



LATVIJAS  
UNIVERSITĀTE

Promocijas darba  
kopsavilkums

---

Lauma Freimane

MITOHONDRIĀLIE UN  
ĢENĒTISKIE BIOMARĶIERI  
TUBERKULOZĒ: TERAPIJAS  
IETEKME, BLAKUSPARĀDĪBAS UN  
IMŪNSENESCENCE

Rīga 2026



**LATVIJAS**  
UNIVERSITĀTE

---

**BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE**

**Lauma Freimane**

**MITOHONDRIĀLIE UN  
ĢENĒTISKIE BIOMARĶIERI  
TUBERKULOZĒ: TERAPIJAS  
IETEKME, BLAKUSPARĀDĪBAS  
UN IMŪNSENESCENCE**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

zinātniskā doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai  
bioloģijas nozarē  
molekulārās bioloģijas apakšnozarē

Rīga 2026

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Biomedicīnas un pētījumu studiju centrā, Cilvēka ģenētikas un molekulārās medicīnas zinātniskajā grupā laikā no 2020. līdz 2025. gadam.

Darbs tapis pateicoties vairāku projektu atbalstam: Valsts pētījuma programmas Biomedicīna sabiedrības veselībai (BIOMEDICINE) „Inovatīvu infekcijas procesa regulācijas un modulācijas stratēģiju izveide” (7. projekta, 7.3. apakšprojekta ceturrtā posma), Rīgas Stradiņa universitātes pētījuma grantu Nr. 23030103 un 6-ZD-22/25/2022, Latvijas Zinātnes padomes fundamentālo un lietišķo pētījumu projekta Nr. lzp2020/1-0050 un Eiropas Atveseļošanās fonda „Latvijas Organiskās sintēzes institūta un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra konsolidācijas” projekta Nr.5.2.1.1.i.0/2/24/I/CFLA/001 (Nr. 11/BMC/DG).

Darba forma: publikāciju kopa Molekulārās bioloģijas apakšnozarē.

Darba zinātniskā vadītāja: *Dr. biol. prof. Renāte Ranka.*

Darba recenzenti:

- 1) asociētais profesors **Reinis Vilšķērsts,**
- 2) profesore *Dr. Laima Ambrozaitytė,*
- 3) asociētais profesors **Maurizio Sessa.**

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Latvijas Universitātes Bioloģijas promocijas padomes atklātā sēdē 2026. gada 17. februārī plkst. 11.00 Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Rātsupītes ielā 1 k-1.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

Latvijas Universitātes Bioloģijas  
promocijas padomes priekšsēdētājs \_\_\_\_\_ /*Dr. biol. Guntis Brūmelis/*

Padomes sekretāre \_\_\_\_\_ /*Ilze Elbere/*

© Latvijas Universitāte, 2026

© Lauma Freimane, 2026

ISBN

ISBN (PDF)

## ANOTĀCIJA

Tuberkuloze (TB) ir saglabājusi savu lomu kā būtisks veselības drauds globālā mērogā, par spīti inovācijām zāļu vielu izstrādē, terapijas protokolu un diagnostisko metožu attīstībai. TB pacienti saskaras ar terapijas blakusparādībām, kas negatīvi ietekmē to labbūtību, dzīves kvalitāti vai pat noved pie priekšlaicīgas terapijas pārtraukšanas. Šie izaicinājumi ciņā ar TB uzsver nepieciešamību pēc jaunu biomarķieru identificēšanas, lai uzlabotu slimības gaitas monitoringu un klīnisko lēmumu pieņemšanu terapijas laikā.

Šajā promocijas darbā ir aplūkoti vairāki uz asiņu izmeklējumiem balstīti mitohondriālās un genomiskās DNS izcelsmes biomarķieri pacientiem ar TB apvienojumā ar citiem potenciāli ietekmējošiem faktoriem kā, piemēram, antropometriskajiem rādītājiem un dzīvesveida paradumiem, ar mērķi noteikt TB radīto bioloģisko lomu un sistēmiskos efektus, tajā skaitā arī terapijas radītos.

Iegūtie rezultāti liecina, ka mitohondrijiem ir būtiska loma TB patoģenēzē, kur TB infekcija stimulē imūnsenesescences procesus, potenciāli paātrinot infekcijas attīstību. Mitohondriālā šūnu brīvā cirkulējošā DNS uzrādīja strauju atbildes reakciju uz TB terapiju, konkrētāk, etambutolu, izceļot to kā potenciāli pielietojamu biomarķieri ārstēšanas monitorēšanai. Turklāt pacientu dzīvesveida paradumi un antropometriskie rādītāji būtiski ietekmē analizētos biomarķierus un būtu jāņem vērā uzsākot terapiju un tās laikā.

Iegūtie rezultāti var kalpot par pamatu turpmākiem pētījumiem, kas vērsti uz TB gaitas novērošanas rīku un marķieru izveidi, t.sk., arī uz saimniekorganisma mērķētas terapijas izstrādē vai tādu, kas balstīti uz mitohondriālajām funkcijām TB patoģenēzē. Šāda molekulārā pieeja varētu uzlabot TB uzraudzību un terapijas iznākumu.

**Atslēgas vārdi:** tuberkuloze, mtDNS kopiju skaits, mtDNS ģenētiskās variācijas, telomēru garums, biomarķieri

# SATURS

IEVADS .....	6
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	8
1.1. Ieskats TB .....	8
1.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> patogenitātes mehānismi ...	8
1.2. TB ārstēšana un blakusparādības .....	9
1.2.1. Nevēlamas zāļu reakcijas TB terapijā .....	10
1.3. DNS balstītu biomarķieru loma TB .....	11
1.3.1. DNS balstīti biomarķieri no pilnām asinīm: mtDNS un TL diagnostiskais potenciāls .....	12
1.3.2. Šūnu brīvās DNS balstīti biomarķieri asins plazmā .....	13
2. MATERIĀLI UN METODES .....	15
2.1. Pētījuma dizains un paraugu ievākšana .....	15
2.2. Molekulārās metodes .....	17
2.2.1. I publikācija – reālā laika PĶR .....	17
2.2.2. II publikācija – pilna mtDNS genoma sekvenčēšana .....	17
2.2.3. III publikācija – DNS izdalīšana un ddPĶR .....	18
2.2.4. Pret-TB zāļu farmakokinētisko parametru noteikšana ar LC-MS/MS .....	19
2.3. Bioinformātikās un statistiskās analīzes .....	19
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA .....	21
3.1. MDR-TB pacientiem var novērot imunosenesces pazīmes .....	21
3.2. Amikacīna un kapreomicīna izraisīto blakusparādību izvērtējums pacientiem ar MDR-TB .....	22
3.3. Mitohondriālo ģenētisko faktoru loma amikacīna un kapreomicīna saistītajās NZR .....	22
3.4. Svārstības ccf-mtDNS un -nDNS CN asins plazmā pēc TB medikamentu saņemšanas pacientiem ar DS-TB .....	23
3.5. Citi aplūkoto DNS biomarķieru ietekmējošie faktori .....	24
3.6. Pētījuma ierobežojumi .....	26
SECINĀJUMI .....	27
AIZSTĀVAMĀS TĒZES .....	28
ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS .....	29
PĒTĪJUMA APROBĀCIJA .....	30
PATEICĪBAS .....	31
LITERATŪRAS SARAKSTS .....	32

## SAĪSINĀJUMI

ATF – adenoziņa trifosfāts

AUC – laukums zem koncentrācijas-laika līknes (angļu val. *area under curve*)

ccf-DNS – šūnu brīvā cirkulējošā DNS (angļu val. *circulating cell-free DNA*)

CN – kopiju skaits (angļu val. *copy number*)

CRP – C-reaktīvais proteīns

DAMP – bojājumu saistītais molekulārais patrons  
(angļu val. *damage-associated molecular pattern*)

ddPĶR – pilienu digitālā PĶR

DS-TB – zāļu jutīgā TB (angļu val. *drug-sensitive TB*)

HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss (angļu val. *human immunodeficiency virus*)

ĶMI – ķermeņa masas indekss

LC-MS/MS – šķidruma hromatogrāfija-tandēma masspektrometrija

MDR-TB – multirezistentā tuberkuloze  
(angļu val. *multidrug-resistant tuberculosis*)

*Mtb* – *Mycobacterium tuberculosis*

mtDNS – mitohondriālā DNS

nDNS – kodola DNS (angļu val. *nuclear DNA*)

NGS – jaunās paaudzes sekvenčēšana

NZR – nevēlamas zāļu reakcijas

OXPHOS – oksidatīvā fosforilācija

PĶR – polimerāzes ķēdes reakcija

PVO – Pasaules Veselības organizācija

ROS – reaktīvie skābekļa savienojumi

TL – telomēru garums (angļu val. *telomere length*)

## IEVADS

Tuberkuloze (TB) ir būtisks izaicinājums veselības nozarei visā pasaulē, kas katru gadu izraisa nāvi miljoniem cilvēku, it īpaši zemu un vidēju ienākumu reģionos (WHO 2024c). Lai gan ir novērojami uzlabojumi diagnostikas un terapijas stratēģiju attīstībā, nav iespējams veiksmīgi paredzēt slimības gaitu vai laicīgi atpazīt individuus, kas ir pakļauti augstākam blakusparādību riskam. Marķieri, kas ļautu savlaicīgi novērtēt uzņēmību pret TB infekciju, attīstības gaitu un atbildes reakciju uz terapiju, varētu ievērojami uzlabot TB ārstēšanas stratēģijas un terapijas iznākumus.

Attiecībā uz biomarķieriem, mitohondriji ir daudzsološs molekulārais mērķis. Lai gan vislabāk tie ir pazīstami ar savu lomu šūnu enerģijas metabolismā, salīdzinoši nesen tie atzīti arī par būtiskiem imūnās sistēmas reakciju un iekaisuma procesu regulatoriem. Minētie procesi ir cieši saistīti arī ar TB patogēnēzi, un tādējādi mitohondriji, iespējams, varētu kalpot par biomarķieriem cilvēka organisma reakciju monitorēšanai terapijas laikā. Piemēram, izmaiņas mitohondriju DNS molekulu kopiju skaitā (mtDNS CN), kombinācijā ar telomēru garuma (TL) variācijām cirkulējošās asins šūnās var liecināt par imūnsenescenci, kas, savukārt, var ietekmēt saimniekorganisma uzņēmību pret infekcijas slimībām, tostarp arī TB. Tas liek vaicāt, kā DNS balstīti biomarķieri varētu tikt izmantoti TB ārstēšanas uzraudzības uzlabošanai, un kādus tieši slimības gaitas aspektus tie varētu atspoguļot.

**Darba nozīme:** šajā darbā ir analizēti mtDNS CN, mitohondriālo ģenētisko variāciju, asiņu šūnu TL un pacientu individuālie faktori kā potenciāli biomarķieri, lai novērtētu TB bioloģisko ietekmi uz saimniekorganismu un raksturotu pret-TB zāļu radītos sistēmiskos efektus. Lai gan ir nepieciešami turpmāki pētījumi šo rezultātu pielietošanai klīniskajā praksē, darbs sniedz vērtīgu ieskatu TB patogēnēzē un pret-TB terapijas radītajos sistēmiskajos efektos, tādējādi veicinot turpmāku personalizētās terapijas pieeju izstrādi un uzlabojot TB gaitas uzraudzību.

**Pētījuma mērķis:** Izpētīt TB pacientu asiņu izmeklējumos balstītus DNS biomarķierus, mitohondriālās un šūnu kodola izcelsmes, lai novērtētu to potenciālo lomu un pielietojumu slimības gaitas, terapijas un pret-TB zāļu radīto blakusparādību uzraudzībā.

### **Darba uzdevumi:**

- 1) Veikt mtDNS CN un TL noteikšanu TB pacientu asiņu paraugos, salīdzināt mērījumu rezultātus ar kontroles grupas paraugiem, kas ir salāgoti pēc vecuma un dzimuma sadalījuma;

- 2) Veikt pilna mitohondriālā genoma variantu analīzi multirezistentās TB (MDR-TB) pacientiem, lai noteiktu to iespējamo ietekmi uz amikacīna un kapreomicīna izraisītajām blakusparādībām;
- 3) Veikt cirkulējošās šūnu brīvās mtDNS (ccf-mtDNS) un kodola DNS (ccf-nDNS) CN mērījumus pacientu ar zāļu jutīgu TB (DS-TB) plazmā pirms un pēc medikamentu saņemšanas, lai noteiktu īstermiņa sistēmiskos efektus;
- 4) Noteikt citus, pacientu specifiskus un dzīvesveida saistītus, faktorus, kas varētu ietekmēt TB attīstību un/vai novēroto biomarkieru vērtības.

Darbs tapis pateicoties vairāku projektu atbalstam: Valsts Pētījuma programmas Biomedicīna sabiedrības veselībai (BIOMEDICINE) „Inovatīvu infekcijas procesa regulācijas un modulācijas stratēģiju izveide” (7. projekta, 7.3. apakšprojekta ceturtnā posmā), Rīgas Stradiņa universitātes pētījuma granta Nr. 23030103 un 6-ZD-22/25/2022, Latvijas Zinātnes padomes fundamentālo un lietišķo pētījumu projekta Nr. lzp2020/1-0050 un Eiropas Atveseļošanās fonda „Latvijas Organiskās sintēzes institūta un Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra konsolidācijas” projekta Nr.5.2.1.1.i.0/2/24/I/CFLA/001 (Nr. 11/BMC/DG).

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Ieskats TB

TB galvenais izraisītājs *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) ir uzskatāms par nāvējošāko patogēnu cilvēces vēsturē, kas laika gaitā ir izraisījis vairāk nāves gadījumu nekā jebkurš cits mikroorganisms. Lai gan TB ir ārstējama un savā ziņā pat novēršama, katrs ceturtais indivīds ir inficēts ar *Mtb* – sauktu arī par latentu infekciju –, kas var kļūt aktīva un izraisīt simptomus 5–10% gadījumu, ja imūnā sistēma ir novājināta (Houben and Dodd 2016; WHO 2024c).

Globāli 2023. gadā aptuveni 10,8 miljoniem cilvēku tika diagnosticēta TB, no tiem 8,2 miljoni bija pirmreizējās infekcijas pacienti, savukārt 1,25 miljoni gāja bojā šīs slimības dēļ (WHO 2024c). Lai gan kopumā TB incidence samazinās, MDR-TB prevalences pakāpeniski pieaug un rada būtiskus draudus sabiedrības veselībai (WHO 2024a). Šī iemesla dēļ, neskatoties uz visiem uzlabojumiem TB diagnostikā, ārstēšanā un profilaksē, TB saglabā savu vadošo lomu kā nāvējošākā infekciju slimība, it īpaši starp augsta riska populācijām, piemēram, cilvēka imūndeficīta vīrusa (HIV) pacientiem, indivīdiem ar citām hroniskām slimībām, nepietiekamu uzturu vai augstas saslimstības reģionos dzīvojošajiem (WHO 2024a).

### 1.1.1. *Mycobacterium tuberculosis* patogenitātes mehānismi

*Mtb* ir viena no *Mtb* kompleksa baktērijām, kuru atklājis Roberts Kohs 1882. gadā. *Mtb* ir intracelulārs mikroorganisms, kuru izplata aerosolu veidā ar aktīvu TB inficēts indivīds klepus, šķaudīšanas vai runāšanas laikā. Ielpojot vienu līdz piecām baktērijas nūjiņām var būt pietiekoši, lai attīstītos infekcija (Tellier et al. 2019).

Kad baktērija nokļūst elpceļos, iedzimtā imūnsistēma aktivizē savus aizsardzības mehānismus caur epiteliālo barjeru: alveolārā epitēlija šūnām un alveolārajiem makrofāgiem, kas ir primārais *Mtb* mērķis (Nunes-Alves et al. 2014). Inficētie alveolārie makrofāgi (vai *Mtb* baktērijas tieši) migrē uz plaušu intersticiālajiem audiem, kur sekojoši inficē dažādus no monocītiem atvasinātus un audos mītošus makrofāgus, dendrītiskās šūnas un neitrofilus (Chandra, Grigsby, and Philips 2022). Ja iedzimtās imunitātes atbildes reakcija ir efektīva, *Mtb* baktērijas tiek pilnībā eliminētas, novēršot aktīvas infekcijas attīstību (Chandra et al. 2022; Nunes-Alves et al. 2014).

Ja iedzimtā imunitāte nav spējusi likvidēt patogēnu, tiek aktivizēta adaptīvā imunitāte. Dendrītiskās šūnas vai inflamatorie monocīti migrē uz

pulmonālajiem limfmezgliem, kur tiek apmācītas antigēna specifiskās T šūnas (Chandra et al. 2022). Šis process ierosina imūnšūnu mobilizēšanu uz plaušu parenhīmu, novedot pie granulomu izveides (Pai et al. 2016). Granulomu funkcija ir infekcijas izplatības ierobežošana, tās veido nekrotisks kodols, kuru apņēm amorfa imūnšūnu masa, veidota no *Mtb* inficētiem alveolārajiem makrofāgiem (Ramakrishnan 2012). Lai gan granulomu mērķis ir infekcijas ierobežošana, tās var kalpot par aizsargājošu mikrovidi *Mtb* populācijai, ļaujot izvairīties no imūnsistēmas identificēšanas un eliminācijas. Šis mehānisms ļauj infekcijai persistēt klīniski latentā stāvoklī, saglabājot ierobežotu replikāciju (Luies and du Preez 2020).

Latentu TB raksturo pastāvīga imūnsistēmas atbilde uz *Mtb* antigēniem, bez klasiskajām aktīvas slimības izpausmēm, taču ar paaugstinātu risku tās attīstīt (Narasimhan et al. 2013). Infekcija latentā stāvoklī var persistēt pat gadu desmitiem ilgi, reaktivizējoties tikai apstākļos, kas ir labvēlīgi transmisijai, vai arī tad, kad bakteriālā slodze kļūst pārmērīga. Tas var izraisīt granulomas sabrukumu, ļaujot baktērijām nonākt asinsritē vai atgriezties elpošanas traktā (Anes et al. 2023; Lin et al. 2014; Pai et al. 2016).

*Mtb* izmanto dažādus mehānismus, lai izdzīvotu saimniekorganismā un modulētu tā imūnreakcijas (izvairoties vai aizkavējot tās). Piemēram, *Mtb* inducē apoptozi inficētajos makrofāgos un nekrozi alveolārā epitēlija šūnās, aptur fagosomu nobriešanu inficētajās šūnās un dendrītisko šūnu nobriešanu, aizkavējot T šūnu aktivāciju. Turklāt *Mtb* spēj pārprogrammēt imūnšūnu metabolismu, izraisot mitohondriju disfunkciju, kā rezultātā attīstās T šūnu izsīkums un neefektīva adaptīvā imūnreakcija (Ankley, Thomas, and Olive 2020; Chandra et al. 2022; Danelishvili et al. 2003; Russell et al. 2019; Vázquez et al. 2017).

## 1.2. TB ārstēšana un blakusparādības

TB ārstēšanas shēma pēdējos gados ir būtiski uzlabojusies, kļūstot īsāka un optimizētāka. DS-TB tagad tiek ārstēta tikai ar perorāli lietojamiem medikamentiem. Standarta DS-TB terapiju veido intensīvā fāze, kas ilgst divus mēnešus, kurai seko uzturošā fāze divu līdz četrus mēnešu garumā, lietojot 4–5 dažādus antibiotiku preparātus. Kopš 2021. gada sešu mēnešu ārstēšanas režīms tiek uzskatīts par zelta standartu, un tas ir piemērots visiem pacientiem neatkarīgi no vecuma, slimības smaguma vai HIV statusa (WHO 2022a). Sešu mēnešu shēma ietver divu mēnešu garu pirmās izvēles zāļu terapiju ar izoniazīdu, rifampicīnu, pirazinamīdu un etambutolu, kurai seko četrus mēnešu gara terapija ar izoniazīdu un rifampicīnu.

MDR-TB ārstēšana ir daudz izaicinošāka nekā DS-TB. MDR-TB ir definēta kā TB, kuru izraisa *Mtb* celmi, kas ir rezistenti pret vismaz diviem pirmās izvēles pret-TB medikamentiem: rifampicīnu un izoniazīdu (WHO 2024b). Kopējā aprēķinātā MDR-TB prevelence pasaulē ir aptuveni 11,6%, ar augstāko izplatību

Austrumeiropas valstīs, Krievijā, Centrālāzijā un daļā Ķīnas (Salari et al. 2023). Līdz 2016. gadam MDR-TB terapija ilga 18–24 mēnešus un ietvēra vairākus injicējamus medikamentus, kuri asociēti ar smagām blakusparādībām. Kopš Pasaules Veselības organizācijas (PVO) vadlīniju atjaunošanas 2022. gadā un jaunu medikamentu apstiprināšanas terapijā, tiek rekomendētas īsākas, perorālas ārstniecības shēmas. Šobrīd MDR-TB ārstēšanas režīmi var tikt iedalīti sešu mēnešu, deviņu mēnešu vai garākos režīmos. *Mtb* celma zāļu jutības testēšana nosaka pacienta piemērotību konkrētai ārstēšanas shēmai (WHO 2022b).

Sešu mēnešu ārstēšanas shēmu sastāda četri medikamenti: bedakvilīns, pretomanīds, linezolidis un moksifloksacīns (WHO 2022b). Deviņu mēnešu shēma tiek lietota pacientiem, kuri nav piemēroti īsākajai sešu mēnešu shēmai. Tā ietver četru mēnešu ilgu intensīvo fāzi (bedakvilīns, levofloksacīns vai moksifloksacīns, etionamīds, etambutols, augstas izoniazīda devas, pirazinamīds un klofazimīns), kurai seko turpinājuma jeb uzturēšanas fāze atlikušajos piecos mēnešos (levofloksacīns vai moksifloksacīns, klofazimīns, etambutols un pirazinamīds). Garākā MDR-TB terapijas shēma (18–24 mēneši) tiek pielāgota pacientiem ar papildu zāļu rezistenci vai citiem komplicējošiem faktoriem. Ārstēšanas shēmas izvēli ietekmē klīniskie faktori (piemēram, slimības smagums, aknu vai nieru mazspēja, nekontrolēts cukura diabēts vai HIV statuss), kontekstuālie faktori (piemēram, HIV vai izoniazīda rezistences izplatība) un pieejamības faktori (piemēram, TB zāļu pieejamība un izmaksas) (WHO 2022a). Terapijas ilgums var tikt pielāgots atkarībā no pacienta atbildes reakcijas uz terapiju (WHO 2022b).

### 1.2.1. Nevēlamas zāļu reakcijas TB terapijā

Nevēlamās zāļu reakcijas (NZR) var ietekmēt dažādas orgānu sistēmas, un to smaguma pakāpe parasti variē no vieglas (1. pakāpes) līdz potenciāli letālai (4. pakāpe). NZR var klasificēt, izmantojot DAIDS (angļu val. *Division of acquired immunodeficiency syndrome*) gradācijas tabulu pieaugušo un bērnu blakusparādību smaguma pakāpes noteikšanai:

- **1. pakāpes (vieglas):** simptomi neietekmē vai ietekmē neredzami ikdienas sociālās un funkcionālās aktivitātes;
- **2. pakāpes (mērenas):** simptomi ietekmē vairāk nekā tikai neredzami ikdienas sociālās un funkcionālās aktivitātes;
- **3. pakāpes (smagas):** simptomi izraisa nespēju veikt ierastās sociālās un funkcionālās aktivitātes;
- **4. pakāpes (dzīvību apdraudošas):** simptomi izraisa nespēju veikt pamata funkcijas vai prasa medicīnisku vai ķirurģisku iejaukšanos, lai novērstu paliekošu bojājumu;
- **5. pakāpes (letālas):** izraisa pacienta nāvi (NIH 2017).

Balstoties uz PVO sniegtajiem datiem, aptuveni 19,3% pacietu ar DS-TB atstātās 3. pakāpes vai pat augstākas NZR (WHO 2022a). Taču šajā jautājumā dati

ir pretrunīgi un atšķiras starp dažādiem ģeogrāfiskajiem reģioniem. 2022. gadā Brazīlijā veiktajā pētījumā tika ziņots, ka 78,8% TB pacientu attīstās vismaz viena NZR. Visbiežāk sastopamās NZR ir hiperurikēmija (27,8%), dispepsija (22,9%) un dermatoloģiskās izpausmes (17,1%) (Sant'Anna et al. 2022). Tomēr 88,7% no DS-TB pacientiem ar NZR, izpausmes radīja vieglus vai mērenus bojājumus (Sant'Anna et al. 2022).

Salīdzinājumā ar DS-TB, MDR-TB ārstēšana prasa ilgāku laiku, lielāku medikamentu slogu, augstākas zaļu devas un iekļauj medikamentus ar augstāku toksicitātes risku. Turklāt pacientiem var rasties smagas un neatgriezeniskas NZR, kas var novest pie sliktākiem ārstēšanas rezultātiem, un izraisīt nāvi aptuveni 15% MDR-TB pacientu. Smagu NZR gadījumā var tikt mainīta TB terapija, tādējādi vēl vairāk apdraudot ārstēšanas efektivitāti. Lai gan īsāki TB terapijas režīmi ir saistīti ar zemāku NZR penetranci, to pielietojums ne vienmēr ir iespējams (WHO 2022b).

Balstoties uz nesenu 2020. gada metaanalīzi par MDR-TB ārstēšanu, tikai 61,3–69,7% pacientu terapija bija veiksmīga (Lan et al. 2020). Turklāt aptuveni 24% pacientu novēroja vismaz vienu pietiekami smagu NZR, lai pārtrauktu kāda medikamenta lietošanu. Piemēram, injicējamie medikamenti – amikacīns un kanamicīns – visbiežāk tika pārtraukti ototoksicitātes dēļ (attiecīgi 87% un 75% gadījumū), savukārt nefrotoksicitāte veidoja 51% no kapreomicīna izraisītajām NZR, kas noveda pie šī medikamenta lietošanas pārtraukšanas (Lan et al. 2020).

### 1.3. DNS balstītu biomarķieru loma TB

Pašreizējie diagnostikas rīki, piemēram, *Mtb* antigēnu testi (tuberkulīna ādas tests, IGRA (interferona-gammas (IFN- $\gamma$ ) izdalīšanās tests) vai T-SPOT tests), krēpu uztriepju mikroskopija, krūškurvja rentgenogrāfija un automatizētais molekulārais tests Xpert MTB/RIF spēlē būtisku lomu TB diagnostikā, aktīvas slimības uzraudzībā, ārstēšanas monitorēšanā un iznākumu prognozēšanā (Heyckendorf et al. 2022; Huang et al. 2022; Nogueira et al. 2022). Tomēr šīm metodēm ir arī būtiski ierobežojumi, tostarp zema vai mainīga jutība, laiktetilpīgums vai mazāka efektivitāte pediatriem pacientiem (Huang et al. 2022). Turklāt tradicionālās pieejas var būt mazāk efektīvas, lai atklātu ārpusplaušu, uztriepes negatīvas vai latentās TB infekcijas (Huang et al. 2022; Jain et al. 2024). Minēto iemeslu dēļ jaunu biomarķieru izstrāde varētu uzlabot diagnostisko metožu jutību, specifiskumu un pieejamību, potenciāli novēršot esošos trūkumus.

Nemot vērā, ka biomarķieru pētniecība aktīvi koncentrējas uz specifiskuma un jutības palielināšanu, saglabājot izmeklējumu pēc iespējas neinvazīvu, tiek izmeklēti dažādi biomarķieri, kas balstīti uz DNS molekulu kā galveno mērķi, gan audu paraugos, gan šūnu brīvos bioloģiskos šķīdumos, plašāk zināmu kā šķidro biopsiju (Li et al. 2024). DNS balstītiem biomarķieriem ir vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar tradicionālajām metodēm, piemēram, mikroskopiju

vai kultūru rezistences testiem: augsta jutība un specifiskums, ātrāka rezultātu ieguve, zema parauga starta koncentrācija, ko var potenciāli izmantot arī latentās infekcijas diagnostikā, kā arī ir pieejamas dažādas tehnoloģijas, kuras var integrēt portatīvās ierīcēs, atvieglojot pielietojumu resursu limitētās lokācijās (Heyckendorf et al. 2022; Nathavitharana et al. 2022; Wang et al. 2022; Yayan et al. 2024).

Tomēr neviens tests vienlaikus nevar atbildēt uz visiem klīniskajiem jautājumiem. Tādēļ pacientu terapijas atbildes reakcijas, slimības progresija un iznākums būtu jāuzrauga, izmantojot dažādu metožu kombināciju, ietverot gan tradicionālos rutīnas testus, gan inovatīvas metodes. Pašlaik nav vienprātības par saimniekorganisma specifiskiem DNS biomarkšiem diagnostikas vai terapijas novērošanas nolūkiem, uzsverot nepieciešamību pēc tādu izstrādes (Shaik, Pillay, and Jeena 2024).

No daudzsoļošajiem DNS biomarkšiem šajā darbā detalizētāk tiks apskatīti tie, kas iegūti no asinīm, parādot to potenciālo lomu TB diagnostikas un slimības gaitas uzraudzībā. Turpmākās literatūras apskata sadaļas pamato šī promocijas darba izvēlētos mērķus no molekulārā un fizioloģiskā skatupunkta.

### **1.3.1. DNS balstīti biomarkšiem no pilnām asinīm: mtDNS un TL diagnostiskais potenciāls**

Kā jau iepriekšējā nodaļā tika uzsvērts, DNS balstīti biomarkšiem ir ļoti perspektīvi. Tomēr vairums pētījumu koncentrējas uz patogēna, nevis saimniekorganisma DNS pielietošanu diagnostikā. No saimniekorganisma viedokļa mtDNS perspektīvi ir labs mērķis TB infekcijas monitorēšanai.

Mitohondriji ir daudzfunkcionālas organelas, kas, neatkarīgi no kodola, satur paši savu DNS un ir atbildīgi ne tikai par adenoziņa trifosfāta (ATF) produkciju un oksidatīvo fosforilāciju (OXPHOS), bet arī par šūnu REDOX līdzsvara modulēšanu, reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) ražošanu, pH un  $Ca^{2+}$  koncentrāciju regulēšanu un to homeostāzi. Turklāt mitohondriji regulē šūnas ciklu, iniciē apoptozi un piedalās dažādos signālceļos un epigenētiskajā regulācijā caur Krebsa cikla starpproduktiem (Wallace 2015; Wallace and Fan 2010; Weinberg, Sena, and Chandel 2015). Papildus jau minētajām funkcijām mitohondriji ir iesaistīti arī iedzimtās imūnās atbildes regulācijā, izmantojot dažādus mehānismus.

Pateicoties mtDNS relatīvajai hipometilācijai, strukturālajām īpašībām un uzņēmībai pret oksidatīviem bojājumiem, tā ir lielisks bojājumu saistīto molekulāro patēru jeb DAMP (angļu val. *damage-associated molecular patterns*) avots. No mtDNS atvasinātie DAMP aktivizē iedzimtās imūnās atbildes sensorus, stimulē citokīnu izdalīšanos un veicina dažādu iekaisīgu slimību patoloģiju (West and Shadel 2017). Ir pierādīts, ka *Mtb* infekcija tieši palielina mitohondriju stresu un ROS produkciju, izraisot oksidētās mtDNS izdalīšanos citosolā,

kur tā darbojas kā DAMP, mediējot iedzimto antimikrobiālo imunitāti un lokālu iekaisumu (West and Shadel 2017).

Cirkulējošo asiņu šūnu mtDNS CN varētu kalpot kā mitohondriju disfunkcijas indikators, šādu stāvokli izraisa arī hroniska *Mtb* infekcija un ilgstoša antigēnu prezentācija (Malik and Czajka 2013; Russell et al. 2019). Lai gan mtDNS CN lielākoties literatūrā saistīts ar geriatricai raksturīgām slimībām, sirds un asinsvadu veselību, ļaundabīgiem audzējiem un citām hroniskām slimšanām, ir ziņota arī tā loma infekcijas slimību predispozīcijas prognozēšanā, slimības smaguma novērtēšanā un zāļu blakusparādību paredzēšanā (Castellani et al. 2020; Sun et al. 2019; Udomsinprasert et al. 2022; Wang et al. 2012).

Sistēmisks oksidatīvais stress un mitohondriju disfunkcija ir saistīti arī ar T šūnu disfunkciju un iekaisuma saistīto novecošanos (angļu val. *inflammaging*) – stāvokli, ko raksturo novecojušu imūnšūnu uzkrāšanās, kas vēl vairāk pastiprina sistēmisko iekaisumu un vājina imūno atbildi (Escrig-Larena, Delgado-Pulido, and Mittelbrunn 2023). Dažādi biomarkieri var raksturot *inflammaging*, tostarp DNS balstīti marķieri, piemēram, mtDNS CN, kā arī leukocītu TL (Lin and Epel 2022). Oksidatīvā stresa ietekmē telomēras saīsinās, tādējādi apdraudot kopējo genomiskās DNS stabilitāti. Saīsināts TL ir saistīts arī ar augstāku mirstību dažādu, ar vecumu saistītu, patoloģiju dēļ (Dolcini et al. 2020). TL jau ir ziņots kā prognostisks marķieris TB ārstēšanas iznākumam, kur pacientiem ar garākām telomērām diagnozes uzstādīšanas laikā ir novērojami labāki terapijas rezultāti (Katoto et al. 2021).

Atgriežoties pie mtDNS, ir svarīgs ne tikai tās CN, bet arī pati kodējošā secība. Aptuveni 93% no mtDNS genoma ir kodējoši un satur evolūcijas gaitā saglabājušās, biežas variācijas, kas norāda uz piederību konkrētai mitohondriālai haplogrupai (Chinnery and Hudson 2013). Tā kā mtDNS nesatur intronus, tā ir vairāk pakļauta somatiskajām variācijām ar potenciāli funkcionālām sekām, reaģējot uz oksidatīvo stresu un citiem vides faktoriem (Ferreira and Rodriguez 2024). Gan mantotās, gan iegūtās mtDNS variācijas var ietekmēt mitohondriju aktivitāti, elpošanas ķēdes darbību un kopējo mitohondriālo funkcionalitāti (Heidari et al. 2022; Sanchez-Contreras and Kennedy 2022; Schaefer et al. 2022; Vázquez-Coto et al. 2022). Iepriekš minētais norāda, ka haplogrupu vai somatisko mtDNS variāciju klātbūtne varētu ietekmēt iekaisuma patoloģiju (West and Shadel 2017). Pašlaik mtDNS variāciju ietekme uz imūnās atbildes modulāciju nav skaidra un ir nepieciešami papildus pētījumi. Savukārt, attiecinot uz TB, ir zināmas vairākas mtDNS variācijas, kurām ir būtiska loma otrās līnijas injicējamo medikamentu – aminoglikozīdu – NZR attīstībā (Gao, Chen, and Guan 2017; Jones et al. 2021).

### 1.3.2. Šūnu brīvās DNS balstīti biomarkieri asins plazmā

Šķidrā biopsija pēdējās desmitgades laikā ir guvusi arvien lielāku uzmanību. Tā ir daudzsolos rīks, kas pielietojams agrīnā diagnostikā un dažādu veselības

stāvokļu monitorēšanā. Būtiskākās priekšrocības ir mazs nepieciešamā ievades materiāla apjoms un plašs iespējamo pielietojumu klāsts (Adhit et al. 2023; Caputo et al. 2023). Šķidrās biopsijas metodes, kas nosaka dažādus cilvēka izcelsmes šūnu brīvās cirkulējošās DNS (ccf-DNS) mērķus, jau tiek pielietotas klīniskās diagnostikas kontekstos, piemēram, prenatalajā aprūpē, onkoloģijā un geriatrijas raksturīgo saslimšanu izpētē (Zimmer et al. 2022). Turklāt tā var tikt pielietota infekciozo aģentu DNS noteikšanā saimniekorganismā (Fernández-Carballo et al. 2019; Szilágyi et al. 2020).

Tiek uzskatīts, ka veselīgiem indivīdiem ccf-nDNS asins plazmā galvenokārt rodas no limfoīdo un mieloīdo šūnu apoptozes, savukārt, ccf-mtDNS izcelsme galvenokārt skaidrojama ar cirkulējošiem šūnu brīviem mitohondrijiem (Roch et al. 2021; Snyder et al. 2016). Kopumā ccf-nDNS daudzums ir stabilāks nekā ccf-mtDNS, taču tās līmeņi var svārstīties atkarībā no indivīda dzimuma un vecuma (Meddeb et al. 2019). No otras puses, ccf-mtDNS koncentrācija plazmā var strauji pieaugt, kā atbildes reakcija uz psiholoģisko vai fizioloģisko stresu (Trumpff et al. 2019). Tā kā ccf-mtDNS tiek sekretēta gan citosolā, gan ārpusšūnu telpā un atpazīta kā DAMP, tā varētu kalpot arī kā funkcionāla saikne starp mitohondriju bojājumiem un sistēmisko iekaisumu (Cossarizza et al. 2011; West et al. 2015).

Ccf-DNS koncentrāciju variācijas ir plaši pētītas dažādās pacientu grupās, tajā skaitā, indivīdiem ar infekcijas slimībām, fiziskām traumām, kritiski smagu stāvokli vai sirds un asinsvadu saslimšanām, norādot tās potenciālu diagnostikā dažādos medicīniskajos scenārijos (Jackson Chornenki et al. 2019; Peng et al. 2024; Trulson et al. 2023; Vajpeyee et al. 2020; Zhang et al. 2024). Turklāt ccf-DNS var kalpot kā daudzpusīgs biomarķieris klīnisko lēmumu pieņemšanai, terapijas gaitas uzraudzībai, mikroorganismu rezistences identificēšanai un minimālās reziduālās slimības noteikšanai, padarot to īpaši pievilcīgu hronisku infekciju uzraudzībā (Nyaruaba et al. 2019; Rahat et al. 2020).

TB konteksta pētījumos ir pierādīts, ka cirkulējošās bakteriālās izcelsmes DNS noteikšana plazmā pacientiem ar plaušu TB var kalpot kā daudzpusīgs biomarķieris diagnostikas nolūkiem, savukārt, ccf-mtDNS CN nesniedz identifiķēt kā potenciāls biomarķieris latentās un aktīvās TB infekcijas diferenciacijai (Nyaruaba et al. 2019; Pan et al. 2022). Līdzīgi rezultāti pierādīti arī COVID-19 pacientiem, kur ccf-mtDNS daudzums tika izmantots, lai atšķirtu asimptomātiskus un simptomātiskus indivīdus no kontroles grupas (Shoraka et al. 2023). Šie rezultāti uzsver šķidro biopsiju potenciālu kā daudzsoļu rīku rutīnas diagnostikā, īpaši TB kontekstā, kur tā varētu uzlabot agrīnu diagnosticēšanu un realizēt precīzijas medicīnas pieejas.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Pētījuma dizains un paraugu ievākšana

Promocijas darba mērķis bija veikt no asinīm iegūtu biomarķieru – mtDNS un nDNS balstītu – izpēti TB pacientiem, vērsot uzmanību uz to iespējamo lomu slimības patoģenēzē, ārstēšanas efektivitātē un NZR attīstībā, kā arī izpētīt sarežģītās mijiedarbības starp imūnsenescenci, mitohondriju funkcijām un dzīvesveida faktoriem pacientiem ar DS- vai MDR-TB. Šī pētījuma sākumā viens no perspektīvajiem nākotnes mērķiem bija potenciālu kandidātmarķieru identificēšana, kurus varētu izmantot klīniskajā praksē kā rīkus slimības progresijas uzraudzībai vai TB smaguma novērtēšanai. Šī iemesla dēļ izmantotās molekulārās metodes tika apzināti saglabātas vienkāršas, lai nepieciešamības gadījumā veicinātu to integrāciju klīniskajā praksē (1. tabula).

Pirmās divas publikācijas no 2021. un 2023. gada apraksta pētījumus, kas ir realizēti uz retrospektīviem klīniskajiem gadījumiem, to uzmanības centrā ir MDR-TB pacienti. Pacientu kohorta tika ievākta laika posmā no 2014. līdz 2017. gadam. DNS paraugi tika iegūti no Valsts iedzīvotāju genoma datubāzes pēc Rovītes un kolēģu aprakstītā protokola (Rovite et al. 2018).

Trešā publikācija ir šķērsriezuma pētījums, kurā analizētas ccf-DNS daudzuma izmaiņas asinīs pacientiem ar DS-TB. Šīs publikācijas tapšanā tika izmantota cita pacientu kohorta vairāku iemeslu dēļ: (1) DS-TB pacienti saņem mazāk medikamentu, tādēļ ir vieglāk izsekojamas zāļu metabolītu mijiedarbības; (2) bija nepieciešami svaigi plazmas paraugi – būtiski precīzai metabolītu analīzei; un (3) pacienti bija pirmreizēji diagnosticēti, bez smagām blakusslimībām vai komplikētās anamnēzes, samazinot iespējamās mijiedarbojošos faktorus. Paraugi tika ievākti Tuberkulozes un plaušu slimību centrā, bet DNS izdališana no šiem paraugiem veikta Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.

**1. tabula. Promocijas darbā iekļauto publikāciju kopsavilkums: pētījumu grupas un izmantotās metodes.**

	<b>I publikācija</b> (Freimane et al. 2021)	<b>II publikācija</b> (Freimane et al. 2023)	<b>III publikācija</b> (Freimane et al. 2025)
<b>Pētījuma tips</b>	Retrospektīvs	Retrospektīvs	Šķērsriezuma pētījums
<b>Paraugu ieguves avots</b>	Valsts iedzīvotāju genoma datubāze (Rovite et al. 2018)	Valsts iedzīvotāju genoma datubāze (Rovite et al. 2018)	Tuberkulozes un plaušu slimību centrā uzņemtie pacienti (Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca)
Pētījuma grupa	$n_{\text{MDR-TB}} = 51$ $n_{\text{kontrolē}} = 57$	$n = 47$	$n = 25$
Veselības stāvoklis	MDR-TB pacienti un pēc vecuma un dzimuma salāgotas veselās kontroles	MDR-TB pacienti	DS-TB pacienti
Izmantotais bioloģiskais materiāls	DNS izdalīta no pilnām asinīm	DNS izdalīta no pilnām asinīm	DNS izdalīta no asins plazmas
Galvenās molekulārās metodes	Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija (PĶR)	Pilna mtDNS genoma sekvencēšana izmantojot jaunās paaudzes sekvencēšanu (NGS)	1) Pilienu digitālā PĶR (ddPĶR) 2) LC-MS/MS
<b>Mērķis</b>	Noteikt vai MDR-TB infekcija ir saistīta ar izmaiņām novecošanās biomarķieros perifērajās asinīs	Apskatīt NZR iespējamo saistību ar dažādiem pacienta, slimības specifiskiem vai terapijas saistītiem faktoriem	Noteikt ccf-mtDNS un -nDNS svārstības DS-TB pacientu plazmā pēc pret-TB medikamentu uzņemšanas

Visu trīs publikāciju pētījumu pacientu iekļaušanas kritēriji ietvēra: vecumu virs 18 gadiem; parakstītu informēto piekrišanu; atbilstošu MDR-TB vai DS-TB diagnozi; pieejamu klīnisko informāciju. Izslēgšanas kritēriji tika piemēroti tikai trešajā publikācijā: grūtniecība un koinfekcija ar citu mikrobiālu vai virālu infekciju (piemēram, C vai B hepatīta vīrusu, HIV).

Informācija par pacientu dzīvesveida paradumiem, antropometriskajiem rādītājiem un citiem iespējamiem ietekmējošiem faktoriem tika iegūta sadarbībā ar Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Tuberkulozes un plaušu slimību centru un Latvijas Valsts iedzīvotāju genoma datubāzi. Pētījums tika veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju un apstiprināts Latvijas Centrālās medicīnas ētikas komitejā (Nr. 01-29.1/1 un Nr. 01-29.1.2/1736), Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Ētikas komitejā (Nr. 24-A/15) un Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Zinātnes nodaļā (Nr. ZD/08-06/01-21/187). No visiem pētījuma dalībniekiem tika iegūta informētā piekrišana.

## 2.2. Molekulārās metodes

### 2.2.1. I publikācija – reālā laika PQR

Relatīvā TL un mtDNS CN noteikšanai tika izmantota reālā laika PQR atsevišķās reakcijās. mtDNS CN tika noteikts, izmantojot multipleksu PQR ar *Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Scientific, ASV) reaģentiem, kur mitohondriālais mērķis bija mazā loka (zināms kā *minArc*) reģions. Normalizācijai tika izmantots *GAPDH* gēns (OMIM: 138400), kā aprakstīts iepriekš (Phillips, Sprouse, and Roby 2014; Zole and Ranka 2019).

Savukārt, TL relatīvai kvantifikācijai tika izmantoti *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Scientific, ASV) reaģenti, un normalizācijai tika izmantots vienas kopijas gēns *HBB* ( $\beta$ -globīns) (OMIM: 141900), kā aprakstīts iepriekš (Kim et al. 2013). Reālā laika PQR reakcijas apstākļi bija sekojoši: denaturācija 95 °C 10 min, un 40 cikli ar 95 °C 10 s un 58 °C 1 min. Katram paraugam mērījumi tika veikti trīs atkārtojumos, un relatīvās kvantifikācijas aprēķini tika veikti, izmantojot 2- $\Delta\Delta$ CT metodi ar Pfaffl modifikāciju (Livak and Schmittgen 2001; Pfaffl 2004).

### 2.2.2. II publikācija – pilna mtDNS genoma sekvencēšana

Pilna mtDNS genoma sekvencēšana tika veikta, izmantojot *IonTorrent* tehnoloģiju un *Personal Genome Machine* (Thermo Fisher Scientific, ASV). Vispirms viss mitohondriju genoms tika amplificēts divās atsevišķās PQR reakcijās, iegūstot A un B fragmentus, katru vairāk nekā 8 kb garumā, kā aprakstīts iepriekš (Fendt et al. 2009). Viena parauga A un B amplifikācijas fragmenti tika apvienoti un sašķelti ar sonikācijas metodi līdz 200-250 bp garumam. DNS fragmentu

bibliotēku sagatavošanā izmantots *Ion Plus Fragment Library Kit* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornija, ASV) un *Ion Xpress™ Barcode Adapters Kits* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Kalifornija, ASV).

Iegūtie sekvenčēšanas dati augšupielādēti *Galaxy* tīmekļa platformā, to analīzei izmantojot publisko serveri *usegalaxy.org* (Afgan et al. 2018). BAM datu faili konvertēti FASTQ formātā, izmantojot rīku *Convert, Merge, Randomize* (Barnett et al. 2011). FASTQ sekvences filtrētas pēc kvalitātes (slietkšņa vērtība: 20; bāžu procentuālais daudzums sekvenčē, kam jāpasniedz vai jāpārsniedz noteiktā kvalitātes vērtība: 90). Adapteru sekvenču noņemšanai izmantots *Trim Galore!* rīks (Krueger et al. 2023). *Bowtie 2* izmantots, lai kartētu nolasījumus pret references sekвени, šajā gadījumā izmantota pārskatītā Kembrīdžas references sekvenču (angļu val. *revised Cambridge Reference Sequence, rCRS*) NC\_012920.1 (*Homo sapiens mitochondrion complete genome*) (Langmead and Salzberg 2012). Kartētie nolasījumi analizēti ar *FreeBayes* rīku haploīdiem genomiem, izmantojot populācijas modeli, kā aprakstīts iepriekš (Nekrutenko and Ostrovsky 2021).

Viena nukleotīda varianti tika definēti kā pozīcijas, kas atšķirīgas no references sekvenču; *indel* variācijas netika analizētas. Lai izslēgtu iespējamās sekvenčēšanas kļūdas, katrs paraugs tika manuāli pārskatīts, izmantojot *Integrative Genomics Viewer* (IGV) (Robinson et al. 2011). Eksportētie VCF faili tika augšupielādēti *HaploGrep 2.0* klasifikatorā, lai noteiktu detalizētu mtDNS haplogrupu piederību (Weissensteiner et al. 2016). Variantu interpretācija veikta, izmantojot *HmtVar* un *MITOMAP* datubāzes (Preste et al. 2019; Ruiz-Pesini et al. 2006).

### 2.2.3. III publikācija – DNS izdalīšana un ddPKR

Asins paraugu ievākšanu nodrošināja kvalificēts medicīnas personāls, izmantojot EDTA stobrus (*BD*, Plimuta, Apvienotā Karaliste). Paraugi ievākti trīs laika punktos: no rīta tukšā dūšā pirms zāļu lietošanas (turpmāk tekstā dēvēts par 0 h laika punktu), kā arī 2 h un 6 h pēc zāļu lietošanas. Asins paraugi nekavējoties tika centrifugēti ar ātrumu 4000 apgr./min (3488×g) 15 minūtes 4 °C temperatūrā, plazma fasēta alikvotos un sasaldēta -70 °C temperatūrā līdz turpmākai apstrādei.

Plazmas ccf-DNS tika iegūta no 200 µL svaigi atkausēta materiāla, izmantojot *QIAamp DNA Blood Mini Kit* reaģentus (*QIAGEN*, Hildene, Vācija) saskaņā ar ražotāja norādījumiem. DNS tika eluēta 100 µL eluācijas bufera un uzglabāta -20 °C temperatūrā līdz turpmākai analīzei.

Absolūtai plazmas paraugu ccf-mtDNS un ccf-nDNS kvantifikācijai tika izmantota ddPKR metode, kur attiecīgi amplifikācijas mērķi bija *MT-ND1* (OMIM: 516000) un *B2m* (OMIM: 109700) gēni. Reakcijas maisījums gatavots saskaņā ar ražotāja rekomendācijām ar gala tilpumu 20 µL, kas ietver 10 µL 2×ddPKR maisījumu zondēm (angļu val. *supermix for probes*) (*Bio-Rad Laboratories*, Dubaija, AAE), 1 µL ar katru praimeru (gala koncentrācija maisījumā: 900 nM),

1 µL zondes (gala koncentrācija maisījumā: 250 nM), 2 µL plazmas DNS parauga un nukleāžu brīvu ūdeni. Praimeri un zondes tika iegādāti no *Metabion* (Vācija) un izvēlēti balstoties uz literatūru (Ye et al. 2017; Belmonte et al. 2016). Mitohondriālā gēna *MT-ND1* amplifikācijai plazmas DNS tika atšķaidīta ar nukleāžu brīvu ūdeni attiecībā 1:10.

Reakcijas pilieni tika ģenerēti saskaņā ar ražotāja rekomendācijām, izmantojot pilienu ģeneratoru (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, ASV). Pilieni pārnesti uz ddPQR reakcijas plati. Reakcija veikta sekojošos apstākļos: inkubācija 95 °C 10 min, 40 cikli ar 94 °C 30 s un 60 °C 60 s, beidzot ar 98 °C 10 min. Rezultāti nolasīti, izmantojot QX200 pilienu lasītāju (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, ASV) un analizēti ar QuantSoft™ Analysis Pro (1.0.596). Absolūtais ccf-mtDNS un ccf-nDNS kopiju skaits uz 1 µL svaigas plazmas tika aprēķināts, ņemot vērā atšķaidījumu.

#### **2.2.4. Pret-TB zāļu farmakokinētisko parametru noteikšana ar LC-MS/MS**

DS-TB pacientu plazmas paraugos medikamentu – izoniazīda, rifampicīna, pirazinamīda un etambutola – koncentrāciju noteikšanai tika izmantota validēta LC-MS/MS metode, kas aprakstīta iepriekš (Kivrane et al. 2021). Laukums zem koncentrācijas-laika liknes (AUC) no 0 līdz 6 stundām (AUC<sub>0-6h</sub>) tika aprēķināts, izmantojot lineāro trapezoidālo metodi, balstoties uz datiem, kas iegūti trīs laika punktos: pirms zāļu saņemšanas (0 h), kā arī 2 un 6 stundas pēc to uzņemšanas. Šie laika punkti parasti ir visinformatīvākie terapeitisko zāļu līmeņu monitorēšanai (Peloquin 2002).

### **2.3. Bioinformātiskās un statistiskās analīzes**

Katrā pētījuma daļā tika analizēti dažādi pacientu specifiskie, dzīvesveida un veselības stāvokļa saistītie faktori. Analizēto faktoru līdzības un atšķirības katrā publikācijā ir apkopotas 2. tabulā, lai atvieglotu to uztveršanu.

Mīnētie faktori tika izvēlēti, lai normalizētu datus un identificētu iespējamās aplūkoto biomarkieru ietekmējošos mainīgos lielumus, kurus vajadzētu ņemt vērā turpmākajos pētījumos vai datu interpretācijas laikā, kā arī lai izslēgtu kovariātu ietekmi.

2. tabula. Promocijas darbā analizētie faktori un izmantotie statistiskie testi.

Analizētie faktori			
Apskatīti visās publikācijās	Attiecas uz I publikāciju	Attiecas uz II publikāciju	Attiecas uz III publikāciju
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Dzimums</li> <li>▶ Vecums</li> <li>▶ Smēķēšanas paradumi</li> <li>▶ Ķermeņa masas indekss (ĶMI)</li> <li>▶ Alkohola patēriņš</li> <li>▶ Blakus saslimšanas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ MDR-TB statuss</li> <li>▶ Infekcijas gadījums</li> <li>▶ Infekcijas lokācija</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Injicējamie medikamenti – amikacīns vai kapreomicīns</li> <li>▶ Injicējamo medikamentu saņemto devu skaits</li> <li>▶ Antiretrovirālā terapija</li> <li>▶ Infekcijas gadījums</li> <li>▶ mtDNS variācijas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ C-reaktīvais proteīns (CRP)</li> <li>▶ Papildus medikamentu lietošana</li> <li>▶ Hipertensijas medikamenti</li> <li>▶ Plaušu kavitācija</li> <li>▶ Zāļu izraisīti aknu bojājumi</li> <li>▶ Pret-TB medikamentu AUC<sub>0-6h</sub></li> </ul>
Izmantotie statistiskie testi			
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ ANOVA</li> <li>▶ ANCOVA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ t-tests</li> <li>▶ Pīrsona korelācija</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Hi-kvadrāta tests</li> <li>▶ Fišera tests</li> <li>▶ Loģistiskā regresija</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ t-tests</li> <li>▶ Lineārā regresija</li> <li>▶ Vilkoksonu rangu tests</li> <li>▶ Manna-Vitnija tests</li> <li>▶ Spīrmena korelācija</li> <li>▶ Šapiro-Vilka normalitātes tests</li> </ul>

Statistiskie testi tika izvēlēti, pamatojoties uz datu tipu, to atbilstību normālsadalījumam un konkrēto pētniecisko jautājumu. Izmantotie statistiskie testi arī ir norādīti 2. tabulā. Visiem testiem piemērots nozīmības līmenis  $\alpha = 0,05$ . Statistiskās analīzes tika veiktas, izmantojot *GraphPad Prism* versiju 5.01 (Windows operētājsistēmai), *R Statistical Software* (v4.1.2) un *XLSTAT* (Adinsoft 2021; GraphPad Software 2007; R Core Team 2021).

## 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

### 3.1. MDR-TB pacientiem var novērot imunosenesces pazīmes

Aplūkotajā pirmās publikācijas kohortā MDR-TB pacientiem tika novērotas būtiski saīsinātas telomēras ( $P < 0,0001$ ) un paaugstināts mtDNS CN ( $P = 0,0068$ ) salīdzinājumā ar veselajām kontrolēm, turklāt šī atšķirība nebija saistīta ar bioloģisko vecumu. ANCOVA analīze liecina, ka visnozīmīgākais ietekmējošais faktors gan TL saīsināšanās, gan mtDNS CN pieaugumā bija MDR-TB diagnoze (attiecīgi  $P = 0,002$  un  $P = 0,019$ ), ņemot vērā arī citus pacientu specifiskos un dzīvesveida faktoros. Papildus, mtDNS CN izmaiņas ietekmēja arī pacientu dzimums ( $P < 0,001$ ), turklāt sievietēm netika novērotas būtiskas izmaiņas salīdzinot ar kontroles grupu. Jāņem vērā, ka šajā kohortā sievietes bija nepietiekami pārstāvētas. Arī citi faktori kā KMI, smēķēšana un TB infekcijas lokācija (ārpusplaušu) var ietekmēt mtDNS CN un TL dinamiku, tomēr *Mtb* infekcija pārliecinoši bija visietekmīgākais faktors no aplūkotajiem.

Tas liek domāt, vai *Mtb* infekcija ir cēlonis novērotajai imunosenescei, vai arī indivīdiem ar imunosenesces pazīmēm ir paaugstināts infekcijas atbilstības risks. Abi scenāriji ir vienlīdz iespējami. Literatūrā telomēru saīsināšanās ir asociēta ar pastiprinātiem iekaisuma procesiem un var kalpot kā biomarķieris aknu bojājumiem, ko izraisa pārmērīga ROS produkcija pret-TB zāļu iedarbībā (Ruiz et al. 2021; Udomsinprasert et al. 2020). Imūnšūnu saīsinātas telomēras ir saistītas ar limfopēniju un augstāku pacientu mirstību infekciozā vidē (Ruiz et al. 2021). Turklāt, telomēru saīsināšanās veicina progresējošu atrofiju un funkciju izpildes pasliktināšanos proliferatīvos orgānos (zarnu trakta vai asinsrades), vienlaikus negatīvi ietekmējot funkcijas arī citos orgānos kā, piemēram, aknās un sirdī (Sahin et al. 2011). Telomēru saīsināšanās un disfunkcija ir saistīta arī ar traucētu mitohondriju bioģenēzi, funkciju izpildi, samazinātu glikoneoģenēzi un pastiprinātu ROS produkciju, kas, savukārt, tālāk veicina telomēru saīsināšanos (Sahin et al. 2011).

Sekojoši, atbildē uz *Mtb* infekciju palielinās mitohondriālo ROS produkcija, lai pastiprinātu iekaisuma atbildes reakciju, kas vienlaicīgi stimulē telomēru bojājumus. Savukārt telomēru saīsināšanās paātrina mitohondriju disfunkciju un mtDNS izdalīšanu citosolā un cirkulācijā, sekmējot *Mtb* izdzīvošanu. Tādējādi veidojas pašuzturošs cikls, kurā infekcijas progresēšana un imūnsenesce savstarpēji pastiprina viena otru (Ellzey, Patrick, and Watson 2023; Qian et al. 2019).

## 3.2. Amikacīna un kapreomicīna izraisīto blakusparādību izvērtējums pacientiem ar MDR-TB

Otrajā pētījumā 47 pacienti ar MDR-TB saņēma injicējamus pret-TB medikamentus: amikacīnu un/vai kapreomicīnu. Vairāk nekā pusei no kohortas pacientu attīstījās aminoglikozīdu saistītās NZR: ototoksicitāte un/vai nefrotoksicitāte ( $n = 26/47$ , 55,3%). Ototoksicitāti biežāk varēja novērot pacientiem, kuri terapijā saņēma amikacīna injekcijas (loģistiskās regresijas analīze,  $P = 0,049$ ). Minētie blakusefekti literatūrā galvenokārt ir saistīti ar mitohondriju translācijas traucējumiem, ar sekojošu oksidatīvā stresa izraisītu mitohondriālo disfunkciju un šūnu nāvi (Shulman et al. 2014). Pētījumā iegūtie rezultāti atbalsta iepriekš izvirzīto teoriju, ka novērotās zāļu reakcijas primāri rodas aminoglikozīdu bioķīmisko īpašību dēļ kombinācijā ar citiem predisponējošiem faktoriem, piemēram, mitohondriju funkcionālo stāvokli, ģenētisko predispozīciju un pastiprinātu aminoglikozīdu uzkrāšanos šūnās, kas ir īpaši jutīgas pret to ietekmi, t.sk., iekšējās auss sensorās šūnas un nieru proksimālo kanāliņu epitēlija šūnas (McDermott et al. 2022; Rivetti et al. 2023; Vuda and Kamath 2016). Novērotie ototoksicitātes gadījumi nekorelēja ar saņemtajām medikamentu devām vai ārstēšanas ilgumu, uzsverot pacienta individuālās variabilitātes un ģenētiskā fona iespējamo ietekmi.

Savukārt, nefrotoksicitāte biežāk tika konstatēta pacientiem ar esošiem nieru funkcijas traucējumiem pirms terapijas uzsākšanas un gados vecākiem pacientiem (Fišera tests:  $P = 0,017$ ). Ņemot vērā, ka nieru funkcija ar vecumu pakāpeniski samazinās, šķiet loģiski, ka nefrotoksicitāte biežāk varētu tikt novērota gados vecākiem pacientiem (Noronha et al. 2022); tomēr šo saistību neapstiprināja multifaktoriālā loģistiskā regresijas analīze.

## 3.3. Mitohondriālo ģenētisko faktoru loma amikacīna un kapreomicīna saistītajās NZR

Pilna mitohondriālā genoma analīze neatklāja specifiskus, ar NZR attīstību saistītus variantus, kā arī netika novērotas būtiskas atšķirības NZR sastopamībā, analizējot specifiskus variantus vai mitohondriālās haplogrupas.

Iegūtie rezultāti liecina, ka mitohondriju ģenētiskā variabilitāte ir pārāk plaša, lai izdarītu viennozīmīgus secinājumus par aplūkoto variantu saistību ar aminoglikozīdu izraisītajām NZR. Lai gan 34% ( $n = 16$ ) no MDR-TB pacientiem, kas saņēma aminoglikozīdu injekcijas, attīstījās ototoksicitāte, neviens no literatūrā zināmajiem riska variantiem netika konstatēts. Taču tika identificēti vairāki jauni varianti ar potenciālu ietekmi NZR attīstībā.

Identificēto variantu zemās sastopamības un kohortas ģenētiskās heterogenitātes dēļ ir grūti noteikt, vai tie tiešām ir saistīti ar novēroto fenotipu. Daudzsološs šķita m.961T>A variants, kas tika konstatēts pacientam ar

ototoksicitāti. Minētais variants ir lokalizēts *MT-RNR1* gēnā, kas ir labi zināms ototoksicitātei raksturīgo variantu „karstais punkts”. Populāciju datubāzē *gnomAD v4.1.0* tas ir ziņots tikai četras reizes ar aptuveno alēles frekvenci 0,007%. Populācijas pētījumos šis variantu ziņots divreiz – vienu reizi mūsu zinātniskās grupas mtDNS variantu analizē etnisko latviešu populācijā un vienu reizi indivīdam no Krievijas (Dzhemilova et al. 2009; Igumnova et al. 2018).

Lai arī netika konstatētas iepriekš literatūrā ziņotās mtDNS variācijas, kas saistītas ar aminoglikozīdu inducētu ototoksicitāti, gandrīz visiem indivīdiem tika atrasti papildu mtDNS varianti, kas nebija saistīti ar to mitohondriālo haplogrupu. Iespējams, ka faktiskā mtDNS haplogrupa var nomākt potenciāli patogēnu vai fenotipu modificējošu variantu, mainot tā ekspresivitāti (La Morgia et al. 2020; Vila-Sanjurjo, Smith, and Elson 2021). No otras puses, fenotipu var regulēt arī pati šūna, „apklusinot” modificējošo variantu (Münch and Harper 2016; Richter-Dennerlein et al. 2016). Kopumā iegūtie rezultāti uzsver blakusparādību komplekso dabu un izaicinājumus to prognozēšanā.

### 3.4. Svārstības ccf-mtDNS un -nDNS CN asins plazmā pēc TB medikamentu saņemšanas pacientiem ar DS-TB

Pēc pret-TB zāļu saņemšanas vidējais ccf-mtDNS CN pacientu asins plazmā uzrādīja straujas svārstības, kur otrajā laika punktā (2 h) tas pieauga vidēji 1,5 reizes, bet trešajā (6 h pēc zāļu saņemšanas) atkal samazinājās par 1,3 reizēm. Lai novērtētu relatīvās izmaiņas pirmajās divās stundās, tika aprēķināta ccf-mtDNS<sub>Δ2 h/0 h</sub> attiecība. Tās vērtība variēja starp pacientiem, un to ietekmēja vecums, etambutola AUC<sub>0-6h</sub> un KMI. Šī ccf-mtDNS spēja strauji reaģēt uz fizioloģiskiem stresoriem norāda uz tās potenciālu TB ārstēšanas procesa monitorēšanā un dažādu ietekmējošo mainīgo novērtēšanā. Kā piemēru var minēt, ka ccf-mtDNS līmenis var tikt izmantots, lai atšķirtu latentu TB infekciju no aktīvas slimības, kas atbalsta, ka šis biomarķieris atspoguļo slimības dinamiku (Pan et al. 2022). Iegūtie rezultāti liecina, ka ccf-mtDNS sākotnējās vērtības varētu norādīt uz infekcijas smaguma pakāpi vai iedzimtās imūnās atbildes traucējumiem, taču šī pieņēmuma apstiprināšanai nepieciešami papildus pētījumi.

Savukārt, ccf-nDNS līmenis plazmā sešu stundu laikā pēc zāļu saņemšanas saglabājās relatīvi stabils, kas drīzāk pamato tā pielietojumu kā iekšējo kontroli ccf-mtDNS mērījumos, īpaši gadījumos, kad novērotas to ekstrēmas vērtības. Papildus, tika novērots, ka pacientiem ar plaušu kavitācijām bija augstāki ccf-nDNS rādītāji, lai gan šī atšķirība nebija statistiski nozīmīga ( $p = 0,055$ ). Iespējams, ierobežotais pētījuma dalībnieku skaits mazinājis statistisko jaudu šīs asociācijas apstiprināšanai, taču tas arī neizslēdz potenciālo saistību.

Kopumā, var secināt, ka DNS-balstīti biomarķieri ir potenciāli izmantojami TB slimības novērošanā, kur pilno asiņu mtDNS un TL labāk raksturo

iespējamo predispozīciju slimības attīstībai, bet plazmas ccf-DNS ir piemērotāks strauju terapijas reakciju monitorēšanai.

### 3.5. Citi aplūkoto DNS biomarkķieru ietekmējošie faktori

Visās promocijas darbā iekļautajās publikācijās papildus ir analizēti dažādi slimības specifiskie un pacientu faktori, lai novērtētu to iespējamo savstarpējo mijiedarbību un pielietojumu TB uzraudzībā. Kā pirmo var minēt **pacienta dzimumu**, kas izrādījās statistiski būtisks faktors tikai mtDNS CN variācijās asinīs MDR-TB pacientiem, bet neietekmēja TL vērtības. Kopumā sievietes neuzrādīja nozīmīgu atšķirību analizētajos novecošanas biomarkķieros, salīdzinot ar vecumam un dzimumam atbilstošām veselām kontrolēm. Pastāv vairāki iespējamie skaidrojumi novērotajām dzimuma atšķirībām. Pirmkārt, pētījuma kohortā sieviešu grupa bija nepietiekami pārstāvēta (n = 12; 23,5%). Otrkārt, pastāv dzimuma atšķirības leukocītu skaitā, kā arī estrogēna līmenī, kas ir būtiski, jo estrogēns regulē mitohondriju bioenerģētiskos procesus (Klinge 2020; Shim et al. 2020).

Sekojoši tika aplūkoti arī citi ar imunosenesces marķieriem saistīti raksturlielumi kā, piemēram, **vecums**. Pirmajā rakstā DS-TB pacientu kohortā vecums neuzrādīja ietekmi uz aplūkotajiem marķieriem, lai gan šī asociācija ir labi zināma populācijas pētījumos (Zole and Ranka 2018). Tas tika skaidrots ar pacientu grupas vecuma diapazonu un vidējo vecumu, kā arī pašas infekcijas ietekmi. Savukārt, pēdējā rakstā multivariātu analizē vecums izcēlās kā statistiski nozīmīgs faktors ccf-mtDNS svārstību ietekmē pēc zāļu lietošanas, lai gan univariātu analizē statistiski nozīmīga ietekme netika konstatēta. Tas liecina, ka pacienta bioloģiskais vecums varētu darboties kā modificējošs faktors. Vecums kā tāds ir saistīts ar hroniskām slimībām, sistēmisku „nolietojumu”, kumulatīvo allostatisko slodzi un arī paaugstinātu ccf-DNS CN (Memiah et al. 2021; Tessier et al. 2023; Wang 2022). Tas ir būtiski arī TB kontekstā, jo organisma novecošana ietekmē arī zāļu farmakokinētiku, t.sk., zāļu vielu absorbciju kuņģa-zarnu traktā, I fāzes metabolismu aknās un ekskrēciju nieru funkcijas pasliktināšanās dēļ (Reis da Silva 2024). Tomēr, ņemot vērā, ka šī asociācija tika novērota tikai ccf-mtDNS CN gadījumā, bet ne ccf-nDNS, tiek pieņemts, ka tā drīzāk ir saistīta ar iekaisuma procesiem un atbildes reakciju uz terapiju, kas gados vecākiem pacientiem var būt sarežģītāka (Negin, Abimbola, and Marais 2015).

Kā nozīmīgs faktors izcēlās arī ķermeņa kompozīcija, kura tika raksturota ar **ķMI**. Šis faktors izrādījās būtisks divās no promocijas darbā iekļautajām publikācijām. Pirmkārt, MDR-TB pacientiem normāls ķMI bija saistīts ar garākām telomērām asins paraugos. Iegūtie rezultāti papildina literatūrā ziņotos, ka virssvars korelē ar īsākām telomērām kumulatīvā oksidatīvā stresa un hroniska iekaisuma dēļ (Warmelink et al. 2011). Savukārt, būtiska ietekme uz mtDNS CN netika konstatēta.

Otrkārt, DS-TB pacientiem ar augstāku  $\text{KMI}$  biežāk tika novērotas negatīvas ccf-mtDNS izmaiņas divas stundas pēc zāļu saņemšanas ( $\Delta_{2\text{ h}/0\text{ h}}$ ), bet pacientiem ar nepietiekamu svaru tika reģistrēts lielāks relatīvais ccf-mtDNS CN pieaugums. Šie dati norāda, ka  $\text{KMI}$  var ietekmēt analizētos biomarķierus, lai gan, iespējams, atšķirīgos veidos, jo tie atspoguļo dažādus bioloģiskos parametrus un atbildes reakcijas, uzsverot sarežģīto ķermeņa kompozīcijas ietekmi uz slimības patoģenēzi un ārstēšanu. Papildus, ķermeņa kompozīcijas izmaiņas, kas rodas novecošanas un hronisku slimību, tai skaitā, TB, rezultātā, bieži izpaužas kā muskuļu masas zudums un sekojoša palielināta taukaudu proporcija. Šīs izmaiņas var ietekmēt terapijas efektivitāti, jo muskuļu masa spēlē nozīmīgu lomu zāļu metabolismā, izplatīšanā organismā un izvadišanā (Chung 2014; Reis da Silva 2024). Turklāt ar TB asociētais svara zudums pats par sevi var būt riska faktors aknu bojājumu attīstībai (Warmelink et al. 2011). No otras puses, nepietiekams uzturs un samazināta ķermeņa masa ir labi zināmi TB riska faktori (Choi et al. 2021).

No pacienta neatkarīgiem faktoriem izcēlās **etambutola** lietojums, tas statistiski būtiski ietekmēja ccf-mtDNS dinamiku pēc zāļu uzņemšanas, visticamāk, tā ķīmisko īpašību dēļ, negatīvi ietekmējot mitohondriju funkciju, izjaucot elpošanas ķēdes darbību (Sarkar and Ganguly 2016). Minētā iejaukšanās var izraisīt pārmērīgu ROS produkciju un ATF sintēzes samazināšanos, kas, savukārt, stimulē ccf-mtDNS izdališanu (Reddam, McLarnan, and Kupscio 2022; Zhao et al. 2021). Citās šajā darbā iekļautajās publikācijās zāļu ietekme vai farmakokinētiskie parametri netika analizēti kā atsevišķi faktori, jo MDR-TB pacientiem lietoto zāļu shēmas ir ļoti atšķirīgas un ietver vairāk medikamentu, turklāt neliešais paraugu skaits nebija pietiekams statistiskās jaudas nodrošināšanai.

Paraugu atlasē kritēriju un salīdzinoši nelielu TB pacientu skaita dēļ ir augsta iespēja, ka atsevišķas potenciālās faktoru asociācijas ir palaistas garām. Dažas statistiskās saistības tika novērotas tikai izolētās univariātu analizēs. Piemēram, nesmēķētājiem telomēras bija nedaudz garākas nekā smēķētājiem un pacientiem, kas kādreiz ir smēķējuši, un plaušu TB slimniekiem telomēras bija garākas nekā pacientiem ar ārpusplaušu TB (tai skaitā to kombinētām formām), lai gan šīs atšķirības nebija statistiski nozīmīgas. MDR-TB pacientiem kopumā bija lielāks smēķētāju īpatsvars, augstāks alkohola patēriņš un zemāks  $\text{KMI}$  nekā vecumam un dzimumam atbilstošiem kontroles grupas indivīdiem. Lidzīgi novērojama asociācija starp CRP un ccf-nDNS bija nozīmīga tikai univariātu analizē. Tomēr CRP ir labi zināms iekaisuma marķieris arī TB gadījumā, kur tas var būt protektīvs pret bakteriālu infekciju (Sproston and Ashworth 2018).

Minētie novērojumi uzsvēr sistēmiskā iekaisuma, dzīvesveida faktoru un molekulāro marķieru sarežģīto savstarpējo mijiedarbību. Vairāki no aplūkotojumiem faktoriem, piemēram, smēķēšana, samazināts  $\text{KMI}$  un alkohola patēriņš iepriekš ir aprakstīti literatūrā kā būtiski TB attīstībai (Min et al. 2023; Narasimhan et al. 2013; Siddalingaiah et al. 2023). Iegūto rezultātu nesakritība

ar literatūrā ziņoto ir skaidrojama ar nelielo paraugkopu un analizēto faktoru daudzveidību. Interesanti, ka katra no šī darba pamatojošajām publikācijām atspoguļoja atšķirīgus biomarķieru ietekmējošos faktoros, uzsverot dažādos patofizioloģiskos mehānismus, kas nosaka mtDNS CN, TL un plazmas ccf-DNS variabilitāti, apliecinot šo marķieru daudzpusīgo raksturu un potenciālo pielietojumu dažādos kontekstos.

### 3.6. Pētījuma ierobežojumi

Visi iegūtie rezultāti tika interpretēti ļoti kritiski, ņemot vērā pētījuma ierobežojumus. Kā vienu no galvenajiem trūkumiem var minēt nelielo pacientu skaitu, kas kombinācijā ar izmantoto kvantitatīvo metožu augsto jutību varēja radīt grūti izskaidrojamu rezultātu variabilitāti. Iegūtos datus varēja ietekmēt arī ārēji faktori: primārā materiāla (asiņu vai plazmas) ieguve, apstrāde, uzglabāšana, transportēšana, paraugu kopējā kvalitāte, kā arī cilvēciskās kļūdas tālākā apstrādē.

Iegūtos rezultātus varēja ietekmēt trombocītu kontaminācija, kuras novēršana plazmas paraugos nav pilnībā iespējama, jo zināma aktivācija ir neizbēgama asiņu centrifugēšanas laikā (Söderström et al. 2016). Papildus, ccf-mtDNS līmeni var ietekmēt arī citi veselības stāvokļi, kas var vēl nebūt klīniski identificēti, piemēram, neirodeģeneratīvu slimību gadījumā tas ir samazināts un var kalpot kā prognostisks marķieris (Lowes et al. 2020). Tāpat mtDNS CN būtiski atšķiras starp dažādiem šūnu tipiem, un šis faktors šajā pētījumā netika ņemts vērā (Filograna et al. 2021). Pat ja tas tiktu izvērtēts, references vērtības aplūkotajiem marķieriem veselos indivīdos vai dažādos audos joprojām nav definētas. Šādu standartizētu atsauces vērtību iztrūkums pagaidām apgrūtina šo biomarķieru ieviešanu diagnostikā. Turklāt aplūkoto biomarķieru pielietojamība pediatrikajiem pacientiem joprojām ir neskaidra.

## SECINĀJUMI

1. Pacientiem ar MDR-TB novērojams imūnās sistēmas novecošanās fenotips, salīdzinot ar veselām kontrolēm.
2. MDR-TB pacientiem ototoksicitātes attīstība pēc amikacīna vai kapreomicīna lietošanas nav skaidrojama ar iepriekš literatūrā ziņotajām mitohondriālajām variācijām, liecinot par iespējamu starppopulāciju ģenētisko variabilitāti un citu, vēl neidentificētu, faktoru iesaisti.
3. MDR-TB pacientiem nefrotoksicitātes attīstība pēc amikacīna vai kapreomicīna lietošanas visticamāk ir saistīta ar iepriekšēju nieru darbības traucējumu klātbūtni, nevis ar ģenētisku predispozīciju vai citiem faktoriem.
4. Ccf-mtDNS, bet ne ccf-nDNS, uzrāda uzskatāmu atbildes reakciju uz TB terapiju pacientiem ar DS-TB, īpaši uz etambutola lietošanu. Šis kvantitatīvais mērījums var atspoguļot individuālās pacienta farmakokinētiskās īpatnības.
5. Pacienta dzīvesveida saistītie faktori ietekmē analizēto DNS biomarķieru vērtības un/vai to interpretāciju.

## AIZSTĀVAMĀS TĒZES

1. Pacientiem ar MDR-TB novēro imūnās sistēmas novecošanās fenotipu, kuru raksturo palielināts mtDNS CN un saīsināts TL. Tas var attīstīties gan aktīvas slimības, gan arī hroniskas antigēna prezentācijas dēļ, neizslēdzot abu ietekmju vienlaicīgu efektu.
2. Ar injicējamiem medikamentiem – amikacīnu un kapreomicīnu – saistītās NZR galvenokārt ietekmē lietotā zāļu viela un pacienta veselības stāvoklis pirms terapijas uzsākšanas.
3. Ccf-DNS potenciāli ir izmantojama kā biomarķieris TB terapijas uzraudzībai: ccf-mtDNS daudzums plazmā strauji reaģē uz zāļu uzsākšanu, savukārt, ccf-nDNS var kalpot kā iekšējā kontrole, apstiprinot novēroto svārstību ticamību.

## ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS

- I. **Freimane L**, Barkāne L, Igumnova V, Kivrāne A, Zole E, Ranka R. Telomere length and mitochondrial DNA copy number in multidrug-resistant tuberculosis. *Tuberculosis*. 2021;131:102144. doi: 10.1016/j.tube.2021.102144. PMID: 34781086.
- II. **Freimane L**, Barkāne L, Kivrāne A, Sadovska D, Ulanova V, Ranka R. Assessment of Amikacin- and Capreomycin-Related Adverse Drug Reactions in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis and Exploring the Role of Genetic Factors. *J Pers Med*. 2023;13(4):599. doi:10.3390/jpm13040599. PMID: 37108985.
- III. **Freimane L**, Kivrāne A, Ulanova V, Viksna A, Sevostjanovs E, Grinberga S, Cirule A, Krams A, Ranka R. Fluctuations in circulating cell-free mitochondrial and nuclear DNA copy numbers in blood plasma after anti-tuberculosis drug intake in patients with drug-susceptible tuberculosis. *Tuberculosis*. 2025;151:102611. doi: 10.1016/j.tube.2025.102611. PMID: 39862444.

## PĒTĪJUMA APROBĀCIJA

1. **Freimane L**, Zole E, Barkāne L, Ranka R. MDR-TB impacts patient's leukocyte telomere length and mitochondrial DNA copy number. 27.03.2020. *RSU International Student Conference 2020*, Riga, Latvia. Oral presentation.
2. **Freimane L**, Zole E, Barkāne L, Ranka R. Insights on senescence and therapy-related adverse effects in tuberculosis patients. 2020. *International Scientific Conference on Medicine 2020*, Riga, Latvia. Abstract book.
3. **Freimane L**, Igumnova V, Sadovska D, Kivrāne A, Ķimsis J, Barkāne L, Ranka R. Mitochondrial DNA variations and K haplogroup frequencies differs between TB patients and healthy controls. 25.03.2022. *80th International Scientific Conference of the University of Latvia 2022*, Riga, Latvia. Oral presentation.
4. **Freimane L**, Barkāne L, Ulanova V, Kivrāne A, Sadovska D, Ranka R. Multirezistentās tuberkulozes injicējamo medikamentu izraisīto blakusparādību ietekmējošie riska faktori. 10.02.2023. *Latvijas Universitātes 81. starptautiskā zinātniskā konference 2023*, Riga, Latvia. Oral presentation.
5. **Freimane L**, Viksna A, Ulanova V, Kivrāne A, Sadovska D, Ranka R. Droplet digital PCR – a fast clinical method for *M. tuberculosis* infection progression monitoring in patients with tuberculosis – pilot study phase I. 25.-28.06.2023. *The 43rd Annual Meeting of the European Society of Mycobacteriology*, Tirana, Albania. Abstract book.
6. **Freimane L**, Kivrāne A, Ulanova V, Sadovska D, Ranka R. Cirkulējošās šūnu brīvās mitohondriālās DNS fragmentu koncentrācija kā biomarķieris pacientiem ar tuberkulozi. 16.02.2024. *Apvienotā LaBS un LU konference*, Riga, Latvia. Oral presentation.
7. **Freimane L**, Ulanova V, Kivrāne A, Sadovska D, Viksna A, Ranka R. Within-day variation of cell-free mitochondrial and nuclear DNA in blood plasma of patients with tuberculosis: associations with drug exposure and patient-related factors. 29.06.-03.07.2024. *48th FEBS Congress*, Milan, Italy. Abstract book.

## PATEICĪBAS

Es gribētu izteikt visdziļāko pateicību mana promocijas darba vadītājam Dr. R. Rankai, kas deva man iespēju piedalīties ģenētikas laboratorijas projektos un neatlaidīgi rada iespējas finansējuma piesaistei mana darba turpināšanai un rezultātu prezentēšanai starptautiski. Paldies par atbalstu!

Liels paldies maniem fantastiskajiem LBMC laboratorijas biedriem, kas nežēloja savus padomus un dalījās ar idejām, reaģentiem, halātiņiem un pat kārumiem! Jūsu atbalsts tiešām palīdzēja iet cauri šiem izaicinošajiem gadiem, esmu ļoti pateicīga par to! Viktorija, Agnija, Darja – bez jums nekur!

Es gribētu izteikt pateicību arī LBMC un VIGDB par sadarbību, iekārtu nodrošināšanu, paraugu atlasīšanu un konsultācijām problēmu gadījumā. Šī sadarbība bija būtiska promocijas darba tapšanā.

Mana visdziļākā pateicība, protams, ir manai lieliskajai ģimenei! Pirmkārt, jau manam vīram – paldies, ka liki man pievērsties darbam arī tad, kad mani neganti kārdināja *Spider Solitaire*, ka klausījies manos eksperimentu neveiksmes stāstos (pat ja tie Tev nerādīja nekādu saprašanu – *sorry, not sorry*), un par Tavu nerimstošo atbalstu! Neizmērojams paldies arī maniem suniņiem, Čiekuram un Frejai, kas neļāva man zaudēt veselo saprātu, nodrošināja ikdienas pastaigas un cītīgi strādāja virsstundas kā terapijas suņi. Šis ir jums...

Un visbeidzot, paldies arī manai *PhD atbalsta grupai* no BKUS ģenētikas laboratorijas, it īpaši Egijai, kas dalījās ar *memēm*, pārlasīja manus promocijas darba melnrakstus un neļāva man padoties!

Visi, kas nejūtas piederīgi nevienai no minētajām kategorijām, atcerieties, ka es vienalga esmu dziļi pateicīga par katru atbalsta kriptiņu, iedrošinājumu un pozitīvu domu, kas ļāva man nokļūt tur, kur es esmu.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

- Adhit, Kanishk K., Anil Wanjari, Sharanya Menon, and Siddhaarth K. 2023. „Liquid Biopsy: An Evolving Paradigm for Non-Invasive Disease Diagnosis and Monitoring in Medicine.” *Cureus* 15(12):e50176. doi: 10.7759/cureus.50176.
- Adinsoft. 2021. „XLSTAT Statistical and Data Analysis Solution.”
- Afgan, Enis, Dannon Baker, Bér Bér', Bérénice Batut, Marius Van Den Beek, Dave Bouvier, Martiň Cech, John Chilton, Dave Clements, Nate Coraor, Björn Bj', Björn A. Grüninggr'grüning, Aysam Guerler, Jennifer Hillman-Jackson, Saskia Hiltmann, Vahid Jalili, Helena Rasche, Nicola Soranzo, Jeremy Goecks, James Taylor, Anton Nekrutenko, and Daniel Blankenberg. 2018. „The Galaxy Platform for Accessible, Reproducible and Collaborative Biomedical Analyses: 2018 Update.” *Nucleic Acids Research* 46:537–44. doi: 10.1093/nar/gky379.
- Anes, Elsa, David Pires, Manoj Mandal, and José Miguel Azevedo-Pereira. 2023. „ESAT-6 a Major Virulence Factor of Mycobacterium Tuberculosis.” *Biomolecules* 13(6). doi: 10.3390/biom13060968.
- Ankley, Laurisa, Sean Thomas, and Andrew J. Olive. 2020. „Fighting Persistence: How Chronic Infections with Mycobacterium Tuberculosis Evade T Cell-Mediated Clearance and New Strategies To Defeat Them.” *Infection and Immunity* 88(7). doi: 10.1128/IAI.00916-19.
- Barnett, Derek W., Erik K. Garrison, Aaron R. Quinlan, Michael P. Strömberg, and Gabor T. Marth. 2011. „BamTools: A C++ API and Toolkit for Analyzing and Managing BAM Files.” *Bioinformatics* 27(12):1691–92. doi: 10.1093/bioinformatics/btr174.
- Caputo, Vincenza, Fortunato Ciardiello, Carminia Maria Della Corte, Giulia Martini, Teresa Troiani, and Stefania Napolitano. 2023. „Diagnostic Value of Liquid Biopsy in the Era of Precision Medicine: 10 Years of Clinical Evidence in Cancer.” *Exploration of Targeted Anti-Tumor Therapy* 4(1):102–38. doi: 10.37349/etat.2023.00125.
- Castellani, Christina A., Ryan J. Longchamps, Jing Sun, Eliseo Guallar, and Dan E. Arking. 2020. „Thinking Outside the Nucleus: Mitochondrial DNA Copy Number in Health and Disease.” *Mitochondrion* 53:214–23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.004>.
- Chandra, Pallavi, Steven J. Grigsby, and Jennifer A. Philips. 2022. „Immune Evasion and Provocation by Mycobacterium Tuberculosis.” *Nature Reviews. Microbiology* 20(12):750–66. doi: 10.1038/s41579-022-00763-4.
- Chinnery, Patrick Francis, and Gavin Hudson. 2013. „Mitochondrial Genetics.” *British Medical Bulletin* 106(1):135–59. doi: 10.1093/bmb/ldt017.
- Choi, Hayoung, Jung Eun Yoo, Kyungdo Han, Wonsuk Choi, Sang Youl Rhee, Hyun Lee, and Dong Wook Shin. 2021. „Body Mass Index, Diabetes, and Risk of Tuberculosis: A Retrospective Cohort Study.” *Frontiers in Nutrition* 8.
- Chung, Jae-Yong. 2014. „Geriatric Clinical Pharmacology and Clinical Trials in the Elderly.” *Transl Clin Pharmacol* 22(2):64–69.
- Cossarizza, Andrea, Marcello Pinti, Milena Nasi, Lara Gibellini, Serena Manzini, Erika Roat, Sara De Biasi, Linda Bertonecelli, Jonas P. Montagna, Luca Bisi, Lisa Manzini, Tommaso Trenti, Vanni Borghi, and Cristina Mussini. 2011. „Increased Plasma

- Levels of Extracellular Mitochondrial DNA during HIV Infection: A New Role for Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns during Inflammation." *Mitochondrion* 11(5):750–55. doi: 10.1016/j.mito.2011.06.005.
- Danelishvili, Lia, Jeffery McGarvey, Yong-Jun Li, and Luiz E. Bermudez. 2003. „Mycobacterium Tuberculosis Infection Causes Different Levels of Apoptosis and Necrosis in Human Macrophages and Alveolar Epithelial Cells." *Cellular Microbiology* 5(9):649–60. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00312.x.
- Dolcini, Jacopo, Haotian Wu, Jamaji C. Nwanaji-Enwerem, Marianthi-Anna Kiomourtzologu, Akin Cayir, Marco Sanchez-Guerra, Pantel Vokonas, Joel Schwarz, and Andrea A. Baccarelli. 2020. „Mitochondria and Aging in Older Individuals: An Analysis of DNA Methylation Age Metrics, Leukocyte Telomere Length, and Mitochondrial DNA Copy Number in the VA Normative Aging Study." *Aging* 12(3):2070–83. doi: 10.18632/aging.102722.
- Dzhemilova, L. U., O. L. Posukh, A. M. Tazetdinov, N. A. Barashkov, S. A. Zhuravskii, S. N. Ponidelko, T. G. Markova, V. N. Tadinova, S. A. Fedorova, N. R. Maksimova, and E. K. Khusnutdinova. 2009. „Analysis of Mitochondrial 12S rRNA and tRNA Ser(UCN) Genes in Patients with Nonsyndromic Sensorineural Hearing Loss from Various Regions of Russia." *Russian Journal of Genetics* 45(7):861–69. doi: 10.1134/S1022795409070151.
- Ellzey, Lily M., Kristin L. Patrick, and Robert O. Watson. 2023. „Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Double Agents in Mycobacterium Tuberculosis Infection." *Current Opinion in Immunology* 84:102366. doi: 10.1016/j.coi.2023.102366.
- Escrig-Larena, Jose Ignacio, Sandra Delgado-Pulido, and María Mittelbrunn. 2023. „Mitochondria during T Cell Aging." *Seminars in Immunology* 69:101808. doi: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101808>.
- Fendt, Liane, Bettina Zimmermann, Martin Daniaux, and Walther Parson. 2009. „Sequencing Strategy for the Whole Mitochondrial Genome Resulting in High Quality Sequences." *BMC Genomics* 10. doi: 10.1186/1471-2164-10-139.
- Fernández-Carballo, B. Leticia, Tobias Broger, Romain Wyss, Niaz Banaei, and Claudia M. Denking. 2019. „Toward the Development of a Circulating Free DNA-Based In Vitro Diagnostic Test for Infectious Diseases: A Review of Evidence for Tuberculosis." *Journal of Clinical Microbiology* 57(4). doi: 10.1128/JCM.01234-18.
- Ferreira, Tomas, and Santiago Rodriguez. 2024. „Mitochondrial DNA: Inherent Complexities Relevant to Genetic Analyses." *Genes* 15(5). doi: 10.3390/genes15050617.
- Filograna, Roberta, Mara Mennuni, David Alsina, and Nils-Göran Larsson. 2021. „Mitochondrial DNA Copy Number in Human Disease: The More the Better?" *FEBS Letters* 595(8):976–1002. doi: 10.1002/1873-3468.14021.
- Freimane, Lauma, Linda Barkane, Viktorija Igumnova, Agnija Kivrane, Egija Zole, and Renate Ranka. 2021. „Telomere Length and Mitochondrial DNA Copy Number in Multidrug-Resistant Tuberculosis." *Tuberculosis* 131:102144. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102144>.
- Freimane, Lauma, Linda Barkāne, Agnija Kivrane, Darja Sadovska, Viktorija Ulanova, and Renāte Ranka. 2023. „Assessment of Amikacin- and Capreomycin-Related Adverse Drug Reactions in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis and Exploring the Role of Genetic Factors." *Journal of Personalized Medicine* 13(4). doi: 10.3390/jpm13040599.

- Freimane, Lauma, Agnija Kivrāne, Viktorija Ulanova, Anda Viksna, Eduards Sevostjanovs, Solveiga Grinberga, Andra Cirule, Alvilis Krams, and Renāte Ranka. 2025. „Fluctuations in Circulating Cell-Free Mitochondrial and Nuclear DNA Copy Numbers in Blood Plasma after Anti-Tuberculosis Drug Intake in Patients with Drug-Susceptible Tuberculosis.” *Tuberculosis* 151:102611. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2025.102611>.
- Gao, Zewen, Ye Chen, and Min-Xin Guan. 2017. „Mitochondrial DNA Mutations Associated with Aminoglycoside Induced Ototoxicity.” *Journal of Otology* 12(1):1–8. doi: 10.1016/j.joto.2017.02.001.
- GraphPad Software. 2007. „GraphPad Prism.”
- Heidari, Mohammad Mehdi, Mehri Khatami, Akram Kamalipour, Mustafa Kalantari, Mahsa Movahed, Mohammad Hayet Emmamy, Mehdi Hadadzadeh, José Bragança, Mohsen Namnabat, and Bahareh Mazrouei. 2022. „Mitochondrial Mutations in Protein Coding Genes of Respiratory Chain Including Complexes IV, V, and Mt-TRNA Genes Are Associated Risk Factors for Congenital Heart Disease.” *EXCLI Journal* 21:1306–30. doi: 10.17179/excli2022-5298.
- Heyckendorf, Jan, Sophia B. Georghiou, Nicole Frahm, Norbert Heinrich, Irina Kontsevaya, Maja Reimann, David Holtzman, Marjorie Imperial, Daniela M. Cirillo, Stephen H. Gillespie, and Morten Ruhwald. 2022. „Tuberculosis Treatment Monitoring and Outcome Measures: New Interest and New Strategies.” *Clinical Microbiology Reviews* 35(3):e0022721. doi: 10.1128/cmr.00227-21.
- Houben, Rein M. G. J., and Peter J. Dodd. 2016. „The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-Estimation Using Mathematical Modelling.” *PLoS Medicine* 13(10):e1002152–e1002152. doi: 10.1371/journal.pmed.1002152.
- Huang, Yi, Lin Ai, Xiaochen Wang, Ziyong Sun, and Feng Wang. 2022. „Review and Updates on the Diagnosis of Tuberculosis.” *Journal of Clinical Medicine* 11(19). doi: 10.3390/jcm11195826.
- Igumnova, V., L. Veidemane, A. Viksna, V. Capligina, E. Zole, and R. Ranka. 2018. „The Prevalence of Mitochondrial Mutations Associated with Aminoglycoside-Induced Deafness in Ethnic Latvian Population: The Appraisal of the Evidence.” *Journal of Human Genetics*. doi: 10.1038/s10038-018-0544-6.
- Jackson Chornenki, Nicholas L., Robert Coke, Andrew C. Kwong, Dhruva J. Dwivedi, Michael K. Xu, Ellen McDonald, John C. Marshall, Alison E. Fox-Robichaud, Emmanuel Charbonney, and Patricia C. Liaw. 2019. „Comparison of the Source and Prognostic Utility of CfdDNA in Trauma and Sepsis.” *Intensive Care Medicine Experimental* 7(1):29. doi: 10.1186/s40635-019-0251-4.
- Jain, Rashi, Gopika Gupta, D. K. Mitra, and Randeep Guleria. 2024. „Diagnosis of Extra Pulmonary Tuberculosis: An Update on Novel Diagnostic Approaches.” *Respiratory Medicine* 225:107601. doi: 10.1016/j.rmed.2024.107601.
- Jones, Samantha W., Amy L. Ball, Amy E. Chadwick, and Ana Alfirevic. 2021. „The Role of Mitochondrial DNA Variation in Drug Response: A Systematic Review.” *Frontiers in Genetics* 12.
- Katoto, Patrick D. M. C., Tony Kayembe-Kitenge, Krystal J. Godri Pollitt, Dries S. Martens, Manosij Ghosh, Jean B. Nachege, Benoit Nemery, and Tim S. Nawrot. 2021. „Telomere Length and Outcome of Treatment for Pulmonary Tuberculosis in a

- Gold Mining Community.” *Scientific Reports* 11(1):4031. doi: 10.1038/s41598-021-83281-2.
- Kim, Jung-Ha, Hye Kyung Kim, Jae-Hong Ko, Hyoweon Bang, and Duk-Chul Lee. 2013. „The Relationship between Leukocyte Mitochondrial DNA Copy Number and Telomere Length in Community-Dwelling Elderly Women.” *PloS One* 8(6):e67227. doi: 10.1371/journal.pone.0067227.
- Kivrane, Agnija, Solveiga Grinberga, Eduards Sevostjanovs, Viktorija Igumnova, Ilva Pole, Anda Viksna, Dace Bandere, Alvilis Krams, Andra Cirule, Osvalds Pugovics, and Renate Ranka. 2021. „LC-MS/MS Method for Simultaneous Quantification of the First-Line Anti-Tuberculosis Drugs and Six Primary Metabolites in Patient Plasma: Implications for Therapeutic Drug Monitoring.” *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1185:122986. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122986.
- Klinge, Carolyn M. 2020. „Estrogenic Control of Mitochondrial Function.” *Redox Biology* 31:101435. doi: 10.1016/j.redox.2020.101435.
- Krueger, Felix, Frankie James, Phil Ewels, Ebrahim Afyounian, Michael Weinstein, Benjamin Schuster-Boeckler, Gert Hulselmans, and sclamons. 2023. „Trim Galore!”
- Lan, Zhiyi, Nafees Ahmad, Parvaneh Baghaei, Linda Barkane, Andrea Benedetti, Sarah K. Brode, James C. M. Brust, Jonathon R. Campbell, Vicky Wai Lai Chang, Dennis Falzon, Lorenzo Guglielmetti, Petros Isaakidis, Russell R. Kempker, Maia Kipiani, Liga Kuksa, Christoph Lange, Rafael Laniado-Laborin, Payam Nahid, Denise Rodrigues, Rupak Singla, Zarir F. Udawadia, and Dick Menzies. 2020. „Drug-Associated Adverse Events in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis: An Individual Patient Data Meta-Analysis.” *The Lancet. Respiratory Medicine* 8(4):383–94. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30047-3.
- Langmead, Ben, and Steven L. Salzberg. 2012. „Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2.” *Nature Methods* 9(4):357–59. doi: 10.1038/nmeth.1923.
- Li, Zhaodong, Yunlong Hu, Wenfei Wang, Fa Zou, Jing Yang, Wei Gao, SiWan Feng, Guanghuan Chen, Chenyan Shi, Yi Cai, Guofang Deng, and Xinchun Chen. 2024. „Integrating Pathogen- and Host-Derived Blood Biomarkers for Enhanced Tuberculosis Diagnosis: A Comprehensive Review.” *Frontiers in Immunology* 15:1438989. doi: 10.3389/fimmu.2024.1438989.
- Lin, Jue, and Elissa Epel. 2022. „Stress and Telomere Shortening: Insights from Cellular Mechanisms.” *Ageing Research Reviews* 73:101507. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101507>.
- Lin, Philana Ling, Christopher B. Ford, M. Teresa Coleman, Amy J. Myers, Richa Gawande, Thomas Ioerger, James Sacchetti, Sarah M. Fortune, and JoAnne L. Flynn. 2014. „Sterilization of Granulomas Is Common in Active and Latent Tuberculosis despite Within-Host Variability in Bacterial Killing.” *Nature Medicine* 20(1):75–79. doi: 10.1038/nm.3412.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. „Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method.” *Methods (San Diego, Calif.)* 25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lowes, Hannah, Angela Pyle, Mauro Santibanez-Koref, and Gavin Hudson. 2020. „Circulating Cell-Free Mitochondrial DNA Levels in Parkinson’s Disease Are

- Influenced by Treatment.” *Molecular Neurodegeneration* 15(1):10. doi: 10.1186/s13024-020-00362-y.
- Luies, Laneke, and Ilse du Preez. 2020. „The Echo of Pulmonary Tuberculosis: Mechanisms of Clinical Symptoms and Other Disease-Induced Systemic Complications.” *Clinical Microbiology Reviews* 33(4). doi: 10.1128/CMR.00036-20.
- Malik, Afshan N., and Anna Czajka. 2013. „Is Mitochondrial DNA Content a Potential Biomarker of Mitochondrial Dysfunction?” *Mitochondrion* 13(5):481–92. doi: 10.1016/j.mito.2012.10.011.
- McDermott, John Henry, Joshua Wolf, Keito Hoshitsuki, Rachel Huddart, Kelly E. Caudle, Michelle Whirl-Carrillo, Peter S. Steyger, Richard J. H. Smith, Neal Cody, Cristina Rodriguez-Antona, Teri E. Klein, and William G. Newman. 2022. „Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for the Use of Aminoglycosides Based on MT-RNR1 Genotype.” *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 111(2):366–72. doi: <https://doi.org/10.1002/cpt.2309>.
- Meddeb, Romain, Zahra Al Amir Dache, Simon Thezenas, Amaëlle Otandault, Rita Tanos, Brice Pastor, Cynthia Sanchez, Joelle Azzi, Geoffroy Tusch, Simon Azan, Caroline Mollevi, Antoine Adenis, Safia El Messaoudi, Philippe Blache, and Alain R. Thierry. 2019. „Quantifying Circulating Cell-Free DNA in Humans.” *Scientific Reports* 9(1):5220. doi: 10.1038/s41598-019-41593-4.
- Memiah, Peter, Sibhatu Biadgilign, Jamie Kuhlman, Courtney Cook, Piera Mburia, Carol Kingori, Daniel Sarpong, Gabriel Buluku, and Marquis Hawkins. 2021. „Allostatic Load, Single, and Dual Chronic Conditions: Evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey.” *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 20(2):104–13. doi: 10.1089/met.2021.0008.
- Min, Jinsoo, Ju Sang Kim, Hyung Woo Kim, Yousang Ko, Jee Youn Oh, Yun-Jeong Jeong, Eun Hye Lee, Bumhee Yang, Ki Man Lee, Joong Hyun Ahn, Jin Woo Kim, Yong Il Hwang, Sung Soon Lee, Jae Seuk Park, and Hyeon-Kyoung Koo. 2023. „Effects of Underweight and Overweight on Mortality in Patients with Pulmonary Tuberculosis.” *Frontiers in Public Health* 11:1236099. doi: 10.3389/fpubh.2023.1236099.
- La Morgia, C., A. Maresca, L. Caporali, M. L. Valentino, and V. Carelli. 2020. „Mitochondrial Diseases in Adults.” *Journal of Internal Medicine* 287(6):592–608. doi: <https://doi.org/10.1111/joim.13064>.
- Münch, Christian, and J. Wade Harper. 2016. „Mitochondrial Unfolded Protein Response Controls Matrix Pre-RNA Processing and Translation.” *Nature* 534(7609):710–13. doi: 10.1038/nature18302.
- Narasimhan, Padmanesan, James Wood, Chandini Raina Macintyre, and Dilip Mathai. 2013. „Risk Factors for Tuberculosis.” *Pulmonary Medicine* 2013:828939. doi: 10.1155/2013/828939.
- Nathavitharana, Ruvandhi R., Alberto L. Garcia-Basteiro, Morten Ruhwald, Frank Cobelens, and Grant Theron. 2022. „Reimagining the Status Quo: How Close Are We to Rapid Sputum-Free Tuberculosis Diagnostics for All?” *EBioMedicine* 78:103939. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.103939.
- Negin, Joel, Seye Abimbola, and Ben J. Marais. 2015. „Tuberculosis among Older Adults – Time to Take Notice.” *International Journal of Infectious Diseases* 32:135–37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.11.018>.

- Nekrutenko, Anton, and Alex Ostrovsky. 2021. „Calling Variants in Non-Diploid Systems (Galaxy Training Materials).” Retrieved (<https://training.galaxyproject.org/archive/2021-10-01/topics/variant-analysis/tutorials/non-dip/tutorial.html>).
- NIH. 2017. *Division of AIDS (DAIDS) Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events. Corrected Version 2.1*. USA.
- Nogueira, Betânia M. F., Sonya Krishnan, Beatriz Barreto-Duarte, Mariana Araújo-Pereira, Artur T. L. Queiroz, Jerrold J. Ellner, Padmini Salgame, Thomas J. Scriba, Timothy R. Sterling, Amita Gupta, and Bruno B. Andrade. 2022. „Diagnostic Biomarkers for Active Tuberculosis: Progress and Challenges.” *EMBO Molecular Medicine* 14(12):e14088. doi: 10.15252/emmm.202114088.
- Noronha, Irene L., Guilherme P. Santa-Catharina, Lucia Andrade, Venceslau A. Coelho, Wilson Jacob-Filho, and Rosilene M. Elias. 2022. „Glomerular Filtration in the Aging Population.” *Frontiers in Medicine* 9:769329. doi: 10.3389/fmed.2022.769329.
- Nunes-Alves, Cláudio, Matthew G. Booty, Stephen M. Carpenter, Pushpa Jayaraman, Alissa C. Rothchild, and Samuel M. Behar. 2014. „In Search of a New Paradigm for Protective Immunity to TB.” *Nature Reviews. Microbiology* 12(4):289–99. doi: 10.1038/nrmicro3230.
- Nyaruaba, Raphael, Caroline Mwaliko, Kelvin Kimutai Kering, and Hongping Wei. 2019. „Droplet Digital PCR Applications in the Tuberculosis World.” *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 117:85–92. doi: 10.1016/j.tube.2019.07.001.
- Pai, Madhukar, Marcel A. Behr, David Dowdy, Keertan Dheda, Maziar Divangahi, Catharina C. Boehme, Ann Ginsberg, Soumya Swaminathan, Melvin Spigelman, Hailayesus Getahun, Dick Menzies, and Mario Raviglione. 2016. „Tuberculosis.” *Nature Reviews. Disease Primers* 2:16076. doi: 10.1038/nrdp.2016.76.
- Pan, Sheng Wei, Rehan R. Syed, Donald G. Catanzaro, Mei Lin Ho, Chin Chung Shu, Tsung Yeh Tsai, Yen Han Tseng, Jia Yih Feng, Yuh Min Chen, Wei Juin Su, Antonino Catanzaro, and Timothy C. Rodwell. 2022. „Circulating Mitochondrial Cell-Free DNA Dynamics in Patients with Mycobacterial Pulmonary Infections: Potential for a Novel Biomarker of Disease.” *Frontiers in Immunology* 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.1040947.
- Peloquin, Charles A. 2002. „Therapeutic Drug Monitoring in the Treatment of Tuberculosis.” *Drugs* 62(15):2169–83. doi: 10.2165/00003495-200262150-00001.
- Peng, Yun, Yuanhui Wu, Shiju Chen, Yuan Liu, Hongyan Qian, Yan He, Heqing Huang, Meimei Cai, Wen Liu, and Guixiu Shi. 2024. „Circulating Cell-Free DNA Correlate to Disease Activity and Treatment Response of Patients with Radiographic Axial Spondyloarthritis.” *Scientific Reports* 14(1):178. doi: 10.1038/s41598-023-50543-0.
- Pfaffl, Michael W. 2004. *Quantification Strategies in Real-Time PCR*. edited by S.A. Bustin. La Jolla, CA, USA.
- Phillips, Nicole R., Marc L. Sprouse, and Rhonda K. Roby. 2014. „Simultaneous Quantification of Mitochondrial DNA Copy Number and Deletion Ratio: A Multiplex Real-Time PCR Assay.” *Scientific Reports* 4:3887. doi: 10.1038/srep03887.
- Preste, Roberto, Ornella Vitale, Rosanna Clima, Giuseppe Gasparre, and Marcella Attimonelli. 2019. „HmtVar: A New Resource for Human Mitochondrial Variations and Pathogenicity Data.” *Nucleic Acids Research* 47. doi: 10.1093/nar/gky1024.
- Qian, Wei, Namrata Kumar, Vera Roginskaya, Elise Fouquerel, Patricia L. Opreško, Sruti Shiva, Simon C. Watkins, Dmytro Kolodieznyi, Christopher J. Bakkenist,

- Marcel P. Bruchez, and Bennett Van Houten. 2019. „Chemoptogenetic Damage to Mitochondria Causes Rapid Telomere Dysfunction.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(37):18435–44. doi: 10.1073/pnas.1910574116.
- R Core Team. 2021. „R: A Language and Environment for Statistical Computing.”
- Rahat, Beenish, Taqveema Ali, Divika Sapehia, Aatish Mahajan, and Jyotdeep Kaur. 2020. „Circulating Cell-Free Nucleic Acids as Epigenetic Biomarkers in Precision Medicine.” *Frontiers in Genetics* 11:844. doi: 10.3389/fgene.2020.00844.
- Ramakrishnan, Lalita. 2012. „Revisiting the Role of the Granuloma in Tuberculosis.” *Nature Reviews. Immunology* 12(5):352–66. doi: 10.1038/nri3211.
- Reddam, Aalekhya, Sarah McLarnan, and Allison Kupsco. 2022. „Environmental Chemical Exposures and Mitochondrial Dysfunction: A Review of Recent Literature.” *Current Environmental Health Reports* 9(4):631–49. doi: 10.1007/s40572-022-00371-7.
- Reis da Silva, Tiago Horta. 2024. „Pharmacokinetics in Older People: An Overview of Prescribing Practice.” *Journal of Prescribing Practice* 6(9):374–81. doi: 10.12968/jprp.2024.6.9.374.
- Richter-Dennerlein, Ricarda, Silke Oeljeklaus, Isotta Lorenzi, Christin Ronsör, Bettina Bareth, Alexander Benjamin Schendzielorz, Cong Wang, Bettina Warscheid, Peter Rehling, and Sven Dennerlein. 2016. „Mitochondrial Protein Synthesis Adapts to Influx of Nuclear-Encoded Protein.” *Cell* 167(2):471-483.e10. doi: 10.1016/J.CELL.2016.09.003.
- Rivetti, Serena, Alberto Romano, Stefano Mastrangelo, Giorgio Attinà, Palma Maurizi, and Antonio Ruggiero. 2023. „Aminoglycosides-Related Ototoxicity: Mechanisms, Risk Factors, and Prevention in Pediatric Patients.” *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 16(10). doi: 10.3390/ph16101353.
- Robinson, James T., Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, and Jill P. Mesirov. 2011. „Integrative Genomics Viewer.” doi: 10.1038/nbt.1754.
- Roch, Benoit, Ekaterina Pisareva, Cynthia Sanchez, Brice Pastor, Rita Tanos, Alexia Mirandola, Thibault Mazard, Zahra Al Amir Dache, and Alain R. Thierry. 2021. „Plasma Derived Cell-Free Mitochondrial DNA Originates Mainly from Circulating Cell-Free Mitochondria.” *BioRxiv* 2021.09.03.458846. doi: 10.1101/2021.09.03.458846.
- Rovite, Vita, Yael Wolff-Sagi, Linda Zaharenko, Liene Nikitina-Zake, Elmars Grens, and Janis Klovins. 2018. „Genome Database of the Latvian Population (LGDB): Design, Goals, and Primary Results.” *Journal of Epidemiology* 28(8):353–60. doi: 10.2188/jea.JE20170079.
- Ruiz-Pesini, Eduardo, Marie T. Lott, Vincent Procaccio, Jason C. Poole, Marty C. Brandon, Dan Mishmar, Christina Yi, James Kreuziger, Pierre Baldi, and Douglas C. Wallace. 2006. „An Enhanced MITOMAP with a Global MtDNA Mutational Phylogeny.” doi: 10.1093/nar/gkl927.
- Ruiz, A ; , J ; Flores-Gonzalez, I ; Buendia-Roldan, L Chavez-Galan, Andy Ruiz, Julio Flores-Gonzalez, Ivette Buendia-Roldan, and Leslie Chavez-Galan. 2021. „Citation: Telomere Shortening and Its Association with Cell Dysfunction in Lung Diseases.” doi: 10.3390/ijms23010425.

- Russell, Shannon L., Dirk A. Lamprecht, Tawanda Mandizvo, Terrence T. Jones, Vanessa Naidoo, Kelvin W. Addicott, Chivonne Moodley, Bongani Ngcobo, David K. Crossman, Gordon Wells, and Adrie J. C. Steyn. 2019. „Compromised Metabolic Reprogramming Is an Early Indicator of CD8+ T Cell Dysfunction during Chronic Mycobacterium Tuberculosis Infection.” *Cell Reports*. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.034.
- Sahin, Ergün, Simona Colla, Marc Liesa, Javid Moslehi, Florian L. Müller, Mira Guo, Marcus Cooper, Darrell Kotton, Attila J. Fabian, Carl Walkey, Richard S. Maser, Giovanni Tonon, Friedrich Foerster, Robert Xiong, Y. Alan Wang, Sachet A. Shukla, Mariela Jaskelioff, Eric S. Martin, Timothy P. Heffernan, Alexei Protopopov, Elena Ivanova, John E. Mahoney, Maria Kost-Alimova, Samuel R. Perry, Roderick Bronson, Ronglih Liao, Richard Mulligan, Orian S. Shirihai, Lynda Chin, and Ronald A. DePinho. 2011. „Telomere Dysfunction Induces Metabolic and Mitochondrial Compromise.” *Nature* 470(7334):359–65. doi: 10.1038/nature09787.
- Salari, Nader, Amir Hossein Kanjoori, Amin Hosseinian-Far, Razie Hasheminezhad, Kamran Mansouri, and Masoud Mohammadi. 2023. „Global Prevalence of Drug-Resistant Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Infectious Diseases of Poverty* 12(1):57. doi: 10.1186/s40249-023-01107-x.
- Sanchez-Contreras, Monica, and Scott R. Kennedy. 2022. „The Complicated Nature of Somatic MtDNA Mutations in Aging.” *Frontiers in Aging* 2. doi: 10.3389/fragi.2021.805126.
- Sant’Anna, Flávia M., Mariana Araújo-Pereira, Carolina A. S. Schmaltz, María B. Arriaga, Raquel V. C. de Oliveira, Bruno B. Andrade, and Valeria C. Rolla. 2022. „Adverse Drug Reactions Related to Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis in Brazil: A Prospective Cohort Study.” *Frontiers in Tropical Diseases* 2.
- Sarkar, Susmita, and Advaita Ganguly. 2016. „Current Overview of Anti-Tuberculosis Drugs: Metabolism and Toxicities.” *Mycobacterial Diseases* : 6(2). doi: 10.4172/2161-1068.1000209.
- Schaefer, Patrick M., Leonardo Scherer Alves, Maria Lvova, Jessica Huang, Komal Rathi, Kevin Janssen, Arrienne Butic, Tal Yardeni, Ryan Morrow, Marie Lott, Deborah Murdock, Angela Song, Kierstin Keller, Benjamin A. Garcia, Clair A. Francomano, and Douglas C. Wallace. 2022. „Combination of Common MtDNA Variants Results in Mitochondrial Dysfunction and a Connective Tissue Dysregulation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119(45):e2212417119. doi: 10.1073/pnas.2212417119.
- Shaik, Junaid, Manormoney Pillay, and Prakash Jeena. 2024. „A Review Of Host-Specific Diagnostic And Surrogate Biomarkers In Children With Pulmonary Tuberculosis.” *Paediatric Respiratory Reviews* 52:44–50. doi: 10.1016/j.prrv.2024.01.005.
- Shim, Hanjoo B., Omair Arshad, Izabella Gadawska, Hélène C. F. Côté, and Anthony Y. Y. Hsieh. 2020. „Platelet MtDNA Content and Leukocyte Count Influence Whole Blood MtDNA Content.” *Mitochondrion* 52:108–14. doi: 10.1016/j.mito.2020.03.001.
- Shoraka, Shahrzad, Seyed Reza Mohebbi, Seyed Masoud Hosseini, and Mohammad Reza Zali. 2023. „Comparison of Plasma Mitochondrial DNA Copy Number in Asymptomatic and Symptomatic COVID-19 Patients.” *Frontiers in Microbiology* 14:1256042. doi: 10.3389/fmicb.2023.1256042.

- Shulman, Eli, Valery Belakhov, Gao Wei, Ann Kendall, Esther G. Meyron-Holtz, Dorit Ben-Shachar, Jochen Schacht, and Timor Baasov. 2014. „Designer Aminoglycosides That Selectively Inhibit Cytoplasmic Rather than Mitochondrial Ribosomes Show Decreased Ototoxicity: A Strategy for the Treatment of Genetic Diseases.” *The Journal of Biological Chemistry* 289(4):2318–30. doi: 10.1074/jbc.M113.533588.
- Siddalingaiah, Nayana, Kiran Chawla, Sharath Burugina Nagaraja, and Druti Hazra. 2023. „Risk Factors for the Development of Tuberculosis among the Pediatric Population: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *European Journal of Pediatrics* 182(7):3007–19. doi: 10.1007/s00431-023-04988-0.
- Snyder, Matthew W., Martin Kircher, Andrew J. Hill, Riza M. Daza, and Jay Shendure. 2016. „Cell-Free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint That Informs Its Tissues-Of-Origin.” *Cell* 164(1–2):57–68. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.050.
- Söderström, Anna C., Mads Nybo, Christian Nielsen, and Pernille J. Vinholt. 2016. „The Effect of Centrifugation Speed and Time on Pre-Analytical Platelet Activation.” *Thrombosis and Haemostasis* 116(12):1913–20. doi: 10.1111/tha.12679.
- Sproston, Nicola R., and Jason J. Ashworth. 2018. „Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection.” *Frontiers in Immunology* 9:754. doi: 10.3389/fimmu.2018.00754.
- Sun, Jing, Ryan J. Longchamps, Damani A. Piggott, Christina A. Castellani, Jason A. Sumpter, Todd T. Brown, Shruti H. Mehta, Dan E. Arking, and Gregory D. Kirk. 2019. „Association Between HIV Infection and Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood: A Population-Based, Prospective Cohort Study.” *The Journal of Infectious Diseases* 219(8):1285–93. doi: 10.1093/infdis/jiy658.
- Szilágyi, Melinda, Ondrej Pös, Éva Márton, Gergely Buglyó, Beáta Soltész, Judit Keserű, András Penyige, Tomas Szemes, and Bálint Nagy. 2020. „Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application.” *International Journal of Molecular Sciences* 21(18). doi: 10.3390/ijms21186827.
- Tellier, Raymond, Yuguo Li, Benjamin J. Cowling, and Julian W. Tang. 2019. „Recognition of Aerosol Transmission of Infectious Agents: A Commentary.” *BMC Infectious Diseases* 19(1):101. doi: 10.1186/s12879-019-3707-y.
- Tessier, Nicolas P., Lise M. Hardy, Jean-François Deleuze, and Alexandre How-Kit. 2023. „Circulating Cell-Free Nucleic Acids of Plasma in Human Aging, Healthy Aging and Longevity: Current State of Knowledge.” *Frontiers in Genetics* 14. doi: 10.3389/fgene.2023.1321280.
- Trulson, Inga, Juliane Stahl, Stefan Margraf, Martin Scholz, Eduard Hoecherl, Konrad Wolf, Juergen Durner, Frank Klawonn, and Stefan Holdenrieder. 2023. „Cell-Free DNA in Plasma and Serum Indicates Disease Severity and Prognosis in Blunt Trauma Patients.” *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 13(6). doi: 10.3390/diagnostics13061150.
- Trumpff, Caroline, Anna L. Marsland, Carla Basualto-Alarcón, James L. Martin, Judith E. Carroll, Gabriel Sturm, Amy E. Vincent, Eugene V Mosharov, Zhenglong Gu, Brett A. Kaufman, and Martin Picard. 2019. „Acute Psychological Stress Increases Serum Circulating Cell-Free Mitochondrial DNA.” *Psychoneuroendocrinology* 106:268–76. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.03.026.
- Udomsinprasert, Wanvisa, Noppadol Chanhom, Supharat Suvichapanich, Sukanya Wattanapokayakit, Surakameth Mahasirimongkol, Wasun Chantratita, and

- Jiraphun Jittikoon. 2020. „Leukocyte Telomere Length as a Diagnostic Biomarker for Anti-Tuberculosis Drug-Induced Liver Injury.” *Scientific Reports* 10(1):5628. doi: 10.1038/s41598-020-62635-2.
- Udomsinprasert, Wanvisa, Jiraphun Jittikoon, Usa Chaikledkaew, Wacharapol Saengsiwaritt, Noppadol Chanhom, Supharat Suvichapanich, Sukanya Wattanapokayakit, Surakameth Mahasirimongkol, and Wasun Chantratita. 2022. „Mitochondrial DNA Content as a Diagnostic Marker for Antituberculosis Drug-Induced Liver Injury.” *International Journal of Infectious Diseases* 122:1034–40. doi: 10.1016/j.ijid.2022.07.071.
- Vajpeyee, Atulabh, Teddy Wijatmiko, Manisha Vajpeyee, Onjal Taywade, Swapnil Pandey, and Puneet S. Chauhan. 2020. „Clinical Usefulness of Cell-Free DNA as a Prognostic Marker in Acute Ischemic Stroke.” *The Neurologist* 25(1):11–13. doi: 10.1097/NRL.0000000000000249.
- Vázquez-Coto, Daniel, Guillermo M. Albaiceta, Laura Amado-Rodríguez, Marta G. Clemente, Elías Cuesta-Llavona, Juan Gómez, and Eliecer Coto. 2022. „Common Mitochondrial Haplogroups as Modifiers of the Onset-Age for Critical COVID-19.” *Mitochondrion* 67:1–5. doi: 10.1016/j.mito.2022.09.001.
- Vázquez, Cristina Lourdes, María Verónica Bianco, Federico Carlos Blanco, Marina Andrea Forrellad, Maximiliano Gabriel Gutierrez, and Fabiana Bigi. 2017. „Mycobacterium Bovis Requires P27 (LprG) To Arrest Phagosome Maturation and Replicate within Bovine Macrophages.” *Infection and Immunity* 85(3). doi: 10.1128/IAI.00720-16.
- Vila-Sanjurjo, Antón, Paul M. Smith, and Joanna L. Elson. 2021. „Heterologous Inferential Analysis (HIA) and Other Emerging Concepts: In Understanding Mitochondrial Variation In Pathogenesis: There Is No More Low-Hanging Fruit.”
- Vuda, Madhusudanarao, and Ashwin Kamath. 2016. „Drug Induced Mitochondrial Dysfunction: Mechanisms and Adverse Clinical Consequences.” *Mitochondrion* 31:63–74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.10.005>.
- Wallace, Douglas C. 2015. „Mitochondrial DNA Variation in Human Radiation and Disease.” *Cell* 163(1):33–38. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.067.
- Wallace, Douglas C., and Weiwei Fan. 2010. „Energetics, Epigenetics, Mitochondrial Genetics.” *Mitochondrion* 10(1):12–31. doi: 10.1016/j.mito.2009.09.006.
- Wang, Dong, Ling-Yan Su, A. Mei Zhang, Yu-Ye Li, Xiao-An Li, Ling-Ling Chen, Heng Long, and Yong-Gang Yao. 2012. „Mitochondrial DNA Copy Number, but Not Haplogroup, Confers a Genetic Susceptibility to Leprosy in Han Chinese from Southwest China.” *PLOS ONE* 7(6):e38848.
- Wang, Qiong, Jing Wang, Yan Huang, Yichen Du, Yi Zhang, Yunxi Cui, and De-Ming Kong. 2022. „Development of the DNA-Based Biosensors for High Performance in Detection of Molecular Biomarkers: More Rapid, Sensitive, and Universal.” *Biosensors & Bioelectronics* 197:113739. doi: 10.1016/j.bios.2021.113739.
- Wang, Zhiguo. 2022. „The Entropy Perspective on Human Illness and Aging.” *Engineering* 9(2):22–26.
- Warmelink, Ina, Nick H. ten Hacken, Tjip S. van der Werf, and Richard van Altena. 2011. „Weight Loss during Tuberculosis Treatment Is an Important Risk Factor for Drug-Induced Hepatotoxicity.” *British Journal of Nutrition* 105(3):400–408. doi: DOI: 10.1017/S0007114510003636.

- Weinberg, Samuel E., Laura A. Sena, and Navdeep S. Chandel. 2015. „Mitochondria in the Regulation of Innate and Adaptive Immunity.” *Immunity* 42(3):406–17. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.002.
- Weissensteiner, Hansi, Dominic Pacher, Anita Kloss-Brandstätter, Brandst“ Brandstätter, Lukas Forer, G. “ Unther Specht, Hans-J. “. Urgen Bandelt, Florian Kronenberg, Antonio Salas, Sebastian Schönherr, and Sch“ Schönherr. 2016. „HaploGrep 2: Mitochondrial Haplogroup Classification in the Era of High-Throughput Sequencing.” *Nucleic Acids Research* 44. doi: 10.1093/nar/gkw233.
- West, A. Phillip, William Khoury-Hanold, Matthew Staron, Michal C. Tal, Cristiana M. Pineda, Sabine M. Lang, Megan Bestwick, Brett A. Duguay, Nuno Raimundo, Donna A. MacDuff, Susan M. Kaech, James R. Smiley, Robert E. Means, Akiko Iwasaki, and Gerald S. Shadel. 2015. „Mitochondrial DNA Stress Primes the Antiviral Innate Immune Response.” *Nature* 520(7548):553–57. doi: 10.1038/nature14156.
- West, A. Phillip, and Gerald S. Shadel. 2017. „Mitochondrial DNA in Innate Immune Responses and Inflammatory Pathology.” *Nature Reviews. Immunology* 17(6):363–75. doi: 10.1038/nri.2017.21.
- WHO. 2022a. *Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 4: Treatment—Drug-Susceptible Tuberculosis Treatment*. edited by WHO. Geneva.
- WHO. 2022b. *WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 4: Treatment – Drug-Resistant Tuberculosis Treatment, 2022 Update*. Geneva: WHO.
- WHO. 2024a. *Global Tuberculosis Report 2024*. Geneva.
- WHO. 2024b. „Tuberculosis: Multidrug-Resistant (MDR-TB) or Rifampicin-Resistant TB (RR-TB).” Retrieved ([https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/tuberculosis-multidrug-resistant-tuberculosis-\(mdr-tb\)](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/tuberculosis-multidrug-resistant-tuberculosis-(mdr-tb))).
- WHO. 2024c. „Tuberculosis. Key Facts.” Retrieved (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>).
- Yayan, Josef, Karl-Josef Franke, Melanie Berger, Wolfram Windisch, and Kurt Rasche. 2024. „Early Detection of Tuberculosis: A Systematic Review.” *Pneumonia (Nathan Qld.)* 16(1):11. doi: 10.1186/s41479-024-00133-z.
- Ye, Wei, Xiaojun Tang, Chu Liu, Chaowei Wen, Wei Li, and Jianxin Lyu. 2017. „Accurate Quantitation of Circulating Cell-Free Mitochondrial DNA in Plasma by Droplet Digital PCR.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409(10):2727–35. doi: 10.1007/s00216-017-0217-x.
- Zhang, Kai, Ruiqing Fu, Rui Liu, and Zhixi Su. 2024. „Circulating Cell-Free DNA-Based Multi-Cancer Early Detection.” *Trends in Cancer* 10(2):161–74. doi: 10.1016/j.trecan.2023.08.010.
- Zhao, Yuanxin, Buhan Liu, Long Xu, Sihang Yu, Jiaying Fu, Jian Wang, Xiaoyu Yan, and Jing Su. 2021. „ROS-Induced MtDNA Release: The Emerging Messenger for Communication between Neurons and Innate Immune Cells during Neurodegenerative Disorder Progression.” *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10(12). doi: 10.3390/antiox10121917.
- Zimmer, Alexandra J., Federica Lainati, Nathaly Aguilera Vasquez, Carole Chedid, Sean McGrath, Andrea Benedetti, Emily MacLean, Morten Ruhwald, Claudia M. Denkinger, and Mikashmi Kohli. 2022. „Biomarkers That Correlate with Active Pulmonary Tuberculosis Treatment Response: A Systematic Review and

- Meta-Analysis.” *Journal of Clinical Microbiology* 60(2):e0185921. doi: 10.1128/JCM.01859-21.
- Zole, Egija, and Renāte Ranka. 2018. „Mitochondria, Its DNA and Telomeres in Ageing and Human Population.” *Biogerontology* 19(3):189–208. doi: 10.1007/s10522-018-9748-6.
- Zole, Egija, and Renāte Ranka. 2019. „Mitochondrial DNA Copy Number and Telomere Length in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Comparison with Whole Blood in Three Different Age Groups.” *Archives of Gerontology and Geriatrics* 83:131–37. doi: 10.1016/j.archger.2019.04.007.