M KCl [*Sigma-Aldrich*, Vācija], 0,5 mM EDTA [*Sigma-Aldrich*, Vācija], 0,2 mg/ml vērša seruma albumīnu (BSA) [*Sigma-Aldrich*, Vācija], pH 8), kā arī pēc līzes pievienojot uz priekšmetstikliņa enzīmus formamidopirimidīna DNS glikozidāzi (Fpg [*NEB*, Apvienotā Karaliste]) un endonukleāzi III (EndoIII *NEB*, Apvienotā Karaliste).

### 3.2.4. NO noteikšana ar EPR spektroskopiju

1 ml svaigu asiņu sajauc ar 20 mg dietilditiokarbamāta (*Sigma-Aldrich*, Vācija). 0,4 ml tika ievilkti insulīna šļircē un nekavējoties sasaldēti šķidrā slāpekļi. Sasaldētais cilindrs tika izspiests no šļircēs un ievietots kvarca djuārā ER 167 FDS-Q (*Bruker, Karlsruhe*, Vācija), kas piepildīts ar šķidro slāpekli. NO koncentrācija tika noteikta, mērot NO komponenti Fe-DETC-NO spektrā. Kvantitatīviem mērījumiem tika izmērīts slāpekļa tripleta komponentes ( $g = 2,031$ ) augstums un salīdzināts ar kalibrēšanas likni. EPR spektri tika reģistrēti šķidrā slāpekļi, izmantojot EPR spektrometru Radiopan SE/X2544 (Polija). EPR mērījumu parametri bija: 25 mW mikroviļņu jauda, 9,24 GHz mikroviļņu frekvence, 100 kHz modulācijas frekvence, 0,5 mT modulācijas amplitūda un  $5 \times 10^5$  uztvērēja pastiprinājums.

### 3.2.5. Nitrītu un nitrātu mērījumi serumā un plazmā

Nitrītu un nitrātu noteikšanai tika izmantots hemiluminiscences detektors Sievers NOA-280i (*Analytix*, Apvienotā Karaliste).

Nitrītu mērījumiem tika sagatavota virkne  $\text{NaNO}_2$  standartšķīdumu. mV vērtības tika izmērītas  $1 \mu\text{M NO}_2^-$ ,  $5 \mu\text{M NO}_2^-$ ,  $10 \mu\text{M NO}_2^-$  un  $50 \mu\text{M NO}_2^-$  un izveidota lineāra kalibrēšanas likne.

Nitrātu mērījumiem tika sagatavota virkne  $\text{NaNO}_3$  standartšķīdumu. mV vērtības tika izmērītas  $1 \mu\text{M NO}_3^-$ ,  $5 \mu\text{M NO}_3^-$ ,  $10 \mu\text{M NO}_3^-$  un  $50 \mu\text{M NO}_3^-$  un izveidota lineāra kalibrēšanas likne.

50  $\mu\text{L}$  katra plazmas vai seruma parauga tika ievadīti 5 ml reducētāja (50 mg NaI [*Sigma-Aldrich*, Vācija] 0,5 ml dejonizēta ūdens un sajaucot ar 4,5 ml ledus etiķskābes [*Sigma-Aldrich*, Vācija]). Nitrītu koncentrācijas tika aprēķinātas no kalibrēšanas liknes.

50  $\mu\text{L}$  katra plazmas vai seruma parauga tika ievadīti 100 ml reducētāja (0,8 g  $\text{VCl}_3$  [*Sigma-Aldrich*, Vācija] 1 M HCl [*Sigma-Aldrich*, Vācija] un filtrēja caur filtrpapīru). Nitrātu koncentrācijas tika aprēķinātas no kalibrēšanas liknes.

### 3.2.6. MDA noteikšana ar TBARS testu

Mērījumus veica ar Lambda 25 UV-VIS spektrometru (*PerkinElmer*, Apvienotā Karaliste) 1 cm biežās vienreizējās lietošanas kivetēs (*Sarstedt*, Vācija). 4,0 mM TBA standartšķīdumu sagatavoja, izšķīdinot 57,66 mg TBA (*Sigma-Aldrich*, Vācija) 100 ml 99,5% ledus etiķskābes (*Sigma-Aldrich*, Vācija). 1 mM MDA standarta izejas šķīdumu sagatavoja, izšķīdinot 31,35 mg malondialdehīda tetrabutilamonija sāls (*Sigma-Aldrich*, Vācija) 100 ml 99,5% ledus etiķskābes. Tika sagatavoti 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 un 0,8 mM standartšķīdumi. 500  $\mu\text{l}$  plazmas vai seruma tika sajaukti ar 500  $\mu\text{l}$  4,0 mM TBA standartšķīdumu. Katra parauga absorbcija tika mērīta pie 532 nm.

### 3.2.7. Viena nukleotīda polimorfismu (SNP) genotipēšana

Tika genotipēti šādu gēnu SNP: ATM rs189037, PARP1 rs1136410, XPA rs1800975, XPC rs2228001, XRCC1 rs1799782 un XRCC1 rs25487. Praimeri tika izstrādāti atbilstoši interesējošajam gēnam. PCR amplifikācijas iestatījumi tika izvēlēti atbilstoši praimeriem. Restrikcija tika veikta saskaņā ar interesējošajā gēnā esošajām restrikcijas vietām. PCR produktu un restrikcijas produktu kvalitāti novērtēja ar gēla elektroforēzi. Parametri tika iestatīti atbilstoši aptuvenajam fragmenta izmēram.

### 3.2.8. Nākamās paaudzes sekvenčēšana

DNS integritāti pārbaudīja ar Nanodrop (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> jābūt diapazonā no 1,8 līdz 2,0). Sekvenčēšana tika veikta, pamatojoties uz Latvia MGI Tech DNBSEQ-G400RS. Bibliotēka tika sagatavota manuāli, izmantojot MGIEasy FS DNA Library Prep Kit. Kvalitātes kontrole tika veikta ar Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, ASV), un fragmenta lielums tika noteikts ar Agilent 4200 TapeStation (Agilent, ASV). Visi DNS paraugi tika sekvenčēti, izmantojot PE150 pieeju, kopā ar 310 nolasījumiem katrā paraugā (150 katram nolasījumam un 10 svītrkodiem). Cilvēka paraugu sekvenčēšanas dziļums bija 30 reizes ar aptuveni 80 Gb datu uz vienu paraugu. Zema pārklājuma CNV analīze, kas veikta 60 paraugiem ar vidējo dziļumu 1× vienam paraugam.

## 3.3. Statistiskā analīze

Lai noteiktu, vai skaitliskie dati atbilst normālajam sadalījumam, tika izmantoti Šapiro–Vilka vai Kolmogorova–Smirnova testi. Metodes izvēli noteica izlases kopas lielums:  $n < 50$  – Šapiro – Vilks;  $n > 50$  – Kolmogorovs–Smirnovs.

Grupu salīdzinājums tika veikts ar parametrisko t-testu, ja divas grupas ievēroja normālo sadalījumu, un vienvirziena ANOVA testu, ja grupu skaits bija lielāks par divām. Datiem, kas neietilpa normālā sadalījumā, tika veikts Manna–Vitnija tests divu grupu salīdzināšanai un Kruskala–Vallisa tests vairāku grupu salīdzināšanai.

Pirms korelācijas analīzes katram SNP tika aprēķināts Hārdija–Veinberga līdzsvars. Bioķīmiskā un ģenētiskā biomarkiera korelācija tika novērtēta ar Pīrsona r (datiem pēc normāla sadalījuma) vai Spīrmena ρ (datiem ārpus normālā sadalījuma) testiem.

Statistiskā analīze tika veikta, izmantojot IBM SPSS Statistics v25.0 programmatūru. Korelācijas attēli tika sagatavoti ar Python3.

FastQ neapstrādātie dati no sekvenatora DNBSEQ-G400RS tika augšupielādēti HPC (no angļu valodas – High Performance Computing) platformā, un automātiskā kvalitātes kontroles analīze tika veikta, izmantojot MegaBOLT visa genoma sekvenčēšanas (WGS) metodi ar iebūvētu uzlabotu SOAPnuka



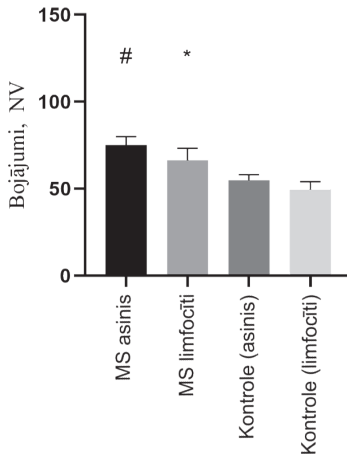
algoritmu. Genoma kartēšana tika veikta manuāli, izmantojot Integrative Genomic Viewer (IGV) v.2.11.9 (Broad Institute and the Reagent of University of California; pieejams [www.igv.org](http://www.igv.org)) programmatūru.

Genotipēšanas un sekvencēšanas SNP datu statistiskā analīze tika veikta, izmantojot SNPstats tiešsaistes statistikas rīku (Katalonijas Onkoloģijas institūts, Spānija; pieejams [www.snpstats.net](http://www.snpstats.net)).

## 4. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

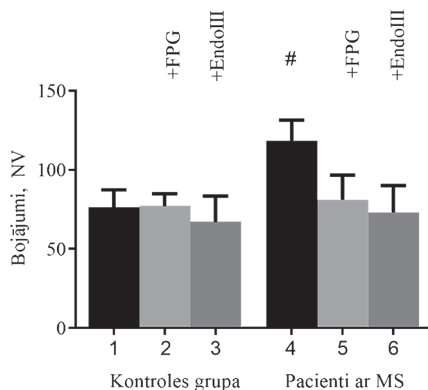
### 4.1. DNS bojājumi un oksidēto DNS bāzu līmenis

DNS bojājumu līmenis (nosacītās vienībās), ko noteica ar sārmaino komētas testu, bija līdzīgs kopējā balto asins šūnu frakcijā (asinīs) un izolētos PBMNC. DNS bojājumu līmenis gan kopējā balto asins šūnu frakcijā, gan izolētos PBMNC MS pacientiem bija augstāks nekā kontroles grupā (6. att.).



6. attēls. DNS bojājumu līmenis (nosacītās vienībās – NV) asinīs un izolētos PBMC MS pacientiem ( $n = 26$ ) un kontroles grupā ( $n = 22$ ). Dati parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  SEM. # un  $*-p < 0,05$  asinīs un izolētos PBMC MS grupai pret kontroles grupu.

Modificētā komētas testa rezultāti (7. att. – 1. un 4.) liecina par paaugstinātu DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni pacientiem ar MS, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem. Šis novērojums papildina iepriekšminētos sārmainā komētas testa rezultātus. Lai novērtētu oksidēto bāzu skaitu, dati par DNS bojājumiem tika atņemti no enzīmu izraisītu bojājumu datiem. Acīmredzot oksidēto bāzu līmenis ir līdzīgs MS grupā (7. att. – 5. un 6.) un kontroles grupā (7. att. – 2. un 3.) Individuālās novirzes starp pacientiem bija ļoti mainīgas, bet statistiski nozīmīgas atšķirības netika sasniegtas ( $p = 0,919$ ).



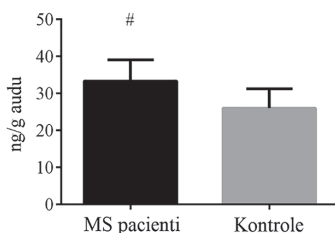
7. attēls. Modificētā komētas testa dati, kas parāda DNS bojājumu līmeni (nosacītās vienības – NV) un oksidēto bāzu līmeni PBMNC kontroles grupā un pacientiem ar MS. 1 – veselu subjektu kopējais DNS bojājums; 2 un 3 – oksidēto bāzu līmenis veseliem cilvēkiem; 4 – kopējais DNS bojājums pacientiem ar MS; 5 un 6 – oksidēto bāzu līmenis pacientiem ar MS. Dati parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  SEM. #  $p < 0,05$  pret kontroles grupu; oksidēto bāzu līmenis nebija statistiski nozīmīgs ( $p = 0,9190$ ).

## 4.2. Slāpekļa oksīda koncentrācija asinīs

Tiešs radikāļu mērījums, kas iegūts ar EPR spektroskopiju, liecina par palielinātu slāpekļa oksīda koncentrāciju asinīs.

Vairāki pētījumi ir parādījuši, ka NO ir nozīmīga loma MS patoģenēzē, jo paaugstināta inducējamās NO sintāzes (iNOS) aktivitāte ir glijā un mitohondriju bojājuma gadījumā pirms demielinizācijas (Lan *et al.*, 2018; Mancini *et al.*, 2018). Slāpekļa oksīda metabolītu atšķaidīšanās dēļ smadzenēs slāpekļa oksīda metabolītu līmenis ne vienmēr ir paaugstināts (Haghikia *et al.*, 2015).

NO koncentrācija (ng/g audu) bija augstāka pacientiem ar MS (8. att.), un atšķirība starp kontroles grupu un pētījuma grupu bija statistiski nozīmīga  $p < 0,0001$ .



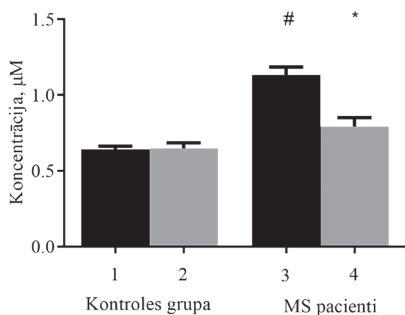
8. attēls. NO koncentrācija (ng/g audu) MS pacientu un veselu cilvēku (kontroles grupas) asinīs. Dati parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  SEM. # –  $p < 0,05$  pret kontroles grupu.

Ievērojamu kopējo DNS bojājumu pieaugumu varētu būt izraisījis oksidatīvais stress kā viens no galvenajiem faktoriem, kas ietekmē DNS integritāti. Paaugstināta NO koncentrācija domājams ir saistīta ar palielinātu NO sintēzes aktivitāti un NO vielmaiņas produktu uzkrāšanos. Tādējādi, lai apstiprinātu šos pieņēmumus, bija nepieciešama padziļināta analīze.

### 4.3. Nitrītu un nitrātu koncentrācija plazmā un serumā

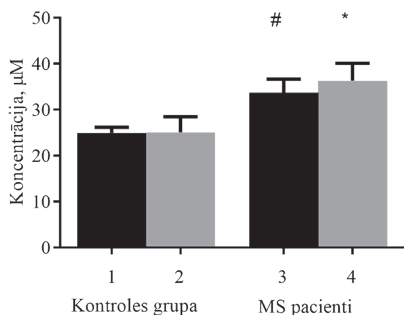
Iepriekšējos pētījumos ir ziņots, ka nitrītu un nitrātu līmenis (NOx) pacientiem ar optisko neiromielītu ir līdzīgs NOx līmenim MS pacientiem (Haghikia *et al.*, 2015). NOx līmenis serumā ir ievērojami paaugstināts pacientiem, kuri cieš no akūta diseminēta encefalomielīta, salīdzinot ar MS pacientiem (Fominykh *et al.*, 2016). Saskaņā ar Lan un līdzstrādnieku pētījumu (Lan *et al.*, 2018) iNOS radītā NO pārprodukcija oligodendrocītos var būt atbildīga par NO metabolītu koncentrācijas palielināšanos asins plazmā un serumā.

Kā redzams 9. attēlā, veselīem indivīdiem nitrītu koncentrācija plazmā un serumā ir vienā līmenī: plazmā  $0,64 \pm 0,02 \mu\text{M}$  (9. att.; kontroles grupa – P) un serumā  $0,65 \pm 0,04 \mu\text{M}$  (9. att.; kontroles grupa – S). Turpretī pacientiem ar MS nitrītu līmenis plazmā un serumā ir ievērojami augstāks nekā veselīem cilvēkiem, turklāt plazmā nitrītu koncentrācija ir augstāka nekā serumā: plazmā  $1,13 \pm 0,05 \mu\text{M}$  (9. att.; pacienti ar MS – P) un serumā  $0,79 \pm 0,06 \mu\text{M}$  (9. att.; pacienti ar MS – S).



9. attēls. Nitrītu koncentrācija ( $\mu\text{M}$ ) asins plazmā un serumā pacientiem ar MS un veselīem cilvēkiem. P un S – attiecīgi plazmas un seruma paraugi. Dati ir parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  SEM. # un \*  $p < 0,05$  salīdzinājumā ar kontroles grupu.

Nitrātu koncentrācijai (10. att.) ir līdzīga tendence kā nitrītu koncentrācijai. Proti, gan veselu cilvēku plazmā, gan serumā nitrātu līmenis ir vienāds – plazmā  $24,98 \pm 1,20 \mu\text{M}$  (10. att.; kontroles grupa – P) un serumā  $25,05 \pm 3,44 \mu\text{M}$  (10. att.; kontroles grupa – S). Paraugi, kas ņemti no pacientiem ar MS, liecina par lielāku nitrātu daudzumu gan plazmā, gan serumā – plazmā  $33,67 \pm 2,97 \mu\text{M}$  (10. att.; pacienti ar MS – P) un serumā  $36,30 \pm 3,81 \mu\text{M}$  (10. att.; pacienti ar MS – S).

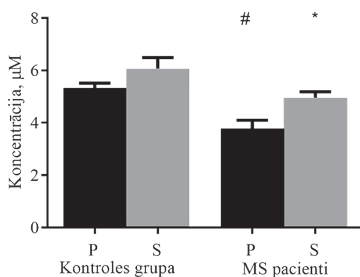


10. attēls. Nitrātu koncentrācija ( $\mu\text{M}$ ) asins plazmā un serumā pacientiem ar MS un veseliem cilvēkiem. P un S – plazmas un seruma paraugi. Dati ir parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  SEM. # un \*  $p < 0,05$  salīdzinājumā ar kontroles grupu.

Šajā pētījumā ziņots par NOx līmeņa paaugstināšanos MS pacientu serumā, kas atbilst augstākam NOx līmenim, kas ziņots iepriekšējos pētījumos par daudzām citām demielinizējošām slimībām.

#### 4.4. MDA līmenis plazmā un serumā

Adamczuk un kolēģu pētījumā (2017) novērtēts MDA līmenis serumā MS pacientiem, kas ārstēti ar trīs dažādām zālēm, kā arī nesen diagnosticētiem MS pacientiem. Pētījumā atklāts, ka nesen diagnosticētiem pacientiem ar RRMS ir visaugstākais MDA līmenis serumā. MDA līmenis ar zālēm ārstēto pacientu serumā ir zemāks nekā kontroles paraugos. (Adamczyk *et al.*, 2017). Zemāks MDA līmenis ir pretrunā ar Saif Eldeen un kolēģu konstatējumu, ka pacientiem ar MS ir paaugstināts MDA līmenis serumā (Saif Eldeen *et al.*, 2019). Turpretim Noroozi pētījumā ir atklāts, ka pacientu seruma MDA ievērojami samazinās pēc ārstēšanas ar IFN- $\beta$  1a (Noroozi *et al.*, 2017).

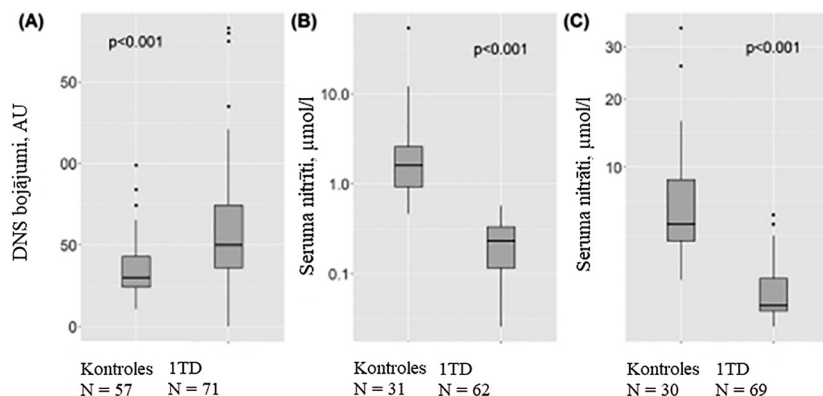


11. attēls. MDA koncentrācija plazmā un serumā ( $\mu\text{M}$ ), noteikta ar TBARS testu, P un S – plazmas un seruma paraugi. Dati ir parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  SEM ( $\mu\text{M}$ ). # un \* – nepāra t-tests  $p < 0,05$  salīdzinājumā ar kontroles grupu.

Rezultāti, kas parādīti 11. attēlā, liecina par MDA līmeņa samazināšanos MS pacientu plazmā un serumā, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem. Plazmas un seruma kontroles paraugos ir attiecīgi  $5,33 \pm 0,19 \mu\text{M}$  MDA (11. att.; Kontroles grupa – P) un  $6,07 \pm 0,42 \mu\text{M}$  MDA (11. att.; Kontroles grupa – S). Attiecībā uz MDA līmeņiem MS pacientu plazmā un serumā –  $3,78 \pm 0,32 \mu\text{M}$  MDA (11. att.; pacienti ar MS – P) un  $4,95 \pm 0,23 \mu\text{M}$  MDA (11. att.; Pacienti ar MS – S).

#### 4.5. DNS bojājumi un slāpekļa oksīda metabolīti 1TD

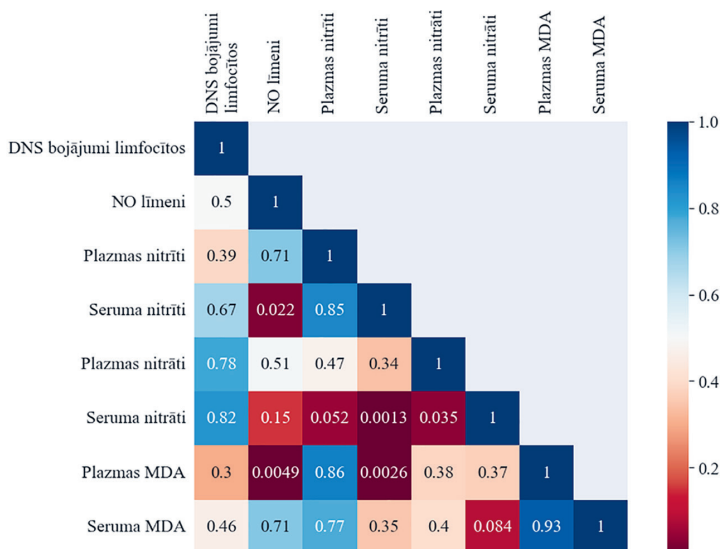
Visi dati izrādījās statistiski nozīmīgi ar p vērtībām  $< 0,001$ . Pacientiem ar 1. tipa cukura diabētu bija augstāks DNS bojājumu līmenis (12. att. – A) nekā kontroles grupā, bet arī augsta standarta kļūda katrā grupā. Nitrātu un nitrītu gadījumā pacienti ar 1. tipa cukura diabētu bija zemāks gan nitrītu (12. att. – B), gan nitrātu (12. att. – C) līmenis, arī ar augstām standarta kļūdām abās pieejās.



12. attēls. DNS bojājumi, seruma nitrītu un nitrātu koncentrācija leikocītos veseliem indivīdiem un pacientiem ar 1. tipa cukura diabētu. (A) DNS bojājumu līmenis leikocītos, kas izteikts AU. (B) Seruma nitrītu koncentrācija (log10 transformēta y ass). (C) nitrātu koncentrācija serumā (sqrt-transformēta y ass).

## 4.6. Saistības starp MS bioķīmiskiem marķieriem

Vissvarīgākie novērojumi tika veikti, korelējot NO līmeni ar seruma nitrītu un plazmas MDA līmeņiem ar  $p$  vērtībām 0,022 starp NO un seruma nitrītu līmeni un 0,0049 starp NO un plazmas MDA līmeni attiecīgi. Abos gadījumos ir vidēja apgrieztā korelācija (korelācijas koeficienti svārstās no  $\pm 0,40$  līdz  $\pm 0,60$ ). Tika arī novērota vēl viena nozīmīga korelācija starp plazmas MDA līmeni un nitrītu līmeni serumā ar  $p$  vērtību 0,0026. Korelācijas tika vizualizētas kā siltuma karte 13. attēlā.



13. attēls. Identificēto bioķīmisko MS marķieru korelācijas karte. Nitrītu līmeņi tika analizēti ar Spirmena korelācijas testu (dati netbilda normālam sadalījumam), citas korelācijas tika analizētas ar Pīrsona testu. Skaitliskās vērtības atspoguļo  $p$  vērtības no tumši zilās – nav korelācijas līdz tumši sarkanai – nozīmīga korelācija.

Pamatojoties uz pierādījumiem, ka NO var darboties arī kā antioksidants lipīdu peroksidācijā (Violi *et al.*, 1999), varētu domāt, ka NO pārmērīga veidošanās un līdz ar to arī augstāks tā metabolītu līmenis (kas ir pierādīts gadījumos šajā MS pētījumā), noved pie MDA līmeņu krituma.

## 4.7. Genotipēšana

Viens veids, kā noteikt, vai izvēlētais SNP ir saistīts ar slimību, ir pārbaudīt novirzes no Hārdija-Veinberga līdzsvara (HWE). Vienīgā būtiskā novirze no HWE (1. tabula) tika novērota XRCC1 rs25487 T>C ( $P_{HWE} = 0,000213$ ).

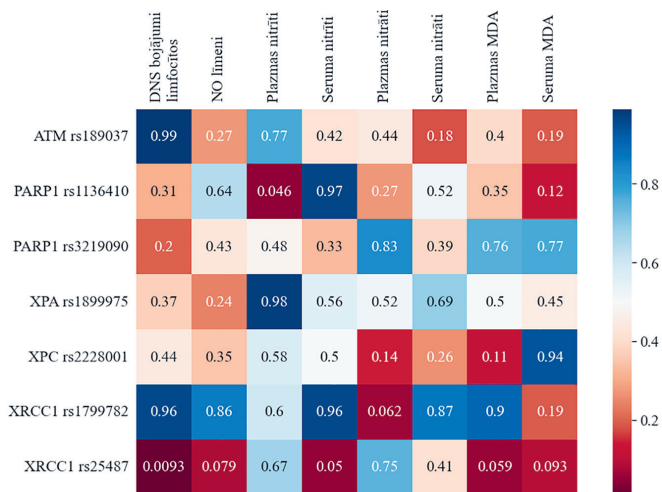
1. tabula. XRCC1 rs25487 Hārdija-Veinberga līdzsvara statistiskais nozīmīgums

SNP	MS kolēkcija			Statistiskā analīze starp dzimumiem	
	Biežums, % (paraugu skaits)				
	Visi paraugi	Sievietes	Vīrieši	$P_{\chi}$	$V_1$
XRCC1 rs25487 T>C					
MAF	54,17	53,33	57,14	0,66	0,03
CC	10,42 (10)	13,33 (10)	0 (0)	0,17	0,2
CT	70,83 (68)	66,67 (50)	85,71 (18)		
TT	18,75 (18)	20,00 (15)	14,29 (3)		
$P_{HV}$	$2,13 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^{-2}$	$1,76 \times 10^{-3}$	–	–

MAF – retās alēles biežums (*minor allele frequency*);  $P_{HV}$  – statistiskā ticamība starp sagaidāmo un reālo genotipu sadali (Hārdija-Veinberga vienādojuma analīze). Biežākā alēle pēc datu bāzēm treknrakstā

#### 4.8. SNP korelācija ar bioķīmiskajiem marķieriem

Statistiskā analīze parādīja, ka XRCC1 rs25487 T>C SNP būtiski korelē ar DNS bojājumiem limfocītos ar p vērtību 0,0093 (14. att.). XRCC1 rs25487 SNP arī uzrāda tuvu statistiski nozīmīgai korelācijai ar NO ( $p = 0,079$ ), nitrātu līmeni serumā ( $p = 0,05$ ), MDA līmeni plazmā ( $p = 0,059$ ) un seruma MDA līmeni ( $p = 0,093$ ). Cits tā paša XRCC1 gēna SNP rs1799782 G> A arī ir uzrādījis tuvu nozīmīgai korelāciju ar plazmas nitrātu līmeni.



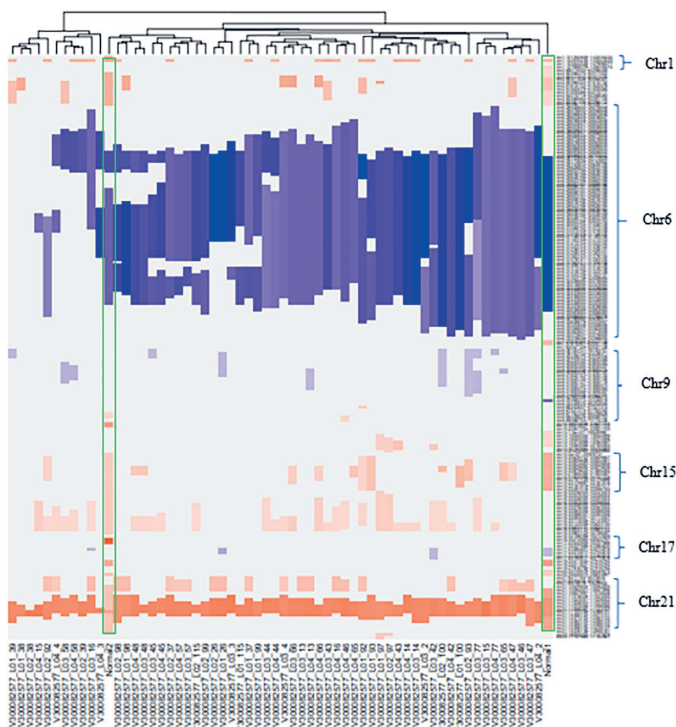
14. attēls. Korelācijas karte starp identificētajiem bioķīmiskajiem MS marķieriem un SNP. Skaitliskās vērtības atspoguļo p vērtības no tumši zilās – nav korelācijas līdz tumši sarkanai – nozīmīga korelācija.



XRCC1 rs25487 iepriekš norādīja uz saistību ar samazinātu ārstēšanas atbildes reakcijas risku barības vada vēža gadījumā un paaugstinātu blakusparādību risku galvas un kakla vēža gadījumā (Gong *et al.*, 2021). Ņemot vērā paaugstināto DNS bojājumu līmeni limfocītos pacientiem ar MS, šis SNP patiešām varētu būt saistīts ar DNS bojājumiem MS gadījumā. Kim, (2017) pētījums norādīja, ka slāpekļa oksīdam patiešām ir mutagēna iedarbība un tas spēj radīt punktveida mutācijas noteiktos gēnos. Ņemot to vērā, varētu pieņemt, ka NO varētu būt XRCC1 mutācijas iemesls.

#### 4.9. Zema pārklājuma NGS CNV analīze

Lai gūtu priekšstatu par NGS rezultātiem MS pacientiem, tika analizēti 60 MS paraugi. Katram paraugam bija aptuveni 1x līdz 2x sekvencēšanas dziļums. Šiem paraugiem tika veikta zemas kvalitātes sekvēncu filtrēšana, izlīdzināšana un kopiju skaita variāciju noteikšana. Sekvencēšanas rezultāti parādīti kā siltuma karte (15. attēls).



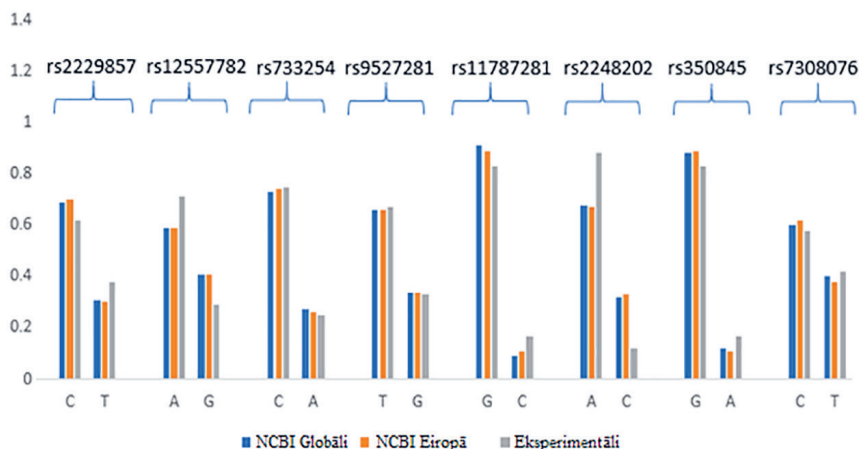
15. attēls. 60 MS paraugu un 2 kontroles paraugu CNV rezultāts, kas ir ekstrapolēts siltuma kartē. Zaļās kastes – augsta pārklājuma kontroles paraugu reģioni.

Nemot vērā zemā pārklājuma datu ierobežojumus, galvenokārt tika aplūkoti fragmenti līdz 1Mb lielumam. Lielas fragmenta variācijas galvenokārt tika konstatētas Chr1 (142535434–143544526), Chr6 (28558850–33388655), Chr9 (39183701–70174238), Chr15 (20629741–22297018), Chr17 (43385820–44770816) un Chr21 (9411193–14398134) reģionos.

Chr6 delēcija un Chr21 amplifikācija bija arī 2 normālos paraugos. Tas norāda, ka šie gadījumi var nebūt saistīti ar MS. Īpaši zema pārklājuma fragmenti rada ilūziju par delēciju Chr6 reģionā, taču to zemās sakrītības ar references genomu dēļ tos var arī neņemt vērā. Chr9: 39183701–42364337 reģionā ir ievērojams heterozigotitātes zudums 11 paraugiem no 60, kas ļauj pieņemt, ka šis reģions varētu būt saistīts ar MS attīstību.

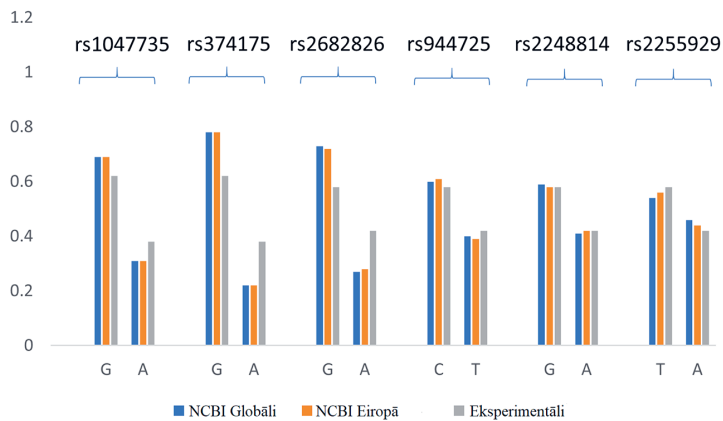
#### 4.10. Ar MS saistīto un slāpekļa oksīda sintāžu gēnu SNP

Pamatojoties uz iepriekšējiem ziņojumiem par saistību ar IFN- $\beta$  ārstēšanu (Bourguiba-Hachemi *et al.*, 2016), tika izvēlēti septiņi ar MS saistīto gēnu SNP rs2229857 (ADAR), rs12557782 (GRIA3), rs733254 (ZFAT), rs9527281 (STARD13), rs11787532 (ZFH4), rs2248202 (IFNAR2) un rs7308076 (CIT). Turklāt tika identificēts cita DNS reparācijas gēna SIRT6 SNP rs350845, kas ir atbildīgs par novecošanu. Acimredzamākās novirzes šajā gadījumā ir rs2229857 ar nedaudz augstāku alternatīvās alēles T biežumu (0,38) eksperimentālajos datos (16. att.); rs12557782 ar ievērojamu references alēles A biežuma pieaugumu (0,71) un alternatīvās alēles G biežuma samazināšanos (0,29); rs2248202 ar milzīgu references alēles A biežuma pieaugumu (0,88) un alternatīvās alēles C biežuma samazināšanos (0,12).



16. attēls. MS saistīto gēnu SNP alēļu biežuma NGS eksperimentālo datu salīdzinājums ar NCBI datu bāzi.

Tika izvērtēti seši NO metabolisma regulēšanas gēnu NOS1 un NOS2 SNP (trīs katram gēnam). Alēļu biežumi tika salīdzināti ar NCBI datu bāzi (17. att.), un konstatēts ka visi trīs NOS1 SNP rs1047735, rs374175 un rs2682826 parāda atšķirības no NCBI datiem.



17. attēls. NOS1 un NOS2 SNP alēļu biežumu salīdzinājums ar NCBI.

## 5. SECINĀJUMI

- DNS vienpavediena pārrāvumu līmenis ir ievērojami paaugstināts MS un ITD pacientiem, salīdzinot ar veselīgiem cilvēkiem (kontroles grupu), gan asinīs, gan izolētās perifēro asiņu mononukleārajās šūnās. Turpretī oksidēto bāzu līmenis neuzrādīja nekādas atšķirības starp MS pētījuma grupu un kontroles grupu.
- Slāpekļa oksīda koncentrācija asinīs ir ievērojami palielināta gan MS gan ITD pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu. Nitrītu un nitrātu līmenis arī liecina par ievērojamu pieaugumu MS pētījuma grupā, salīdzinot ar kontrol, bet kritumu ITD pētījuma grupā.
- Salīdzinot ar veselīgiem cilvēkiem, pacientiem ar MS ir pazemināts MDA līmenis gan plazmas, gan seruma paraugos.
- Pastāv būtiskas korelācijas starp NO un nitrītu līmeni serumā; NO un plazmas MDA līmeni; seruma nitrītiem un seruma nitrātiem; plazmas nitrītiem un plazmas MDA līmeni
- MS pacientu plazmas nitrītu līmenis ir saistīts ar dzimumu, un seruma nitrītu līmenis ir saistīts ar EDSS rādītāju.
- XRCC1 gēna SNP rs25487 uzrāda saistību ar MS, pamatojoties uz HWE analīzi, tomēr ir nepieciešama turpmāka izmeklēšana.
- XRCC1 gēna SNP rs25487 ir saistīts ar DNS bojājumiem un ar NOx līmeņiem. Šī gēna C alēle un TT genotips ir saistītas ar plazmas un seruma MDA līmeņiem.
- Pamatojoties uz NGS datiem, Chr9 reģions ir daudzsološs priekšmets turpmākajiem pētījumiem, NOS1 gēna SNP rs1047735, rs3741475, rs2682826 ir potenciāli saistīti ar MS, un GRIA3 rs12557782 SNP uz ChrX ir daudzsološs priekšmets turpmākajiem pētījumiem.

## 6. TĒZES AIZSTĀVĒŠANAI

- DNS bojājumi, ko izraisa vienpavediena pārrāvumi, kopā ar PARP1 gēna SNP rs3219090 un XRCC1 gēna SNP rs25487 liecina par spēcīgu saistību ar MS.
- MS pacientiem ir paaugstināts slāpekļa oksīda līmenis, kam, iespējams, ir pozitīva korelācija ar NOS1 gēna SNP, kuri ir saistīti ar MS.
- Dati par MS zemāku MDA līmeni MS pacientiem salīdzinot ar veseliem cilvēkiem šķiet pretrunīgi, taču tie var būt saistīti ar NO antioksidatīvām īpašībām
- T1D un MS uzrāda līdzīgu tendenci ar paaugstinātu DNS bojājumu līmeni, bet atšķiras NO metabolītu gadījumā

## 7. PUBLIKĀCIJAS

1. **Borisovs V.**, Ļeonova E., Baumanē L., Kalniņa J., Mjagkova N., Sjakste N. Blood levels of nitric oxide and DNA breaks assayed in whole blood and isolated peripheral blood mononucleated cells in patients with multiple sclerosis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2019 Jul; 843: 90–94. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.11.008. Epub 2018 Nov 23. PMID: 31421744.
2. **Borisovs V.**, Bodrenko J., Kalnina J., Sjakste N. Nitrosative stress parameters and the level of oxidized DNA bases in patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis*. 2021 Oct; 36(7): 1935–1941. doi: 10.1007/s11011-021-00786-5. Epub 2021 Aug 21. PMID: 34417942.
3. Rostoka E., Salna I., Dekante A., Pahirko L., **Borisovs V.**, Celma L., Valeinis J., Sjakste N., Sokolovska J. DNA damage in leukocytes and serum nitrite concentration are negatively associated in type 1 diabetes. *Mutagenesis*. 2021 Jul 7; 36(3): 213–222. doi: 10.1093/mutage/geab015. PMID: 34008029.
4. **Borisovs V.**, Bodrenko J., Paramonova N., Sjakste N., Investigating the Correlation between Genetic and Biochemical Markers in Multiple Sclerosis – iesniegts.

## 8. PĒTĪJUMA APROBĀCIJA

1. V. Borisovs, E. Ļeonova, J. Kalniņa, N. Mjagkova, N. Sjakste. *Background level of DNA damage determined in whole blood and lymphocytes of multiple sclerosis patients*, The 76<sup>th</sup> Conference of the University of Latvia, Riga, Latvia. 2018. Poster presentation.
2. V. Borisovs, E. Leonova, J. Kalnina, N. Mjagkova, N. Sjakste. *DNA oxidative damage determined in whole blood and lymphocytes of patients with multiple sclerosis*, 46<sup>th</sup> EEMGS/30<sup>th</sup> GUM meeting, Potsdam, Germany. 2018. Poster presentation.
3. V. Borisovs, E. Ļeonova, J. Kalniņa, N. Mjagkova, N. Sjakste. *DNA damage levels determined in whole blood and lymphocytes of patients with multiple sclerosis*, 56<sup>th</sup> International scientific student conference, Novosibirsk, Russia. 2018. Poster presentation.
4. J. Sokolovska, K. Ošiņa, V. Borisovs, L. Baumane, A. Dekante, L. Pahirko, J. Valeinis, V. Rovīte, V. Pīrāgs, N. Sjakste. *Nitric oxide metabolism and DNA breakage in autoimmune diseases*, 13<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop, Pushchino, Russia. 2019. Poster presentation.
5. K. Ošiņa, N. Paramonova, J. Kalniņa, V. Borisovs, N. Sjakste. *Proteosomal protein Gene Expression and DNA Integrity in Multiple Sclerosis*, 13<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop, Pushchino, Russia. 2019. Poster presentation.
6. J. Bodrenko, V. Borisovs, E. Ļeonova, J. Kalniņa, N. Paramonova, N. Sjakste. *Products of DNA oxidative stress damage as biomarkers for diagnosis of early stages of multiple sclerosis*, The 62<sup>nd</sup> international scientific conference of Daugavpils university, Daugavpils, Latvia. 2020. Online.
7. V. Borisovs, J. Bodrenko, E. Ļeonova, J. Kalniņa, N. Paramonova, N. Sjakste. *Potential biomarkers for early diagnosis of multiple sclerosis*, The 78<sup>th</sup> Conference of the University of Latvia, Riga, Latvia. 2020. Poster presentation. Abstract book.
8. V. Borisovs, J. Bodrenko, E. Leonova, I. Trapina, N. Paramonova, N. Sjakste. *The MS puzzle: piecing together biochemical and genetic biomarkers*, 7<sup>th</sup> Venusberg Meeting on Neuroinflammation, Belval, Luxembourg. 2023. Poster presentation. Abstract book.

## 9. AUTORA IZGLĪTĪBA UN ZINĀTNISKĀ PIEREDZE

### Izglītība

2018.–2020. Dabaszinātņu (bioloģijas) doktora studijas Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātē.  
2017.–2018. Bioloģijas doktora studijas Daugavpils Universitātē.  
2014.–2016. Maģistra grāds bioķīmijā Upsalas universitātē.  
2011.–2014. Bakalaura studijas (ķīmija) Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātē.  
2008.–2011. Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas fakultāte.

### Nodarbinātība

2020.–2022. Latvia MGI Tech, nozares lietojumprogrammu izstrādātājs un paraugu sagatavošanas komandas vadītājs.  
2022. – tagad. Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte, pētnieks.  
2020.–2022. Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte, laborants.  
2018.–2020. Latvijas Organiskās sintēzes institūts, zinātniskais asistents.  
2017. – tagad. Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte, konsultants.  
2017.–2020. Latvijas Universitātes Bioloģijas institūts, zinātniskais asistents.  
2016.–2017. AS Olainfarm, vadošais ķīmiķis standartizācijas laboratorijā.

### Pētniecības projekti

VPP-14-2-7 “Diabēta un kardiovaskulāro komplikāciju molekulārie mehānismi, farmakoģenētika un jauni ārstniecības līdzekļi”.  
ERA\_NET RUS programmas projekts “Study of the new post-replicative modification of DNA by Poly(ADP-ribose) polymerase and its implication for anticancer therapy”.  
ERAF projekts 1.1.1.1/18/A/036 “Sekretorā IgA un zarnu mikrobioma mijiedarbība un dinamika antidiabētiskās terapijas laikā”.  
ERAF projekts 1.1.1.1/16/A/016 “Ar proteasomām saistīto multiplās sklerozes ģenētisko, epiģenētisko un klīnisko marķieru noteikšana”.

### Pedagoģiskā pieredze

Bioķīmija I. Farmācija, 2. kurss  
Bioķīmijas pamati. Zobārstniecība, 1. kurss.  
Zobu biomateriāli. Zobārstniecība, 3. kurss.  
5. kursa zobārstniecības studentu darbs – BPA saturošu zobu biomateriālu genotoksicitāte.  
2. kursa farmācijas studentu darbs – Slāpekļa oksīda metabolītu līmenis multiplās sklerozes pacientu asins plazmā atkarībā no terapijas.



## 10. PATEICĪBAS

Šis pētījums tapis ar Eiropas Reģionālās attīstības fonda atbalstu projektā “Ar proteasomām saistīto multiplās sklerozes ģenētisko, epiģenētisko un klīnisko marķieru noteikšana” (Projekta Nr. 1.1.1.1/16/A/016).

Vēlos pateikties visiem pētījuma dalībniekiem par ieguldījumu un īpašu paldies – Latvijas Jūras medicīnas centra medicīnas personālam par pacientu atlases organizēšanu un bioloģiskā materiāla nodrošināšanu.

Izsaku visdziļāko pateicību savam darba vadītājam prof. Nikolajam Sjakste par atbalstu un pieredzi. Esmu pateicīgs arī saviem kolēģiem Latvijas Universitātē par ieguldījumu, praktiskiem ieteikumiem, produktīvu sadarbību un atbalstu ar īpašu pateicību Elinai Ļeonovai, Ilvai Trapiņai, Natālijai Paramonovai, Evitai Rostokai un Jeļizavetai Sokolovskai.

Tāpat vēlos pateikties Latvia MGI Tech par iespēju izmantot viņu platformu šim pētījumam un bioinformātikas komandas nenovērtējamo palīdzību.

Visbeidzot es vēlos pateikties savai sievai, ģimenei un draugiem par pacietību, sapratni un atbalstu.



**UNIVERSITY  
OF LATVIA**

FACULTY OF BIOLOGY

**Vitālijs Borisovs**

**GENETIC BACKGROUND OF  
DNA DAMAGE IN MULTIPLE SCLEROSIS  
AND FREE RADICAL PRODUCTION  
IN MULTIPLE SCLEROSIS AND  
TYPE I DIABETES MELLITUS PATIENTS**

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

Submitted for the degree of Doctor of Biology

Subfield: Molecular Biology

Riga 2023

The doctoral thesis was carried out in the University of Latvia, at the Faculty of Medicine, Department of Biochemistry from 2017 to 2022.

The research was supported by ERDF grant 1.1.1.1/16/A/016 “Determination of proteasome-related genetic, epigenetic and clinical markers for multiple sclerosis”.

NATIONAL  
DEVELOPMENT  
PLAN 2020



EUROPEAN UNION  
European Regional  
Development Fund



UNIVERSITY  
OF LATVIA

INVESTING IN YOUR FUTURE

The thesis contains the introduction, four chapters, conclusions, thesis for defense, list of original publications, approbation of research, education and research experience of the author, acknowledgements, reference list, two appendices.

Form of the thesis: dissertation in biology, subfield: molecular biology.

Supervisor: Dr. habil. Biol., Prof. **Nikolajs Sjakste**.

Reviewers:

- 1) Dr. med. **Šimons Svirkis**, Riga Stradins University
- 2) Dr. biol. **Una Riekstiņa**, University of Latvia
- 3) PhD **Lada Živkovič**, University of Belgrad

The thesis will be defended at the public session of the Doctoral Committee of Biology, University of Latvia at 13:00 (EET), on June 30th, 2023 at the University of Latvia Academic Centre, Jelgavas Str. 1.

The thesis is available at the Library of the University of Latvia, Kalpaka blvd. 4.

This thesis is accepted for the commencement of the degree of Doctor of Biology on March 9th, 2023 by the Doctoral Committee of Biology, University of Latvia.

Chairman of the Doctoral  
Committee

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
(signature)

Secretary of the Doctoral  
Committee

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
(signature)

© Vitālijs Borisovs, 2023  
© University of Latvia, 2023

ISBN 978-9934-36-017-6

ISBN 978-9934-36-018-3 (PDF)

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) and type 1 diabetes (T1D) are both chronic autoimmune diseases. The progression of both diseases shares a common autoimmune nature, but the targeted organs are different. In case of MS autoimmunity directly affects neuronal myelin sheath, gradually diminishing signal transduction into the brain, thus limiting even basic abilities of the patient. In T1D pancreatic cells are targeted, resulting in insulin deficiency and inability to metabolize glucose. Some studies indicate that MS patients have increased chances to develop T1D, thus both diseases might have some common mechanisms. With T1D affecting more people worldwide than MS, it is a relatively well-studied disease when the two are compared. MS on the other hand still have a lot of uncertainties in pathophysiology. MS can be diagnosed by MRI scans of the brain or spinal cord, and interferon-based therapies can be applied to successfully slower the progression. However, MS is only diagnosed when symptoms of different severity occur and there is currently no practical way of identifying MS in its early stages.

The main objective of this study was to test different biochemical and genetical biomarkers and evaluate their association with MS. Whole blood of MS and T1D patients was collected, lymphocytes were isolated, DNA was extracted and a set of biochemical and genetical tests were performed. Significant increase in DNA damage was observed for T1D and MS patients, but levels of nitric oxide metabolites (NOx) were elevated in MS patients, and lower in T1D patients when compared to the healthy subjects. MDA level evaluation showed a significant decrease in the MS study group, which also showed association with NOx level, but no associations with disease modifying therapies (DMTs). Genotyping was performed for the most potent SNPs in DNA repair genes (ATM, PARP1, XPC, XPA and XRCC1). SNPs for potential MS candidate genes (ADAR, GRIA3, ZFAT, CIT, IFNAR2, STARD13, ZFHX4) together with NOS1 and NOS2 SNPs were additionally analyzed by NGS. Statistically significant results were observed for PARP1 and XRCC1 associations with NOx and MDA levels of MS patients. NOS1 SNPs linkage disequilibrium analysis has also shown a promising statistical significance. Additionally, low coverage copy number variation analysis was performed and an insight for future perspective was noted.

# TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT .....	35
ABBREVIATIONS .....	37
1. INTRODUCTION .....	38
1.1. Etiology and mechanism of Multiple Sclerosis .....	38
1.2. Progression and evaluation of Multiple Sclerosis .....	38
1.3. Link between type 1 diabetes and multiple sclerosis .....	38
1.4. Metabolic products as indicators of oxidative and nitrosative stress .....	39
1.5. DNA damage and reactive oxygen species .....	40
1.6. MS-candidate genes .....	40
2. AIMS AND TASKS .....	43
3. METHODS .....	44
3.1. Study design and patient choice for each experiment .....	44
3.2. Laboratory methods .....	44
3.2.1. Plasma and serum preparation .....	44
3.2.2. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and DNA isolation .....	45
3.2.3. The single-cell gel electrophoresis (alkaline comet assay) .....	45
3.2.4. Detection of NO by EPR spectroscopy .....	46
3.2.5. Nitrite and nitrate measurements in serum and plasma .....	46
3.2.6. MDA detection with TBARS assay .....	46
3.2.7. Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) genotyping .....	47
3.2.8. Next Generation Sequencing .....	47
3.3. Statistical analysis .....	47
4. RESULTS AND DISCUSSION .....	49
4.1. DNA damage and levels of oxidized DNA bases .....	49
4.2. Nitric oxide production .....	50
4.3. Nitrite and nitrate levels in plasma and serum .....	51
4.4. MDA levels in plasma and serum .....	52
4.5. DNA damage and nitric oxide metabolites in T1D .....	53
4.6. Association between MS biochemical markers .....	54
4.7. Genotyping .....	54
4.8. SNP correlation with biochemical markers .....	55
4.9. Low-coverage NGS CNV analysis .....	56
4.10. MS-candidate and NOS-related genes SNPs .....	57
5. CONCLUSIONS .....	59
6. THESIS FOR DEFENSE .....	60
7. PUBLICATIONS .....	61
8. APPROBATION OF RESEARCH .....	62
9. EDUCATION AND RESEARCH EXPERIENCE OF THE AUTHOR .....	63
10. ACKNOWLEDGEMENTS .....	64
REFERENCES .....	65

## ABBREVIATIONS

<i>ADAR</i> – adenosine deaminase, RNA-specific	<i>NOS</i> – Nitric oxide synthase
<i>ANOVA</i> – analysis of variance	<i>PARP1</i> – Poly [ADP-ribose] polymerase 1
<i>ATM</i> – ataxia-telangiectasia mutated	<i>PBMNC</i> – peripheral blood mononuclear cells
<i>Chr</i> – chromosome	<i>PPMS</i> – primary progressive MS
<i>CIT</i> – citron Rho-interacting serine/threonine kinase	<i>PRMS</i> – progressive-relapsing MS
<i>CNV</i> – copy number variation	<i>RNA</i> – Ribonucleic acid
<i>DMT</i> – disease modifying therapy	<i>ROS</i> – Reactive oxygen species
<i>DNA</i> – deoxyribonucleic acid	<i>RRMS</i> – Relapse remitting Multiple Sclerosis
<i>DSB</i> – double strand break	<i>SEM</i> – Standard error of the mean
<i>EDTA</i> – ethylenediaminetetraacetic acid	<i>SIRT6</i> – Sirtuin 6
<i>EPR</i> – electron paramagnetic resonance	<i>SPMS</i> – Secondary progressive Multiple Sclerosis
<i>EtOH</i> – ethanol	<i>T1D</i> – type 1 diabetes mellitus
<i>gDNA</i> – genetic DNA	<i>TBA</i> – Thiobarbituric acid
<i>GRIA3</i> – glutamate receptor, ionotropic, <i>AMPA</i> 3	<i>TBARS</i> – Thiobarbituric acid reacting substances
<i>HWE</i> – Hardy-Weinberg equilibrium	<i>XPC</i> – Xeroderma Pigmentosum, complementation group C
<i>MDA</i> – Malondialdehyde	<i>XRCCI</i> – X-ray repair cross-complementing protein 1
<i>MS</i> – Multiple Sclerosis	<i>ZFAT</i> – Zinc finger and AT hook domain
<i>NGS</i> – Next generation sequencing	<i>ZFHX4</i> – Zinc finger homeobox 4
<i>NO</i> – Nitric oxide	

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Etiology and mechanism of Multiple Sclerosis

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic autoimmune neurodegenerative disease that affects central nervous system. The precise cause of MS is still not clear, however possible mediating factors of MS development is widely described. One of the causes of MS is demyelination caused by the lymphocytes that penetrate blood-brain barrier (BBB) and initiate local inflammation. (Balasa *et al.*, 2021; Tafti *et al.*, 2022).

Women are about twice more susceptible to MS than men. The disease predominantly targets individuals between 20 and 40 years, and more than 2 million people are suffering from MS worldwide. (Coyle, 2021; Huang *et al.*, 2017).

Myelin is the main component of myelin sheath covering the body of nerve cells and supporting the signal transduction from one nerve cell to another (Mallucci *et al.*, 2015). Reduced signal transduction leads to deterioration of nervous system and causes limitation to senso-motoric function of the organism. Depending on which neuron is damaged consequential symptoms will be different and range from impaired memory to general fatigue (Garg and Smith, 2015). Most common symptoms of demyelination (MS in particular) are weakness, painful muscle spasms, fatigue, neuralgia, depression, subtle cognitive difficulties, and seizures (Ghasemi *et al.*, 2017; McGinley *et al.*, 2021).

## 1.2. Progression and evaluation of Multiple Sclerosis

70 to 80% of patients suffer from MS in a relapsing-remitting (RR) way. Relapses trigger new neurological problems or worsen preexisting conditions. In most cases, relapses last for more than 48 hours and develop over a few days or weeks (Lane and Yadav, 2020; Tafti *et al.*, 2022).

Within 10 to 15 years of MS onset, 50% of RRMS patients enter a progressive phase of the disease. MS symptoms steadily worsen during this progressive phase, referred to as secondary progressive MS (SPMS). The third form of MS called primary progressive MS (PPMS) is characterized by progressive worsening from its onset and occurs in 15 to 20% of MS cases. The fourth type of MS is known as progressive-relapsing (PR) MS: it occurs in 5% of patients and is characterized by gradual degeneration and superimposed relapses (Lane and Yadav, 2020; Tafti *et al.*, 2022).

## 1.3. Link between type 1 diabetes and multiple sclerosis

Type 1 diabetes (T1D) and MS both share common chronic and autoimmune nature (Pozzilli *et al.*, 2022). Even though T1D and MS are considered

autoimmune diseases specifically targeting different organs, both diseases, as expected, share etiologic and pathologic features (Handel *et al.*, 2009). Studies indicate that patients with MS are more susceptible to developing T1D when compared to the general population (Pozzilli *et al.*, 2022; Tettey *et al.*, 2015).

Autoimmunity is usually described in terms of white blood cells, with T-cells, B-cells and macrophage as key components of immune response (Dong *et al.*, 2016; Ingwersen *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2019; Zacca *et al.*, 2021). Interestingly, erythrocytes might also play important role in pathogenesis of autoimmune diseases. White blood cells make up roughly 1% of total blood volume. The remaining circulatory components are plasma with about 55% of total volume and red blood cells (RBC) which account for about 45% of the total volume (Geiger *et al.*, 2022). Despite the fact that RBC are prevalent in the blood stream, they are usually neglected as a part of immune response, due to the lack of nucleus or internal organelles. The lack of organelles is compensated by the variety of functionally active receptors and transporters in the membrane (Crisp *et al.*, 2016). It also known that RBC participate in the release of key immune response molecules ATP and nitric oxide (NO). In fact, the reports have shown certain abnormalities in levels of these molecules when investigated in the scope of autoimmune diseases (Geiger *et al.*, 2022).

#### **1.4. Metabolic products as indicators of oxidative and nitrosative stress**

Uncontrolled oxidative stress, the mismatch between prooxidants and anti-oxidants, can cause oxidative damage to cells, tissues, and organs. Lipids have long been affected by radicals and reactive oxygen species (ROS). There are many mechanisms that lead to ROS production, including enzymatic reactions and/or autooxidation of different compounds, such as catecholamines and hydroquinone. The primary sources of ROS are mitochondria, plasma membrane, endoplasmic reticulum, and peroxisomes (Jankū *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020). It is important to note that the liver produces ROS as a result of numerous exogenous sources, including ionizing radiation, ultraviolet rays, tobacco smoke, pathogen infections, chemicals in the environment, and herbicides/insecticides (Ayala *et al.*, 2014).

For many years, since lipid peroxidation of omega-3 and omega-6 fatty acids can be readily detected using MDA in combination with thiobarbituric acid (TBA), MDA has been used as an inexpensive biomarker for lipid peroxidation (Ito *et al.*, 2019; Mas-Bargues *et al.*, 2021). After TBA reacts with MDA in the TBA test, an intensely colored chromogen fluorescent red adduct is produced; this method was initially developed by food chemists in order to assess the autooxidative degradation of fats and oils. It should be noted that the TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) test is notoriously nonspecific, which has led to substantial controversy with respect to its use as a means of determining the level of MDA from in vivo samples.



NO that causes nitrosative stress, plays an important role in many aspects of human health that also include excitotoxicity, protein modification, and other processes that are pathophysiological. The nitric oxide synthase (NOS) in mammals produces NO by breaking down L-arginine into L-citrulline molecules (Akanji *et al.*, 2020; Correa–Aragunde *et al.*, 2018). In recent studies, three NOS isoforms have been positively identified – endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS), and neuronal NOS (nNOS) (Wang *et al.*, 2020).

There is no doubt that NO plays an important role in the normal functionality of the human body, but it also has pathophysiological effects on the body. Through various mechanisms, NO reacts with a wide variety of oxygen species in the cellular environment to produce highly reactive molecules that damage cellular components on a molecular level (Fairless *et al.*, 2021).

### 1.5. DNA damage and reactive oxygen species

There are two main types of DNA damage: endogenous and exogenous. During endogenous DNA damage, reactive oxygen species (ROS) and water, which are naturally present in cells, are involved in hydrolytic and oxidative reactions with chemically active DNA. A number of genetic diseases and sporadic cancers are caused by these inherently predisposed interactions between DNA and molecules from its immediate surroundings (Perrone *et al.*, 2016; Reuter *et al.*, 2010; Visconti and Grieco, 2009). As opposed to endogenous DNA damage, exogenous DNA damage occurs when physical, chemical, and environmental agents damage the DNA. Alkylating agents, UV and ionizing radiation, and crosslinking agents are examples of these (Chatterjee and Walker, 2017).

A variety of chemical and physical agents can lead to highly toxic DNA double strand breaks (Cannan and Pederson, 2016). Many human disorders and cancers have been linked to unresolved DSBs (Tiwari and Wilson, 2019).

### 1.6. MS-candidate genes

ATM gene is located on Chr11: 108 223 044-108 369 102; 11q22.3 (Fig. 1), has the size of 146 059 bases and a plus strand orientation (“Gene: ATM (ENSG00000149311) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107”).

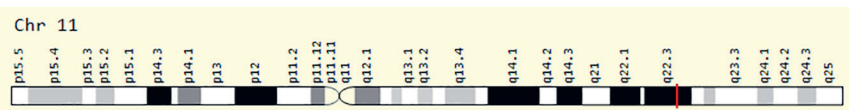
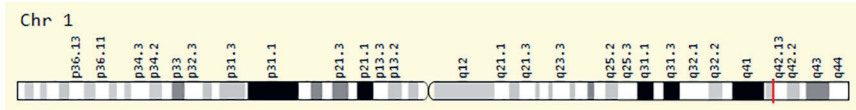


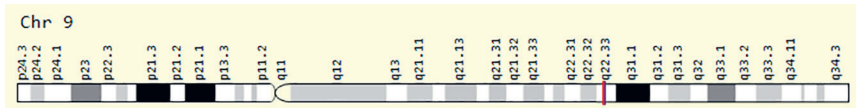
Figure 1. ATM Gene in genomic location: bands according to Ensembl, locations according to GeneLoc (Gene: ATM (ENSG00000149311) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107)

PARP1 gene is located on Chr1:226 360 210-226 408 154; 1q42.12 (Fig. 2), has the size of 47 403 bases and a minus strand orientation (“Gene: PARP1 (ENSG00000143799) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107”).



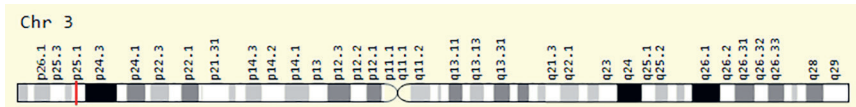
**Figure 2. PARP1 Gene in genomic location: bands according to Ensembl (Gene: PARP1 (ENSG00000143799) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107)**

XPA gene is located on chr9:97 654 398-97 697 340; 9q22.33 (Fig. 3), has the size of 47 403 bases and a minus strand orientation (“Gene: XPA (ENSG00000136936) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107”).



**Figure 3. XPA Gene in genomic location: bands according to Ensembl (Gene: XPA (ENSG00000136936) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107).**

XPC gene is located on chr3:14,145,147-14,178,621; 3p25.1 (Fig. 4), has the size of 33 475 bases and a minus strand orientation (“Gene: XPC (ENSG00000154767) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107”).



**Figure 4. XPC Gene in genomic location: bands according to Ensembl (Gene: XPC (ENSG00000154767) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107)**

XRCC1 gene is located on Chr19:43 543 311-43 580 473; 3p25.1 (Fig. 5), has the size of 37 163 bases and a minus strand orientation (“Gene: XRCC1 (ENSG00000073050) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107”).

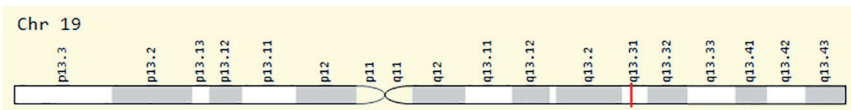


Figure 5. **XRCC1 Gene in genomic location: bands according to Ensembl** (Gene: *XRCC1* (ENSG00000073050) – Summary – *Homo\_sapiens* – GRCh37 Archive browser 107).

The protein encoded by *SIRT6* gene belongs to the sirtuin family of NAD-dependent enzymes that plays key roles in cellular stress resistance, genomic stability, aging, and energy homeostasis. DNA repair, telomeric chromatin maintenance, inflammation, lipid and glucose metabolism, and DNA repair are some of the functions of this encoded protein. Transcripts encoding different isoforms can result from alternative splicing (*SIRT6 sirtuin 6 [Homo sapiens (human)]* – Gene – NCBI).

A whole genome research published by Comabella *et al* in 2009 described the association of SNPs with IFN- $\beta$  therapy response (Comabella *et al.*, 2009). Among the top-scoring intragenic SNPs, there are those in the following genes: Zinc finger and AT hook domain containing (*ZFAT*), glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3 (*GRIA3*), StAR-related lipid transfer (*START*) domain containing 13 (*STARTD13*), adenosine deaminase, RNA-specific (*ADAR*), zinc finger homeobox 4 (*ZFH4*), interferon ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\omega$ ) receptor 2 (*IFNAR2*) and citron Rho-interacting serine/threonine kinase (*CIT*) (Bourguiba-Hachemi *et al.*, 2016).

## 2. AIMS AND TASKS

**Aim of the study:** To test different biochemical and genetical biomarkers for their association with autoimmunity with respect to MS and T1D.

**Tasks to reach the aim:**

1. To evaluate DNA damage in MS and T1D, and oxidized bases in whole blood and lymphocytes of MS patients and compare it to the healthy subjects
2. To evaluate levels of NO in plasma and serum of MS and T1D patients and compare it with the healthy subjects.
3. To evaluate levels of MDA in plasma and serum of MS patients.
4. Investigate the association between each biochemical marker
5. Investigate the association between biochemical markers and patient clinical descriptors
6. Identify possible SNPs in DNA repair genes ATM, PARP1, XPC, XPA, XRCC1 and evaluate their significance.
7. Investigate the association of SNPs with biochemical markers.
8. Evaluate possible CNV with low-coverage NGS, and identify other SNPs that might be relevant to the topic of this study with 30x coverage NGS.

## 3. METHODS

Blood was collected by the professional medical staff in the Latvian Maritime Medicine Center. Permission of the Central Medical Ethics Committee of the Republic of Latvia No 1/17–10-10 (issued 10.10.2017) was received to perform this study. Informed consent was obtained from every participant of the study.

### 3.1. Study design and patient choice for each experiment

Blood was obtained by vein puncture and collected in plastic capillaries with heparin (Microvetter CB 300, Sarstedt, Germany) for EPR spectrometry and with EDTA (BD Vacutainer K2E EDTA 10.8 mg, BD-Plymouth, UK) for comet assay.

SNP genotyping was performed on 96 patients as a cohort study. Biochemical analysis (comet assay, detection of NO, levels of nitrates and nitrites, levels of MDA) study group involved 26 volunteers from the doctor's appointment and within the 96-patient collection.

The 96-sample study group contained 78.1% females and 21.9% males with the female to male ratio of around 4:1. 43.8% of patients had RRMS subtype, and 56.2% of patients developed SPMS stage. Average age of the study group was  $50.7 \pm 10.7$  years with the median value of 51.5 and IQR of 16 years.

Healthy subjects were volunteers who agreed to participate in the study and signed the informed consent. Healthy subjects were used as controls only if there were no documented evidence of any chronic and autoimmune diseases. Control group for comet assay and EPR involved 22 healthy subjects: 7 males and 15 females of 21 to 55 years (average age of the group  $30.6 \pm 3.2$  years). Nitric oxide metabolite and MDA control group involved 25 healthy subjects: 4 males and 21 females of 20 to 43 years (average age of the group  $34.2 \pm 1.7$  years).

T1D study group involved 71 patients (45 males and 55 females) with the median age of 33 (27.0 – 44.5) years. T1D control group involved 57 healthy subjects (39 males and 61 female) with the median age of 24 (21 – 31) years.

60 samples from the 96-sample collection were randomly chosen for NGS CNV analysis and 12 DNA samples for 30x coverage NGS analysis.

### 3.2. Laboratory methods

#### 3.2.1. Plasma and serum preparation

Whole blood was collected into EDTA treated tubes BD Vacutainer K2E EDTA 10.8 mg, (BD-Plymouth, UK) for plasma preparation and into EDTA-free tubes (BD-Plymouth, UK) for serum preparation. Samples were then centrifuged at  $1500 \times g$ , supernatant removed, and 0.5 mL aliquots were prepared.

### 3.2.2. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and DNA isolation

PBMC isolation was performed according to the standard Hitopaque-1077 protocol provided by Sigma-Aldrich.

DNA isolation was performed according to the standard technique by separating liquid phase from the cell pellet and then adding 3 mL lysis buffer (10 mM TRIS, 0.4 M HCl, 0.32 M sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton-X 100, pH = 7.5). After the centrifugation following lysis pellet was resuspended in 1.5 mL resuspension buffer (120 mM NaCl, 15 mM EDTA, pH = 8.0). Proteinase K, RNase and 10% SDS were added to the resuspension and incubated for 2 hours 56 °C. 5 M NaCl solution was added, the mixture was centrifuged, supernatant was transferred into the new tube and 96% ice cold EtOH was added. After the overnight incubation at -20 °C cell pellet was isolated and washed with 70% EtOH. Supernatant was discarded and pellets were resuspended in H<sub>2</sub>O.

### 3.2.3. The single-cell gel electrophoresis (alkaline comet assay)

Microscope glass slides were precoated by 0.5% type III agarose (*Sigma-Aldrich*, Germany). Fresh blood (or isolated PBMC) was mixed with 120 µL preheated 1% low-melting agarose (*Sigma-Aldrich*, Germany) and 100 µL of mixture were placed on the slide. Cell membranes were lysed by placing the slide into cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, pH 10 [*AppliChem*, Germany], 1% Triton-X 100, 5% DMSO [*Sigma-Aldrich*, Germany]) for 1 h – 24 h. After the lysis cells were placed into the electrophoresis chamber filled with the unwinding buffer (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH, pH 13.2) and kept for 20 minutes in total darkness at 4 °C. Electrophoresis was then run in the same buffer for 20 minutes at 300 mA and 1 V/cm. Slides were then air dried and washed with 0.4 M Tris buffer (pH 7.5) twice for 5 minutes each time. Slides were then neutralized and fixed with 96 % EtOH for 10 minutes and then stained with ethidium bromide. Samples were analyzed with a fluorescence microscope (Leica DFC295) equipped with 515 – 560 nm excitation filter and 590 nm barrier filter. Cells were visually graded into 5 classes A<sub>0</sub> – A<sub>4</sub>) from class 0 (undamaged. No discernible tail) to class 4 (almost all DNA in tail, insignificant head). DNA damage index (D) in arbitrary units was calculated as follows:  $D = A_1 + 2 \times A_2 + 3 \times A_3 + 4 \times A_4$ .

Modified comet assay generally followed the same procedure with the addition of incubation step in enzyme reaction solution (40 mL HEPES [*Sigma-Aldrich*, Germany], 0.1 M KCl [*Sigma-Aldrich*, Germany], 0.5 mM EDTA [*Sigma-Aldrich*, Germany], 0.2 mg/mL BSA [*Sigma-Aldrich*, Germany], pH 8) following the addition of formamidopyridine DNA – glycosylase (Fpg [*NEB*, UK]) and endonuclease III (EndoIII, [*NEB*, UK]) enzymes on top of the slides, after the lysis.

### 3.2.4. Detection of NO by EPR spectroscopy

1 mL of fresh blood was stirred and incubated with 20 mg of diethyldithiocarbamate (*Sigma-Aldrich*, Germany). 0.4 mL were aspirated into an insulin syringe and immediately frozen in liquid nitrogen. The frozen cylinder was extruded from the syringe and placed in a quartz finger Dewar flask ER 167 FDS-Q (*Bruker, Karlsruhe*, Germany) filled with liquid nitrogen. NO concentration was detected measuring the NO component in the spectrum of Fe-DETC-NO. For quantitative measurements the nitrogen triplet component ( $g = 2.031$ ) height was measured and compared to the calibration curve. EPR spectra were recorded in liquid nitrogen using the EPR spectrometer Radiopan SE/X2544 (Poland). Conditions of EPR measurements were: 25 mW microwave power, 9.24 GHz microwave frequency, 100 kHz modulation frequency, 0.5 mT modulation amplitude, and  $5 \times 10^5$  receiver gain.

### 3.2.5. Nitrite and nitrate measurements in serum and plasma

Chemiluminescence detector Sievers NOA-280i (*Analytix*, UK) was used for detection on nitrites and nitrates.

For nitrite measurements a series of  $\text{NaNO}_2$  standard dilutions were prepared. mV values were measured for  $1 \mu\text{M NO}_2^-$ ,  $5 \mu\text{M NO}_2^-$ ,  $10 \mu\text{M NO}_2^-$  and  $50 \mu\text{M NO}_2^-$  and calibration curve was constructed with the linear equation.

For nitrate measurements a series of  $\text{NaNO}_2$  standard dilutions were prepared. mV values were measured for  $1 \mu\text{M NO}_3^-$ ,  $5 \mu\text{M NO}_3^-$ ,  $10 \mu\text{M NO}_3^-$  and  $50 \mu\text{M NO}_3^-$  and calibration curve was constructed with linear equation.

50  $\mu\text{L}$  of each plasma or serum sample were injected into the 5 mL of reducing agent (50 mg NaI [*Sigma-Aldrich*, Germany] in 0.5 mL deionized water and mixing with 4.5 mL glacial acetic acid [*Sigma-Aldrich*, Germany]). Nitrite concentrations were calculated from the calibration curve.

50  $\mu\text{L}$  of each plasma or serum sample were injected into the 100 mL of the reducing agent (0.8 g  $\text{VCl}_3$  [*Sigma-Aldrich*, Germany] in 1 M HCl [*Sigma-Aldrich*, Germany] and filtered through the filter paper). Nitrate concentrations were calculated from the calibration curve.

### 3.2.6. MDA detection with TBARS assay

Measurements were performed by Lambda 25 UV-VIS spectrometer (*PerkinElmer*, UK) in 1 cm thick single-use cuvettes (*Sarstedt*, Germany). 4.0 mM TBA standard solution was prepared by dissolving 57.66 mg TBA (*Sigma-Aldrich*, Germany) in 100 mL 99.5% glacial acetic acid (*Sigma-Aldrich*, Germany). 1 mM MDA standard stock solution was prepared by dissolving 31.35 mg malondialdehyde tetrabutylammonium salt (*Sigma-Aldrich*, Germany) in 100 mL 99.5% glacial acetic acid. 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 mM standard

solutions were prepared. 500  $\mu\text{L}$  of plasma or serum were mixed with 500  $\mu\text{L}$  4.0 mM TBA standard solution. The absorption of each sample was measured at 532 nm.

### 3.2.7. Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) genotyping

ATM rs189037, PARP1 rs1136410, XPA rs1800975, XPC rs2228001, XRCC1 rs1799782 and XRCC1 rs25487 were genotyped. Primers were designed according to the gene of interest. PCR amplification settings were chosen according to the primers. Restriction was performed according to the present restriction site within the gene of interest. Quality control of PCR product and restriction was evaluated by gel electrophoresis. Parameters were set according to the estimate size of the fragment.

### 3.2.8. Next Generation Sequencing

DNA integrity was verified by Nanodrop ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  should be within 1.8–2.0 range). Sequencing was performed based on the Latvia MGI Tech DNBSEQ-G400RS. Library was prepared manually with MGIEasy FS DNA Library Prep Kit. Quality control was performed by Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA) and fragment size was detected by Agilent 4200 TapeStation (Agilent, USA). All DNA samples were sequenced as a PE150 approach with a total of 310 reads per sample (150 for each read and 10 for barcodes). Sequencing depth for human samples was 30x with around 80 Gb of data per sample. Low coverage CNV analysis for performed for 60 samples with an average depth of 1x per sample.

## 3.3. Statistical analysis

Shapiro–Wilk or Kolmogorov–Smirnov tests were used to determine whether the numerical data follow normal distribution. Method choice was defined by the size of the sample pool:  $n < 50$  – Shapiro–Wilk;  $n > 50$  – Kolmogorov–Smirnov.

Group-wise comparison was done by parametric t-test if two groups were following normal distribution, and one-way ANOVA test if group count was more than two. For data that was not within the normal distribution Mann–Whitney test was performed for two group comparison, and Kruskal–Wallis test for multiple groups comparison.

Prior to correlation analysis Hardy–Weinberg equilibrium was calculated for each SNP. The biochemical and genetic biomarker correlation was estimated by Pearson  $r$  (for data following normal distribution) or Spearman  $\rho$  (for data outside the normal distribution) tests.

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS Statistics v25.0 software. Heatmaps were prepared with Python3.



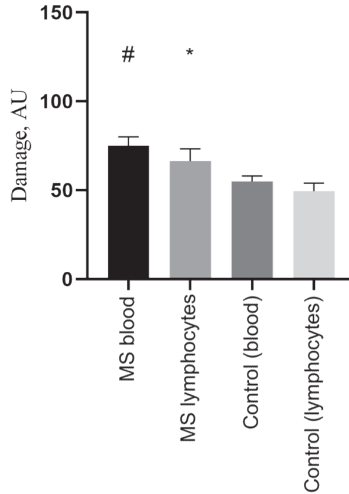
FastQ raw data from DNBSEQ-G400RS sequencer were uploaded to HPC and the automatic QC analysis was performed through the MegaBOLT Whole Genome Sequencing (WGS) pipeline with the built-in enhanced SOAPnuke algorithm. Genome mapping was performed manually by Integrative Genomic Viewer (IGV) v.2.11.9 open-source software (Broad Institute and the Reagent of University of California; available at [www.igv.org](http://www.igv.org)).

Genotyping and sequencing SNP data statistical analysis was performed using the SNPstats online statistical tool (Catalan Institute of Oncology, Spain; available at [www.snpstats.net](http://www.snpstats.net)).

## 4. RESULTS AND DISCUSSION

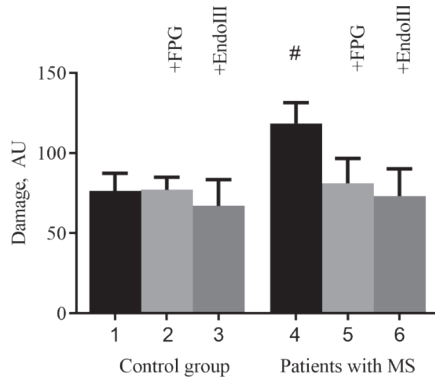
### 4.1. DNA damage and levels of oxidized DNA bases

Compared with the general fraction of white blood cells, the damage levels of isolated PBMCs showed similar results, as did the differences between patients and controls (Fig. 6).



*Figure 6.* Level of DNA damage (arbitrary units) in whole blood cells and PBMCs of MS patients (n = 26) and controls (n = 22). Data are presented as mean  $\pm$  SEM (arbitrary units). # and \*- p < 0.05 of whole blood and PBMCs of MS group vs. control group.

Modified comet assay results (Fig. 7 – 1 and Fig. 7 – 4) show an increased level of DNA single-strand breaks in patients with MS compared with the healthy subjects. This observation supplements previous alkaline comet assay results. To evaluate the number of oxidized bases, DNA damage data was subtracted from the enzyme induced damage data. Apparently, the level of oxidized bases is similar in the MS (Fig. 7 – 5 and 6) and control groups (Fig 7 – 3 and 4). Individual deviations between patient were highly variable, but statistically significant differences were not reached (p = 0.919).



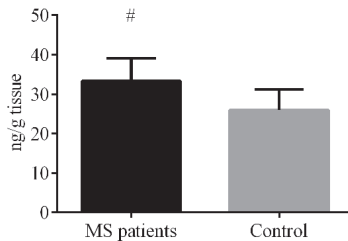
**Figure 7. Modified comet assay data showing DNA damage levels and levels of oxidized bases (arbitrary units) in PBMNC of healthy controls (n = 22) and patients with MS (n = 26). 1 – Total DNA damage of healthy subjects; 2 and 3 – levels of oxidized bases in healthy subjects; 4 – total DNA damage of patients with MS; 5 and 6 – levels of oxidized bases in patients with MS. Data are presented as mean ± SEM (arbitrary units). # p < 0.05 vs. the control group; levels of oxidized bases were not statistically significant (p = 0.9190).**

## 4.2. Nitric oxide production

A direct measurement of the radical, obtained by EPR spectroscopy, provides evidence of increased production of nitric oxide in blood.

Several studies have shown that NO plays an important role in the pathogenesis of MS, with inducible NO synthase (iNOS) being overactive in glia cases and mitochondrial damage preceding demyelination (Lan *et al.*, 2018; Mancini *et al.*, 2018). Because of nitric oxide metabolite dilution in the brain, the level of nitric oxide metabolites is not always elevated. (Haghikia *et al.*, 2015).

The level of NO production also appeared to be higher in patients with MS (Fig. 8), and the difference between the control group and the study group was statistically significant p < 0.0001.



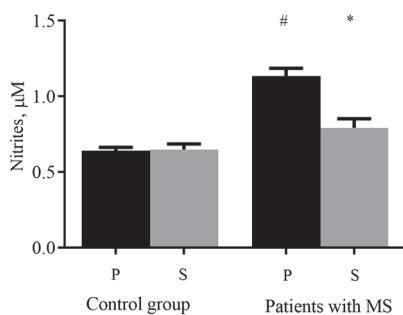
**Figure 8. Rate of NO production in the blood of MS patients and healthy controls (ng/g tissue). Data are presented as mean ± SEM (arbitrary units). # – p < 0.05 vs. control group.**

A significant increase in overall DNA damage might have been caused by oxidative stress as one of the primary factors affecting DNA integrity. Elevated levels of NO production give an idea that nitric oxide synthase (NOS) overproduction and accumulation of NO metabolic products might be the case. Thus, a more in-depth analysis was required to confirm these assumptions.

### 4.3. Nitrite and nitrate levels in plasma and serum

Previous studies have reported that nitrite and nitrate levels in serum of patients with neuromyelitis optica are similar to NOx levels in MS patients (Haghikia *et al.*, 2015). The serum levels of NOx are significantly increased in patients suffering from acute disseminated *encephalomyelitis* compared to MS patients (Fominykh *et al.*, 2016). According to (Lan *et al.*, 2018) the overproduction of NO in oligodendrocytes by iNOS might be responsible for the increase of NO metabolites in blood plasma and serum.

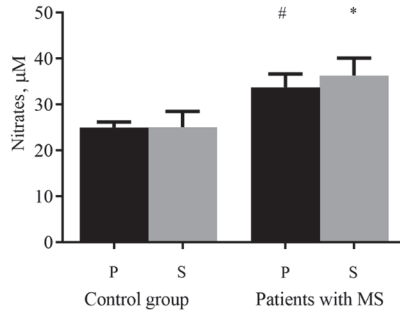
According to results shown on Fig. 9, nitrite concentration in plasma and serum of healthy subjects are on the same level –  $0.64 \pm 0.02 \mu\text{M}$  (Fig. 9; Control group – P) in plasma and  $0.65 \pm 0.04 \mu\text{M}$  (Fig. 9; Control group – S) in serum. On the other hand, overall levels of nitrites in plasma and serum of patients with MS are significantly higher than healthy subjects. However, nitrite concentration in plasma appeared to be higher than in serum –  $1.13 \pm 0.05 \mu\text{M}$  (Fig. 9 Patients with MS – P) in plasma and  $0.79 \pm 0.06 \mu\text{M}$  (Fig. 9; Patients with MS – S) in serum.



**Figure 9. Concentrations of nitrites determined in human blood plasma and serum of patients with MS and healthy subjects. P and S – plasma and serum samples correspondingly. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $\mu\text{M}$ ). # and \*  $p < 0.05$  vs. the control group.**

Nitrate concentrations (Fig. 10) follow a similar trend to nitrite concentrations. Namely, both plasma and serum of healthy subjects have the same levels of nitrates –  $24.98 \pm 1.20 \mu\text{M}$  (Fig. 10; Control group – P) in plasma and

25.05 ± 3.44 μM (Fig. 10; Control group – S) in serum. Samples taken from patients with MS indicate higher nitrate amounts both in plasma and serum – 33.67 ± 2.97 μM (Fig. 10; Patients with MS – P) in plasma and 36.30 ± 3.81 μM (Fig. 10; Patients with MS – S) in serum.



**Figure 10. Concentrations of nitrates determined in human blood plasma and serum of patients with MS and healthy subjects. P and S – plasma and serum samples. Data are presented as mean ± SEM (μM). # and \* p < 0.05 vs. the control group.**

There has been an increase in NOx levels reported in the serum of patients with MS in the present study, which is consistent with higher NOx levels reported in previous studies for many other demyelinating diseases.

#### 4.4. MDA levels in plasma and serum

Using three different drugs to treat MS, (Adamczyk *et al.*, 2017) assessed the levels of MDA in serum of newly diagnosed (untreated) patients. The study found that newly diagnosed patients with RRMS had the highest levels of MDA in their serum. MDA levels in serum of drug-treated patients are lower than those in control samples, but they are on the same level in plasma and serum samples. In contrast to previous research performed by (Saif Eldeen *et al.*, 2019), lower MDA levels contradict the finding that patients with MS have increased serum MDA levels. In contrast, (Noroozi *et al.*, 2017) found that patients' serum MDA decreased significantly after treatment with IFN-β 1a.

Results shown in Fig. 11 indicate a decrease in MDA levels in plasma and serum of patients with MS compared to healthy subjects. Plasma and serum control samples have 5.33 ± 0.19 μM MDA (Fig. 11; Control group – P) and 6.07 ± 0.42 μM MDA (Fig. 11; Control group – S) accordingly. As for the plasma and serum from patients with MS – 3.78 ± 0.32 μM MDA (Fig. 11; patients with MS – P) and 4.95 ± 0.23 μM MDA (Fig. 11; Patients with MS – S) accordingly.

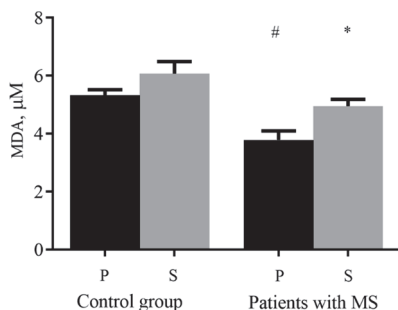


Figure 11. Concentrations of MDA, according to TBARS assay determined in human blood plasma and serum of patients with MS (n = 26) and healthy subjects (n = 25). P and S – plasma and serum samples. Data are presented as mean ± SEM (µM). # and \* p < 0.05 vs. the control group.

#### 4.5. DNA damage and nitric oxide metabolites in T1D

All the data appeared to be statistically significant with p values < 0.001. Patients with Type 1 diabetes patients had higher levels of DNA lesions (Fig. 12 – A) than the control group, but also high standard error for each group. In case of nitrates and nitrites patients with Type 1 diabetes had lower levels both of nitrites (Fig. 12 – B) and nitrates (Fig. 12 – C) also with high standard errors in both approaches.

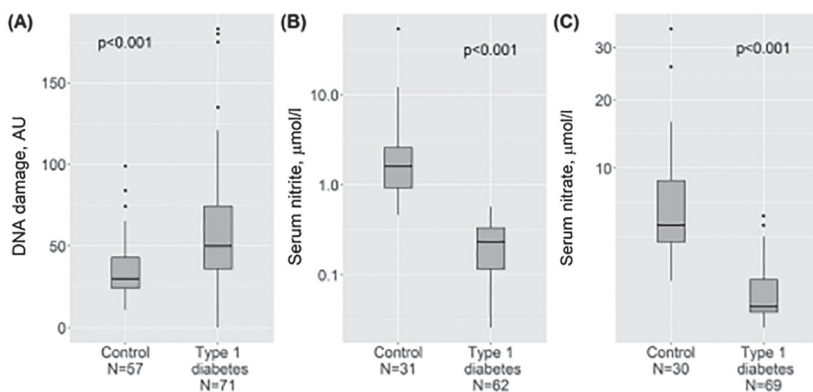


Figure 12. DNA damage, serum nitrite and nitrate concentrations in the leukocytes of healthy subjects and patients with type 1 diabetes. (A) Level of DNA damage in leukocytes expressed in AU. (B) Serum nitrite concentration (log<sub>10</sub>-transformed y-axis). (C) Serum nitrate concentration (sqrt-transformed y-axis).

## 4.6. Association between MS biochemical markers

The most crucial observations occurred correlating levels of NO with serum nitrites and plasma MDA levels with p values of 0.022 between levels of NO and serum nitrite levels, and p value of 0.0049 between levels of NO and plasma MDA levels respectively. Both cases have a medium reverse correlation (correlation coefficients ranging from  $\pm 0.40$  to  $\pm 0.60$ ). Another significant correlation was observed between plasma MDA levels and serum nitrite levels with p value of 0.0026. Correlations were visualized as a heatmap on Fig. 13.

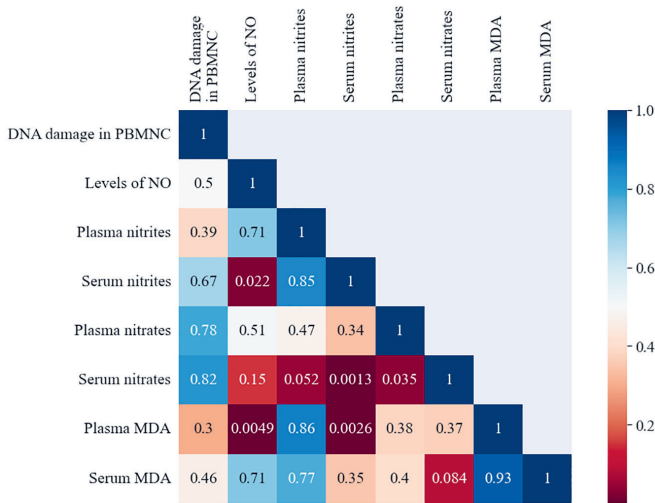


Figure 13. Correlation heatmap between identified biochemical MS markers. Nitrite levels were analyzed by the Spearman correlation test (data were not following normal distribution), other correlations were analyzed by the Pearson test. Numerical values represent p values from dark blue – no correlation to dark red – significant correlation.

Based on the evidence that NO can also act as an antioxidant in lipid peroxidation (Violi *et al.*, 1999), one might speculate that the overproduction of NO, and thus higher level of its metabolites (which is the proven case in this MS study), will result in the lowered levels of MDA.

## 4.7. Genotyping

One way to identify whether the chosen SNP is associated with the disease is to check deviations from Hardy-Weinberg (HW) equilibrium. The only significant deviation from HW equilibrium (Table 1) was observed for *XRCCI* rs25487 T>C ( $P_{HW} = 0.000213$ ).

Table 1. XRCC1 rs25487 Hardy-Weinberg equilibrium statistical significance

SNP	MS collection			Statistical analysis between genders	
	Frequency, % (sample number)			P <sub>χ</sub>	V <sub>1</sub>
	All samples	Females	Males		
<i>XRCC1 rs25487 T&gt;C</i>					
MAF	54.17	53.33	57.14	0.66	0.03
CC	10.42 (10)	13.33 (10)	0 (0)	0.17	0.2
CT	70.83 (68)	66.67 (50)	85.71 (18)		
TT	18.75 (18)	20.00 (15)	14.29 (3)		
P <sub>HW</sub>	2.13 × 10 <sup>-4</sup>	1.40 × 10 <sup>-2</sup>	1.76 × 10 <sup>-3</sup>	–	–

MAF minor allele frequency, P<sub>HW</sub> statistical significance between expected and real genotype distribution according to Hardy-Weinberg equilibrium. Common allele in bold.

#### 4.8. SNP correlation with biochemical markers

Statistical analysis has shown that XRCC1 rs25487 T>C SNP significantly correlates with DNA damage in PBMC with the p value of 0.0093 (Fig. 14). XRCC1 rs25487 SNP also shows close to statistically significant correlations with levels of NO (p = 0.079), serum nitrites (p = 0.05), plasma MDA levels (p = 0.059) and serum MDA levels (p = 0.093). Another SNP rs1799782 G>A of the same XRCC1 gene has shown a close to significant correlation with plasma nitrate levels.

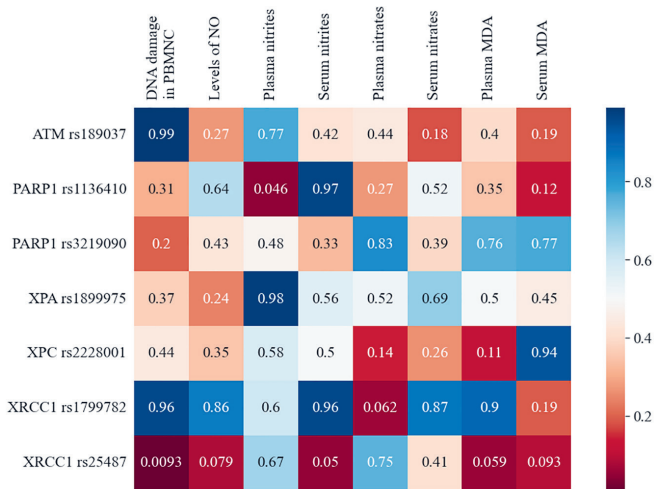


Figure 14. Correlation heatmap between identified biochemical MS markers and SNPs. Numerical values represent p values from dark blue – no correlation to dark red – significant correlation.



XRCC1 rs25487 previously indicated an association with reduced risk of minor treatment response in esophageal cancer and increased risk of high-grade side effects in head and neck cancer (Gong *et al.*, 2021). Considering the increased levels of DNA damage in lymphocytes of patients with MS this SNP might be indeed connected with DNA lesions in case of MS. A study by Kim, (2017) indicated that nitric oxide indeed has a mutagenic potency and capable of producing point mutations in certain genes. With this being said, one might assume that NO might be the reason behind XRCC1 mutation.

#### 4.9. Low-coverage NGS CNV analysis

To get an insight of NGS results for MS patients 60 MS samples were analyzed in a pool. Each sample had approximately 1x to 2x sequencing depth. Low quality sequence filtering, alignment and copy number variation detection were performed on these samples. Sequencing results are presented as a heatmap (Figure 15).

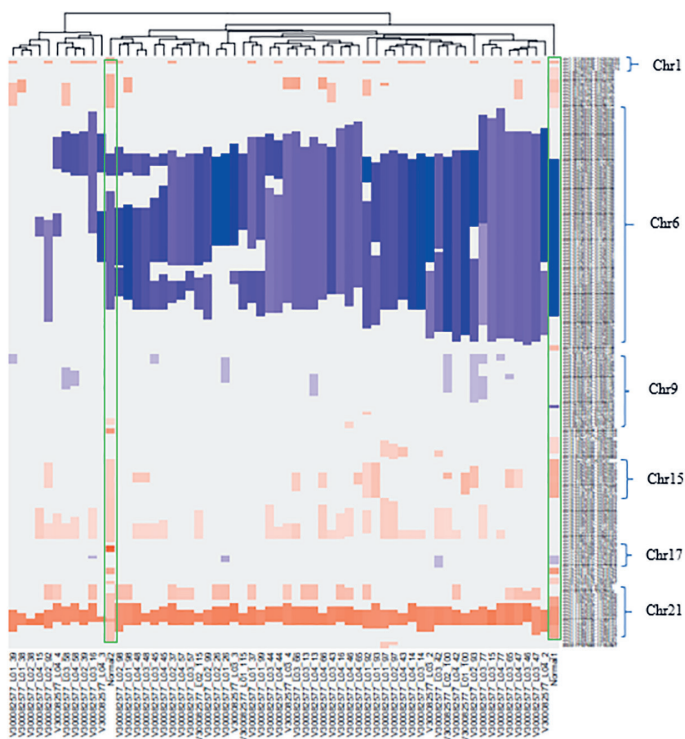


Figure 15. 60 MS sample and 2 healthy control CNV result extrapolated together in a heatmap. Green boxes – high coverage sample regions.

Considering the limitations of low coverage data, fragments up to the size of 1Mb were mainly looked at. Large fragment variations were mainly found in chromosomal regions of Chr1 (142535434–143544526), Chr6 (28558850–33388655), Chr9 (39183701–70174238), Chr15 (20629741–22297018), Chr17 (43385820–44770816) and Chr21 (9411193–14398134) (Figure 25). Deletion of Chr6 and amplification of Chr21 were also present in 2 normal samples. This indicates that these occurrences might not be a feature of MS. Particularly low coverage fragments create an illusion of deletion in Chr6 region, but due to their low consistency with reference genome, might as well not be considered. There is a noticeable loss of heterozygosity in Chr9: 39183701–42364337 region for 11 samples out of 60, which leads to an assumption that this region might be connected to the development of MS.

#### 4.10. MS-candidate and NOS-related genes SNPs

Seven SNPs of MS-related genes rs2229857 (ADAR), rs12557782 (GRIA3), rs733254 (ZFAT), rs9527281 (STARD13), rs11787532 (ZFH4), rs2248202 (IFNAR2) and rs7308076 (CIT) were chosen based on previous reports about positive association with IFN- $\beta$  treatments (Bourguiba-Hachemi *et al.*, 2016). Additionally, SNP rs350845 of another DNA repair gene SIRT6, responsible for aging, was identified. The most obvious outliers in this case are rs2229857 with the slightly higher frequency of alternative allele T (0.38) in the experimental data (Fig. 16); rs12557782 with the significant frequency increase of reference allele A (0.71) and frequency decrease of alternate allele G (0.29); rs2248202 with a huge increase in reference allele A frequency (0.88) and decrease in alternate allele C frequency (0.12).

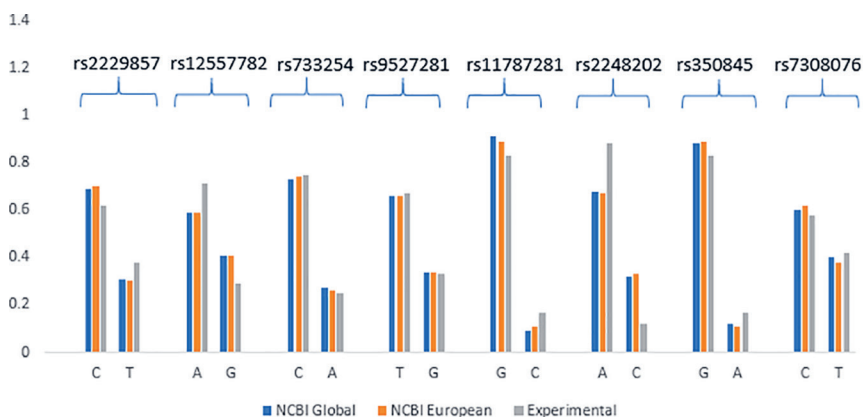


Figure 16. Visual presentation of allele frequency comparison between MS-related gene SNP NGS experimental data and NCBI database.

The primary genes for NO metabolism regulation NOS1 and NOS2 were chosen as objects of interest. Six SNPs (three for each gene) were identified and evaluated. Allele frequencies for NOS1 and NOS2 SNPs were compared with NCBI database (Fig. 17). NOS1 SNPs rs1047735, rs374175 and rs2682826 show dissimilarities with NCBI data.

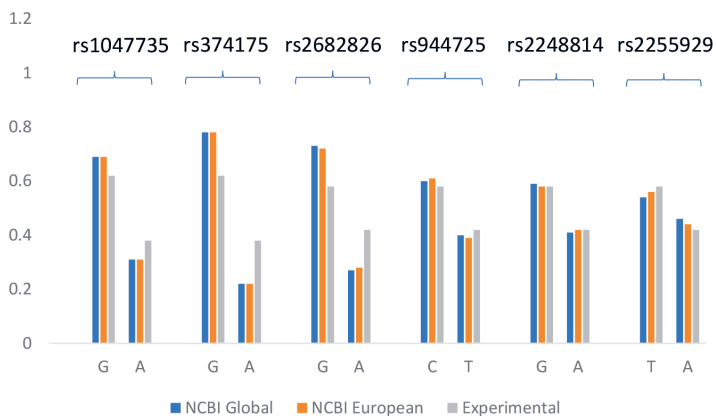


Figure 17. NOS1 and NOS2 SNPs allele frequencies in comparison with NCBI.

## 5. CONCLUSIONS

- Single-strand DNA break levels are significantly increased in MS and T1D patients compared to healthy controls both in whole blood and isolated peripheral blood mononuclear cells. Levels of oxidized bases in MS case, however, did not show any difference between the study group and the control group.
- Nitric oxide production in blood is significantly increased in MS and T1D patients compared to controls. Nitrite and nitrate levels also show a significant increase in the MS study group, but decreases in the T1D study group when compared to healthy control.
- Compared to healthy subjects, patients with MS have decreased MDA levels both in plasma and serum samples.
- There are significant correlations between levels of NO and serum nitrites; level of NO and plasma MDA; serum nitrites and serum nitrates; plasma nitrites and plasma MDA
- Plasma nitrite levels of MS patients are associated with gender, and serum nitrites are associated with EDSS score.
- XRCC1 gene SNP rs25487 show an association with MS based on the HWE analysis, however, further investigation is required.
- XRCC1 gene SNP rs25487 is associated with DNA damage and with levels of NOx. C allele of this gene and TT genotype are associated with plasma and serum MDA levels.
- Based on the NGS data Chr9 region is the most potent for future studies, NOS1 gene SNPs rs1047735, rs3741475, rs2682826 are potentially associated with MS, and GRIA3 rs12557782 SNP on ChrX is a promising subject for investigation.

## 6. THESIS FOR DEFENSE

- DNA damage caused by single-strand breaks, together with PARP1 rs3219090 and XRCC1 rs25487 SNPs, show a strong association with MS
- MS patients have elevated levels of nitric oxide which might have a positive correlation with NOS1 gene SNPs associated with MS
- MS patients having lower levels of MDA than healthy subjects seem controversial, but might be associated with NO antioxidant properties
- T1D and MS show a similar trend of increased levels of DNA lesions, but different pattern in case of NO metabolites

## 7. PUBLICATIONS

1. **Borisovs V.**, Ļeonova E., Baumann L., Kalniņa J., Mjagkova N., Sjakste N. Blood levels of nitric oxide and DNA breaks assayed in whole blood and isolated peripheral blood mononucleated cells in patients with multiple sclerosis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2019 Jul; 843: 90–94. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.11.008. Epub 2018 Nov 23. PMID: 31421744.
2. **Borisovs V.**, Bodrenko J., Kalnina J., Sjakste N. Nitrosative stress parameters and the level of oxidized DNA bases in patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis*. 2021 Oct; 36(7): 1935–1941. doi: 10.1007/s11011-021-00786-5. Epub 2021 Aug 21. PMID: 34417942.
3. Rostoka E., Salna I., Dekante A., Pahirko L., **Borisovs V.**, Celma L., Valeinis J., Sjakste N., Sokolovska J. DNA damage in leukocytes and serum nitrite concentration are negatively associated in type 1 diabetes. *Mutagenesis*. 2021 Jul 7; 6(3): 213–222. doi: 10.1093/mutage/geab015. PMID: 34008029.
4. **Borisovs V.**, Paramonova N., Sjakste N., Investigating the Correlation between Genetic and Biochemical Markers in Multiple Sclerosis – submitted

## 8. APPROBATION OF RESEARCH

1. V. Borisovs, E. Ļeonova, J. Kalniņa, N. Mjagkova, N. Sjakste. *Background level of DNA damage determined in whole blood and lymphocytes of multiple sclerosis patients*, The 76<sup>th</sup> Conference of the University of Latvia, Riga, Latvia. 2018. Poster presentation.
2. V. Borisovs, E. Leonova, J. Kalnina, N. Mjagkova, N. Sjakste. *DNA oxidative damage determined in whole blood and lymphocytes of patients with multiple sclerosis*, 46<sup>th</sup> EEMGS/30<sup>th</sup> GUM meeting, Potsdam, Germany. 2018. Poster presentation.
3. V. Borisovs, E. Ļeonova, J. Kalniņa, N. Mjagkova, N. Sjakste. *DNA damage levels determined in whole blood and lymphocytes of patients with multiple sclerosis*, 56<sup>th</sup> International scientific student conference, Novosibirsk, Russia. 2018. Poster presentation.
4. J. Sokolovska, K. Ošiņa, V. Borisovs, L. Baumane, A. Dekante, L. Pahirko, J. Valeinis, V. Rovīte, V. Pīrāgs, N. Sjakste. *Nitric oxide metabolism and DNA breakage in autoimmune diseases*, 13<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop, Pushchino, Russia. 2019. Poster presentation.
5. K. Ošiņa, N. Paramonova, J. Kalniņa, V. Borisovs, N. Sjakste. *Proteosomal protein Gene Expression and DNA Integrity in Multiple Sclerosis*, 13<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop, Pushchino, Russia. 2019. Poster presentation.
6. J. Bodrenko, V. Borisovs, E. Ļeonova, J. Kalniņa, N. Paramonova, N. Sjakste. *Products of DNA oxidative stress damage as biomarkers for diagnosis of early stages of multiple sclerosis*, The 62<sup>nd</sup> international scientific conference of Daugavpils university, Daugavpils, Latvia. 2020. Online.
7. V. Borisovs, J. Bodrenko, E. Ļeonova, J. Kalniņa, N. Paramonova, N. Sjakste. *Potential biomarkers for early diagnosis of multiple sclerosis*, The 78<sup>th</sup> Conference of the University of Latvia, Riga, Latvia. 2020. Poster presentation. Abstract book.
8. V. Borisovs, J. Bodrenko, E. Leonova, I. Trapina, N. Paramonova, N. Sjakste. *The MS puzzle: piecing together biochemical and genetic biomarkers*, 7<sup>th</sup> Venusberg Meeting on Neuroinflammation, Belval, Luxembourg. 2023. Poster presentation. Abstract book.

## 9. EDUCATION AND RESEARCH EXPERIENCE OF THE AUTHOR

### Education

2018–2020 Doctoral studies in Natural Sciences (Biology), University of Latvia, Faculty of Biology  
2017–2018 Doctoral studies in Biology, Daugavpils University  
2014–2016 Master's degree in Biochemistry, Uppsala University  
2011–2014 Bachelor's studies (Chemistry) University of Latvia, Faculty of Chemistry  
2008–2011 Rigas Stradiņš University, Faculty of Medicine

### Employment

2020–2022, Latvia MGI Tech Field Application Developer and Sample Preparation team leader  
2022 – now, University of Latvia Faculty of Medicine as a researcher  
2020–2022, University of Latvia Faculty of Medicine as a laboratory technician  
2018–2020, Latvian Institute of Organic Synthesis as a scientific assistant  
2017 – now, University of Latvia Faculty of Medicine as a teaching assistant  
2017–2020, University of Latvia Institute of Biology as a scientific assistant  
2016–2017, JSC Olainfarm as a lead chemist in the standardization lab

### Research projects

VPP-14-2-7 "Molecular mechanisms, pharmacogenetics and novel therapies of diabetes and cardiovascular complications"  
ERA\_NET RUS program project "Study of the new post-replicative modification of DNA by Poly(ADP-ribose) polymerases and its implication for anticancer therapy"  
ERDF project 1.1.1.1/18/A/036 "Secretory IgA and gut microbiome interaction and dynamics during the antidiabetic therapy"  
ERDF project 1.1.1.1/16/A/016 "Determination of proteasome-related genetic, epigenetic and clinical markers for multiple sclerosis"

### Teaching experience

Biochemistry I. Pharmacy, 2<sup>nd</sup> year  
Basics of biochemistry. Dentistry, 1<sup>st</sup> year  
Dental biomaterials. Dentistry, 3<sup>rd</sup> year  
5th year dentistry students' thesis – *Genotoxicity of BPA containing dental biomaterials.*  
2<sup>nd</sup> year pharmacy students' thesis – *Nitric oxide metabolite levels in the blood plasma of patients with multiple sclerosis depending on the therapy*



## 10. ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the European Regional Development Fund under the project “Determination of proteasome-related genetic, epigenetic and clinical markers for multiple sclerosis” (Project No. 1.1.1.1/16/A/016).

I would like to thank all study participants for their contribution and a special thanks to the medical staff of Latvian Maritime Medicine Centre for organizing patient recruitment and providing biological material.

I would like to express my deepest gratitude to my supervisor Prof. Nikolajs Sjakste for his support and experience. I am also grateful to my colleagues in the University of Latvia for their contribution, practical suggestions, productive collaborations and support with special gratitude to Elīna Ļeonova, Ilva Trapiņa, Natālija Paramonova, Evita Rostoka and Jeļizaveta Sokolovska.

I would also like to thank Latvia MGI Tech for the opportunity to use their platform for this research and invaluable help from their bioinformatics team.

Finally, I would like to thank my wife, family, and friends for their patience, understanding and support.

# LITERATŪRAS SARAKSTS /

## REFERENCES

1. Adamczyk, B., Wawrzyniak, S., Kasperczyk, S., Adamczyk-Sowa, M., 2017. The Evaluation of Oxidative Stress Parameters in Serum Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Treated with II-Line Immunomodulatory Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 9625806. <https://doi.org/10.1155/2017/9625806>
2. Akanji, M.A., Adeyanju, A.A., Rotimi, D., Adeyemi, O.S., 2020. Nitric Oxide Balance in Health and Diseases: Implications for New Treatment Strategies. *The Open Biochemistry Journal* 14. <https://doi.org/10.2174/1874091X02014010025>
3. Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
4. Balasa, R., Barcutean, L., Mosora, O., Manu, D., 2021. Reviewing the Significance of Blood–Brain Barrier Disruption in Multiple Sclerosis Pathology and Treatment. *Int J Mol Sci* 22, 8370. <https://doi.org/10.3390/ijms22168370>
5. Bourguiba-Hachemi, S., Ashkanani, T.K., Kadhem, F.J., Almawi, W.Y., Alroughani, R., Fathallah, M.D., 2016. ZFAT gene variant association with multiple sclerosis in the Arabian Gulf population: A genetic basis for gender-associated susceptibility. *Mol Med Rep* 14, 3543–3550. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5692>
6. Chatterjee, N., Walker, G.C., 2017. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 58, 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
7. Comabella, M., Craig, D.W., Morcillo-Suárez, C., Río, J., Navarro, A., Fernández, M., Martín, R., Montalban, X., 2009. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 66, 972–978. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.150>
8. Correa-Aragunde, N., Foresi, N., Del Castello, F., Lamattina, L., 2018. A singular nitric oxide synthase with a globin domain found in *Synechococcus* PCC 7335 mobilizes N from arginine to nitrate. *Sci Rep* 8, 12505. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30889-6>
9. Coyle, P.K., 2021. What Can We Learn from Sex Differences in MS? *J Pers Med* 11, 1006. <https://doi.org/10.3390/jpm11101006>
10. Crisp, R.L., Maltaner, R.E., Vittori, D.C., Solari, L., Gammella, D., Schwartzman, G., García, E., Rapetti, M.C., Donato, H., Nesse, A., 2016. Red blood cell aquaporin-1 expression is decreased in hereditary spherocytosis. *Ann Hematol* 95, 1595–1601. <https://doi.org/10.1007/s00277-016-2757-0>
11. Dong, K., Gao, Z.-W., Zhang, H.-Z., 2016. The role of adenosinergic pathway in human autoimmune diseases. *Immunol Res* 64, 1133–1141. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8870-2>
12. Fairless, R., Bading, H., Diem, R., 2021. Pathophysiological Ionotropic Glutamate Signalling in Neuroinflammatory Disease as a Therapeutic Target. *Front Neurosci* 15, 741280. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.741280>

13. Fominykh, V., Onufriev, M.V., Vorobyeva, A., Brylev, L., Yakovlev, A.A., Zakharova, M.N., Gulyaeva, N.V., 2016. Increased S-nitrosothiols are associated with spinal cord injury in multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 28, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.09.017>
14. Garg, N., Smith, T.W., 2015. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav* 5, e00362. <https://doi.org/10.1002/brb3.362>
15. Geiger, M., Hayter, E., Martin, R.S., Spence, D., 2022. Red blood cells in type 1 diabetes and multiple sclerosis and technologies to measure their emerging roles. *J Transl Autoimmun* 5, 100161. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2022.100161>
16. Gene: ATM (ENSG00000149311) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107 [WWW Document], n.d. URL [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000149311;r=11:108223044-108369102](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000149311;r=11:108223044-108369102) (accessed 9.6.22).
17. Gene: PARP1 (ENSG00000143799) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107 [WWW Document], n.d. URL [https://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000143799;r=1:226548392-226595780](https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000143799;r=1:226548392-226595780) (accessed 9.6.22).
18. Gene: XPA (ENSG00000136936) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107 [WWW Document], n.d. URL [https://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000136936;r=9:100437191-100459639](https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000136936;r=9:100437191-100459639) (accessed 9.6.22).
19. Gene: XPC (ENSG00000154767) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107 [WWW Document], n.d. URL [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000154767;r=3:14145147-14178621](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000154767;r=3:14145147-14178621) (accessed 10.3.22).
20. Gene: XPC (ENSG00000154767) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107 [WWW Document], n.d. URL [https://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000154767;r=3:14186647-14220283](https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000154767;r=3:14186647-14220283) (accessed 9.6.22).
21. Gene: XRCC1 (ENSG00000073050) – Summary – Homo\_sapiens – Ensembl genome browser 107 [WWW Document], n.d. URL [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000073050;r=19:43543311-43580473](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000073050;r=19:43543311-43580473) (accessed 10.3.22).
22. Gene: XRCC1 (ENSG00000073050) – Summary – Homo\_sapiens – GRCh37 Archive browser 107 [WWW Document], n.d. URL [https://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000073050;r=19:44047192-44084625](https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000073050;r=19:44047192-44084625) (accessed 9.6.22).
23. Ghasemi, N., Razavi, S., Nikzad, E., 2017. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J* 19, 1–10.
24. Gong, L., Luo, M., Sun, R., Qiu, L., Chen, C., Luo, Z., 2021. Significant Association Between XRCC1 Expression and Its rs25487 Polymorphism and Radiotherapy-Related Cancer Prognosis. *Front Oncol* 11, 654784. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.654784>

25. Haghikia, Aiden, Kayacelebi, A.A., Beckmann, B., Hanff, E., Gold, R., Haghikia, Arash, Tsikas, D., 2015. Serum and cerebrospinal fluid concentrations of homoarginine, arginine, asymmetric and symmetric dimethylarginine, nitrite and nitrate in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Amino Acids* 47, 1837–1845. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2015-0>
26. Handel, A.E., Handunnetthi, L., Ebers, G.C., Ramagopalan, S.V., 2009. Type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis: common etiological features. *Nat Rev Endocrinol* 5, 655–664. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.216>
27. Huang, W.-J., Chen, W.-W., Zhang, X., 2017. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Exp Ther Med* 13, 3163–3166. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4410>
28. Ingwersen, J., Wingerath, B., Graf, J., Lepka, K., Hofrichter, M., Schröter, F., Wedekind, F., Bauer, A., Schrader, J., Hartung, H.-P., Prozorovski, T., Aktas, O., 2016. Dual roles of the adenosine A2a receptor in autoimmune neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 13, 48. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0512-z>
29. Ito, F., Sono, Y., Ito, T., 2019. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants (Basel)* 8, 72. <https://doi.org/10.3390/antiox8030072>
30. Janků, M., Luhová, L., Petřiválský, M., 2019. On the Origin and Fate of Reactive Oxygen Species in Plant Cell Compartments. *Antioxidants (Basel)* 8, 105. <https://doi.org/10.3390/antiox8040105>
31. Kim, M.Y., 2017. Intracellular and extracellular factors influencing the genotoxicity of nitric oxide and reactive oxygen species. *Oncology Letters* 13, 1417–1424. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5584>
32. Lan, M., Tang, X., Zhang, J., Yao, Z., 2018. Insights in pathogenesis of multiple sclerosis: nitric oxide may induce mitochondrial dysfunction of oligodendrocytes. *Rev Neurosci* 29, 39–53. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0033>
33. Lane, M., Yadav, V., 2020. Multiple Sclerosis. *Textbook of Natural Medicine* 1587–1599.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-43044-9.00199-0>
34. Ma, W.-T., Gao, F., Gu, K., Chen, D.-K., 2019. The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *Front Immunol* 10, 1140. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01140>
35. Mallucci, G., Peruzzotti-Jametti, L., Bernstock, J.D., Pluchino, S., 2015. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 127–128, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.02.003>
36. Mancini, A., Tantucci, M., Mazzocchetti, P., de Iure, A., Durante, V., Macchioni, L., Giampà, C., Alvino, A., Gaetani, L., Costa, C., Tozzi, A., Calabresi, P., Di Filippo, M., 2018. Microglial activation and the nitric oxide/cGMP/PKG pathway underlie enhanced neuronal vulnerability to mitochondrial dysfunction in experimental multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 113, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.01.002>
37. Mas-Bargues, C., Escrivá, C., Dromant, M., Borrás, C., Viña, J., 2021. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Arch Biochem Biophys* 709, 108941. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108941>

38. McGinley, M.P., Goldschmidt, C.H., Rae-Grant, A.D., 2021. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA* 325, 765–779. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.26858>
39. Noroozi, S., Arababadi, M.K., Meimand, H.A.E., Asadikaram, G., 2017. The Effect of IFN-beta 1a on Biochemical Factors in Multiple Sclerosis Patients. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 19, 8.
40. Perrone, S., Lotti, F., Geronzi, U., Guidoni, E., Longini, M., Buonocore, G., 2016. Oxidative Stress in Cancer-Prone Genetic Diseases in Pediatric Age: The Role of Mitochondrial Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 4782426. <https://doi.org/10.1155/2016/4782426>
41. Pfeiffer, P., Goedecke, W., Obe, G., 2000. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289–302. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.289>
42. Pozzilli, V., Grasso, E.A., Tomassini, V., 2022. Similarities and differences between multiple sclerosis and type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 38, e3505. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3505>
43. Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 49, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
44. Saif Eldeen, E.M.S., El Sharkawy, R., Abd El Azim, G., Mohamed, N., Abd Elmajed, M., 2019. Role of nitric oxide and malondialdehyde biomarkers in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Sci J Al-Azhar Med Fac Girls* 3, 544. [https://doi.org/10.4103/sjamf.sjamf\\_59\\_19](https://doi.org/10.4103/sjamf.sjamf_59_19)
45. SIRT6 sirtuin 6 [Homo sapiens (human)] – Gene – NCBI [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51548#summary> (accessed 9.13.22).
46. Smith, K.J., Lassmann, H., 2002. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 1, 232–241. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(02)00102-3)
47. Sun, Y., Lu, Y., Saredy, J., Wang, X., Drummer IV, C., Shao, Y., Saaoud, F., Xu, K., Liu, M., Yang, W.Y., Jiang, X., Wang, H., Yang, X., 2020. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. *Redox Biology* 37, 101696. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101696>
48. Tafti, D., Ehsan, M., Xixis, K.L., 2022. Multiple Sclerosis, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
49. Tettey, P., Simpson, S., Taylor, B.V., Mei, I.A.F. van der, 2015. The co-occurrence of multiple sclerosis and type 1 diabetes: Shared aetiologic features and clinical implication for MS aetiology. *Journal of the Neurological Sciences* 348, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.11.019>
50. Tiwari, V., Wilson, D.M., 2019. DNA Damage and Associated DNA Repair Defects in Disease and Premature Aging. *Am J Hum Genet* 105, 237–257. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.06.005>
51. Violi, F., Marino, R., Milite, M. t., Loffredo, L., 1999. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 15, 283–288. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-7560\(199907/08\)15:4<283::AID-DMRR42>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-7560(199907/08)15:4<283::AID-DMRR42>3.0.CO;2-U)
52. Visconti, R., Grieco, D., 2009. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12, 240–245.

53. Wang, H., Wang, L., Xie, Z., Zhou, S., Li, Y., Zhou, Y., Sun, M., 2020. Nitric Oxide (NO) and NO Synthases (NOS)-Based Targeted Therapy for Colon Cancer. *Cancers (Basel)* 12, 1881. <https://doi.org/10.3390/cancers12071881>
54. Zacca, E.R., Amezcua Vesely, M.C., Ferrero, P.V., Acosta, C.D.V., Ponce, N.E., Bossio, S.N., Mussano, E., Onetti, L., Cadile, I., Acosta Rodríguez, E.V., Montes, C.L., Gruppi, A., 2021. B cells from Patients with Rheumatoid Arthritis Show Conserved CD39-Mediated Regulatory Function and increased CD39 Expression After Positive Response to Therapy. *J Mol Biol* 433, 166687. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.021>