



Monta Madelāne

**Ar endotoksīniem saistīto bioķīmisko
marķieru un fēču mikrobiotas atšķirības
pacientiēm ar HIV un HCV infekciju**

Promocijas darbs zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – veselības un sporta zinātnes

Apakšnozare – infekcijas slimības

Rīga, 2023

Monta Madelāne

ORCID 0000-0003-2950-5435

Ar endotoksīniem saistīto bioķīmisko
marķieru un fēču mikrobiotas atšķirības
pacienti ar HIV un HCV infekciju

Promocijas darbs zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – veselības un sporta zinātnes

Apakšnozare – infekcijas slimības

Promocijas darba vadītāja:

Dr. habil. med. profesore **Ludmila Vīksna**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Promocijas darba zinātniskā konsultante:

Dr. med. asociētā profesore **Oksana Koļesova**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Rīga, 2023

Anotācija

Cilvēka imūndeficīta vīrusa (HIV) un C hepatīta vīrusa (HCV) izraisītas infekcijas kopš to atklāšanas aizvien saglabā aktualitāti. Katru gadu tiek atklāti 1,5 miljoni jauni gan HIV, gan HCV gadījumi (UNAIDS, 2022; WHO, 2022). Progresējošas HIV infekcijas raksturīga pazīme ir hroniska imūnās sistēmas aktivācija, kas tiek saistīta ar mikrobu translokāciju no kuņģa-zarnu trakta, tādējādi ļaujot tur esošo baktēriju vielmaiņas starpproduktiem nonākt kopējā asins cirkulācijā bez klīniski un laboratoriski nosakāmas bakterēmijas. Arī ar HCV inficētiem pacientiem tiek novēroti paaugstināti mikrobu translokācijas rādītāji un tam sekojoša T šūnu aktivācija. Zarnu mikrobiotas sastāva un tā izmaiņu potenciālās cēloņsakarības tiek pētītas daudzu slimību kontekstā. Arī ar HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, novēro mazāku kopējo baktēriju gēnu daudzumu zarnu traktā, mazāku to daudzveidību, kā arī tiek atklātas izmaiņas atsevišķu baktēriju sugu sastāvā – pieaug patogēno baktēriju, bet mazinās t. s. labvēlīgo baktēriju daudzums zarnu traktā. Turklāt tieši ar zarnām saistītajos cilvēka organisma limfoīdajos audos atrodas ap 60–80 % CD4⁺ T limfocītu. HIV infekcijas gadījumā šo limfoīdo šūnu populācija un zarnu mikrobiotas sastāvs būtiski izmainās, kas var ietekmēt tālāku HIV infekcijas progresēšanu. Mikrobiotas izmaiņas traucē zarnu gļotādas barjeras funkcijas, kā rezultātā baktēriju vielmaiņas starpprodukti jeb komponenti vieglāk nokļūst asinsritē un tādējādi stimulē un uztur imūno aktivāciju, kas turpina uzturēt hronisku iekaisuma stāvokli. Arī aknu slimību, t. sk. hroniska C hepatīta vīrusa, gadījumos novēro zarnu mikrobiotas daudzveidības un sastāva izmaiņas. Palielināta zarnu caurlaidība un baktēriju komponentu pārvietošanās no zarnu trakta uz asinsriti arī var būt saistīta ar imūnās sistēmas aktivāciju un progresējošu aknu bojājumu. Lai izprastu zarnu mikrobiotas un mikrobu translokācijas savstarpējo mijiedarbību, nepieciešams izvērtēt fēču mikrobiotas un ar endotoksīniem saistīto mikrobu translokācijas marķieru atšķirības un potenciālo ietekmi uz HIV un HCV infekciju norisi.

Darba mērķis bija noteikt un analizēt ar endotoksīniem saistīto mikrobu translokācijas marķieru un fēču mikrobiotas atšķirības HIV un HCV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, un izvērtēt šo parametru savstarpējo saistību pētījuma grupās.

Pētījumā tika iekļauts 81 pacients, no tiem 28 HIV monoinficēti, 24 HCV monoinficēti un 29 HIV / HCV koinficēti pacienti. Pacientiem tika noteikti mikrobu translokācijas marķieri – šķīstošais CD14 (sCD14), lipoproteīnu saistošais olbaltums (LBP) un anti vielas pret endotoksīna serdes antigēnu (EndoCAb), aknu fibrozes netiešie rādītāji, kā arī tika analizēts fēču mikrobiotas sastāvs un tā daudzveidība.

HCV monoinficētiem pacientiem tika konstatēti zemāki mikrobu translokāciju raksturojošie parametri, salīdzinot ar HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, bet starp HIV monoinficētiem un HIV koinficētiem pacientiem atšķirības netika atklātas.

Fēču mikrobiotas daudzveidība bija lielāka HCV monoinficēto grupā, salīdzinot ar HIV mono un HIV / HCV koinficēto pacientu grupām, starp kurām atšķirības netika novērotas. Kopumā fēču mikrobiotā konstatēta 1651 taksonomiskā vienība, no kurām vairāk nekā 98 % piederēja 10 baktēriju nodalījumiem. Taču dominēja tikai četri no tiem – HIV inficētiem pacientiem *Firmicutes*, *Bacteroidota* un *Proteobacteria*, bet HCV monoinficētiem pacientiem *Firmicutes*, *Bacteroidota* un *Actinobacteriota* nodalījumu baktērijas. Starp pacientu grupām tika konstatētas atšķirības dažādos baktēriju taksonomiskajos līmeņos, tomēr lielākās atšķirības novēroja starp HCV monoinficētiem un HIV mono un HIV / HCV koinficētiem, bet ne starp HIV mono un HIV / HCV koinficēto pacientu grupām. Savukārt baktēriju dzimšu līmenī HIV inficētiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem, pacientiem novēroja *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* un *Lactobacillaceae* lielāku īpatsvaru. Turklāt ar HIV inficēto pacientu mikrobiotā mazākā mērā konstatēja *Clostridia* klasē ietilpstošās baktēriju dzimtas – *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Peptostreptococcaceae* un *Ruminococcaceae*, kā arī *Actinobacteriota* klasei piederošās *Bifidobacteriaceae* dzimtas baktērijas. Atsevišķu baktēriju klašu (*Gammaproteobacteria*, *Coriobacteria*, *Bacilli*, *Desulfovibrionia*) īpatsvaram novēroja saistību ar mikrobu translokācijas marķieriem, kā arī HIV infekcijas aktivitāti raksturojošiem lielumiem (CD4⁺ T šūnas, HIV RNS).

HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem novēroja izteiktāku mikrobu translokāciju nekā HCV monoinficētiem pacientiem, kā arī būtiskākas izmaiņas mikrobiotas daudzveidībā un sastāvā, turklāt atsevišķas baktēriju klases uzrādīja ticamu saistību ar mikrobu translokācijas apmēru HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem.

Atslēgvārdi: endotoksīni, mikrobiota, HIV un HCV infekcija, mikrobu translokācija, fibroze.

Annotation

Differences of Biochemical Endotoxin-Related Markers and Faecal Microbiota in Patients with HIV and HCV Infections

Infections caused by the Human Immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV) have remained relevant since their discovery. Every year, 1.5 million new cases of both HIV and HCV are detected (UNAIDS, 2022; WHO, 2022). A hallmark of progressive HIV infection is chronic immune activation associated with microbial translocation from the gastrointestinal tract, allowing bacterial metabolic components to enter the general circulation without clinically and laboratory detectable bacteraemia. HCV-infected patients also show increased rates of microbial translocation and subsequent T cell activation. The potential causal relationship between the composition of the gut microbiota and its alterations is being investigated in the context of many diseases. HIV-infected patients have lower amount of total bacterial genes and lower bacterial diversity in the intestinal tract compared to healthy individuals, as well as changes in the composition of individual bacterial species, with an increase in pathogenic bacteria and a decrease in beneficial bacteria in the intestinal tract. In addition, about 60–80 % of CD4⁺ T lymphocytes in the human body are located in the gut-associated lymphoid tissues. In HIV infection, the population of these lymphoid cells and the composition of the gut microbiota are significantly altered, which may influence the further progression of HIV infection. The changes in the gut microbiota together with alterations in the barrier function of the intestinal mucosa, may facilitate the entry of bacterial metabolic intermediates or components into the bloodstream, thereby stimulating and sustaining immune activation that continues to perpetuate a chronic inflammatory condition. Changes in the diversity and composition of the gut microbiota are also observed in liver diseases, including chronic viral hepatitis C. Increased intestinal permeability and translocation of bacterial components from the intestinal tract may also be associated with immune activation and progressive liver damage. To understand the interplay between gut microbiota and microbial translocation, it is necessary to assess the differences between the faecal microbiota and endotoxin-related markers of microbial translocation and their potential impact on the course of HIV and HCV infections.

The aim of this study was to identify and analyse differences in endotoxin-associated microbial translocation markers and faecal microbiota in HIV and HCV-monoinfected and HIV / HCV-coinfected patients, and to evaluate the correlations between these parameters in the study groups.

The study included 81 patients, 28 HIV-monoinfected, 24 HCV-monoinfected and 29 HIV / HCV-coinfected. We measured microbial translocation markers such as soluble CD14 (sCD14), lipoprotein binding protein (LBP) and antibodies to endotoxin core antigen (EndoCAb), indirect markers of liver fibrosis, and analysed the composition and diversity of the faecal microbiota.

We found lower microbial translocation parameters in HCV-monoinfected patients compared to HIV-monoinfected and HIV / HCVcoinfected patients, but no differences between HIV-monoinfected and HIV-coinfected patients.

Faecal microbiota diversity was higher in the HCV-monoinfected group compared to the HIV-monoinfected and HIV / HCV-coinfected groups, between which no differences were observed. A total of 1651 taxonomic units were found in the fecal microbiota, of which more than 98 % belonged to 10 bacterial phyla. However, only four of them were predominant: *Firmicutes*, *Bacteroidota* and *Proteobacteria* in HIV-infected patients, and *Firmicutes*, *Bacteroidota* and *Actinobacteriota* in HCV-monoinfected patients. We found differences in different bacterial taxonomic levels between patient groups, but the largest differences were observed between HCV-monoinfected and HIV-monoinfected patients, but not between HIV-monoinfected and HIV / HCV-coinfected patient groups. At the level of bacterial families, a higher representation of *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* and *Lactobacillaceae* was observed in HIV-infected compared to HCV-monoinfected patients. In addition, bacterial families *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Peptostreptococcaceae* and *Ruminococcaceae*, belonging to *Clostridia* class, as well as *Bifidobacteriaceae* family which belongs to *Actinobacteriota* class, were less abundant in the microbiota of HIV-infected patients. Certain bacterial classes (*Gammaproteobacteria*, *Coriobacteria*, *Bacilli*, *Desulfovibrionia*) were associated with markers of microbial translocation as well as HIV infection activity parameters (CD4⁺ T cells, HIV RNA).

HIV-monoinfected and HIV / HCV-coinfected patients showed more pronounced microbial translocation than HCV-monoinfected patients, as well as significant changes in the diversity and composition of microbiota, and certain bacterial classes showed a significant association with the extent of microbial translocation in HIV-monoinfected and HIV / HCV-coinfected patients.

Keywords: endotoxins, microbiota, HIV and HCV infections, microbial translocation, fibrosis.

Saturs

Anotācija	2
Annotation.....	4
Darbā lietotie saīsinājumi.....	8
Ievads	10
Darba aktualitāte	10
Darba mērķis	12
Darba uzdevumi	12
Darba hipotēze	12
Darba novitāte	12
Sadarbības partneri.....	13
Personīgais ieguldījums	13
Ētiskie aspekti	13
Promocijas darba struktūra.....	13
1. Literatūras apskats.....	14
1.1. HIV un HCV aktualitāte	14
1.2. Imūnās sistēmas aktivācija ar HIV inficētiem pacientiem	15
1.3. Cilvēka mikrobiota un mikrobioms	18
1.3.1. Zarnu mikrobiota un mikrobioms	21
1.3.2. Zarnu mikrobiota un imūnā sistēma	24
1.3.3. Zarnu mikrobioms un predispozīcija slimībām	25
1.3.4. HIV infekcijas ietekme uz fēču mikrobiotas kompozīciju un daudzveidību un tā ietekme uz imūno aktivāciju	26
1.3.5. Pretvīrusu terapijas ietekme uz mikrobu translokāciju un fēču mikrobiotu.....	31
1.3.6. Aknu slimības un zarnu mikrobiota.....	32
1.3.7. HCV infekcijas ietekme uz fēču mikrobiotas kompozīciju un daudzveidību	34
1.3.8. HIV un HCV koinfekcijas ietekme uz fēču mikrobiotas kompozīciju un daudzveidību	35
1.4. Mikrobu translokācija.....	35
1.4.1. Mikrobu translokācijas marķieri	38
1.4.2. Lipopolisaharīds (endotoksīns).....	39
1.4.3. Lipopolisaharīdus saistošais olbaltums.....	40
1.4.4. Baktēriju ribosomālais 16S rRNS.....	40
1.4.5. CD14 un šķīstošais CD14	40
1.4.6. EndoCAb antivielas	42
1.4.7. Mikrobu translokācija un aknu slimības	42
1.4.8. Mikrobu translokācijas un HIV ietekme uz aknu slimības progresēšanu ar HIV / HCVkoinficētiem pacientiem	44
1.5. Aknu fibrozes un apoptozes marķieri	48
1.5.1. Aknu fibrozes neinvazīvie marķieri.....	48
1.5.2. Aknu šūnu apoptozes rādītāji.....	49
1.5.3. Citokeratīns 18	50
1.6. Mikrobu translokācija un mikrobiota HIV un HCV pacientiem un to loma imūnās aktivācijas uzturēšanā.....	50
2. Materiāli un metodes.....	52
2.1. Pētījuma dizains.....	52
2.2. Materiālu iegūšana un uzglabāšana	53

2.2.1.	Asins paraugu iegūšana un uzglabāšana	53
2.2.2.	Fēču paraugu iegūšana un uzglabāšana	53
2.3.	Laboratorisko parametru noteikšanas metodes.....	53
2.3.1.	HIV vīrusa slodzes noteikšana.....	53
2.3.2.	CD4 ⁺ un CD8 ⁺ T limfocītu noteikšana	54
2.3.3.	Lipopolisaharīdu saistošā olbaltuma noteikšana.....	54
2.3.4.	Endotoksīna serdes antivielu (EndoCAb) noteikšana.....	55
2.3.5.	Šķīstošā sCD14 noteikšana	55
2.3.6.	Citokeratīna 18 fragmenta M30 noteikšana	56
2.3.7.	Hematoloģiskie parametri	56
2.3.8.	Bioķīmisko parametru noteikšana.....	57
2.3.9.	FIB-4 indeksa noteikšana.....	57
2.3.10.	Baktēriju frakcijas iegūšana no fēču paraugiem	57
2.4.	16S rRNS gēna amplikonu sagatavošana un sekvencēšana	58
2.5.	Sekvenču analīze	60
2.6.	Datu apstrādes statistiskās metodes	61
3.	Rezultāti	62
3.1.	Pacientu raksturojums.....	62
3.2.	Bioķīmiskie mikrobu translokācijas marķieri.....	65
3.3.	Aknu apoptozes un fibrozes rādītāji	66
3.4.	Rādītāju savstarpējās saistības	69
3.4.1.	Vecuma, ķermeņa masas indeksa, HIV vīrusa slodzes un dažādu asins šūnu skaita saistības kopējā pacientu grupā.....	69
3.4.2.	Aknu fibrozes indeksa, mikrobu translokācijas, hepatocītu apoptozes un fēču mikrobiotas daudzveidības (Šenona indeksa) parametru savstarpējās saistības kopējā pacientu grupā.....	70
3.4.3.	Savstarpējas saistības starp parametriem HIV pacientu grupā	72
3.4.4.	Savstarpējas saistības starp parametriem HIV / HCV koinficēto pacientu grupā	72
3.4.5.	Savstarpējas saistības starp parametriem HCV monoinficēto pacientu grupā	73
3.4.6.	Parciālās Spīrmena korelācijas kopējā pacientu grupā	73
3.5.	Fēču mikrobiotas analīze	75
3.5.1.	Fēču mikrobiotas relatīvais daudzums un daudzveidība	75
3.5.2.	Fēču mikrobiotas sastāvs	77
3.6.	Fēču mikrobiotas daudzveidības un bioķīmisko marķieru asociācija	87
4.	Diskusija.....	90
	Secinājumi	107
	Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu	108
	Izmantotās literatūras saraksts.....	110
	Pateicības.....	124
	Pielikumi	125
1.	pielikums. Atšķirības parametros pacientiem ar HIV monoinfekciju, HIV / HCV koinfekciju un HCV infekciju	126
2.	pielikums. Ētikas komitejas atļauja.....	127
3.	pielikums. RAKUS Zinātnes daļas atzinums	128

Darbā lietotie saīsinājumi

Abreviatūra	Nosaukums latviešu valodā	Nosaukums angļu valodā
AIDS	iegūtais imūndeficīta sindroms	<i>Acquired Immune Deficiency syndrome</i>
ALT	alanīnaminotransferāze	<i>Alanine aminotransferase</i>
ART	antiretrovirālā terapija	<i>Antiretroviral therapy</i>
AST	aspartātaminotransferāze	<i>Aspartate aminotransferase</i>
ASV	Amerikas Savienotās Valstis	<i>United States of America</i>
CCR5 ⁺	C-C hemokīna receptors-5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>
CD4 ⁺	T līdzētājšūnas	<i>T helper cell</i>
CD8 ⁺	citotoksiskie T limfocīti, galētājšūnas	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
CD38 ⁺	aktivētie T limfocīti	<i>Activated T lymphocytes</i>
CK18-M30	citokeratīna 18 neoepitops	<i>Cytokeratin 18 neoepitope</i>
DAA	tiešas darbības pretvīrusu medikamenti	<i>Direct acting antivirals</i>
DNS	dezoksiribonukleīnskābe	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
16S rRNS	16S ribosomālā ribonukleīnskābe	<i>16S ribosomal ribonucleic acid</i>
ELISA	imūnfermentatīvā analīze	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i>
EndoCAb	endotoksīnu serdes antivielas	<i>Endotoxin core antibodies</i>
FABP	tauskābes saistošais olbaltums	<i>Fatty Acid Binding Protein</i>
FIB-4	aknu fibrozes indekss	<i>Liver fibrosis index</i>
g	paātrinājuma konstante	<i>Acceleration constant</i>
GALT	ar gļotādu asociētie limfātiskie audi	<i>Gut associated lymphoid tissues</i>
HBV	B hepatīta vīruss	<i>Hepatitis B virus</i>
HCC	hepatocelulāra karcinoma	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
HCV	C hepatīta vīruss	<i>Hepatitis C virus</i>
HCV RNS	C hepatīta vīrusa ribonukleīnskābe	<i>Hepatitis C virus Ribonucleic acid</i>
HIV	cilvēka imūndeficīta vīruss	<i>Human Immunodeficiency virus</i>
HIV RNS	cilvēka imūndeficīta vīrusa ribonukleīnskābe	<i>Human Immunodeficiency virus Ribonucleic acid</i>
HLA	cilvēka leikocītu antigēns	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN- γ	interferons- γ (gamma)	<i>Interferon-γ</i>
IL	interleikīns	<i>Interleukin</i>
IQR	starpkvartiļu amplitūda	<i>Interquartile range</i>
ĶMI	ķermeņa masas indekss	<i>Body mass index</i>
LAL	<i>Limulus</i> amebocītu lizāts	<i>Limulus amoebocyte lysate</i>

LBP	lipopolisaharīdus saistošais olbaltums	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	lipopolisaharīds	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAMPs	ar mikrobiem saistītie molekulārie modeļi	<i>Microbial-associated molecular patterns</i>
mCD14	membrānu CD14	<i>Membrane CD14</i>
MD	mieloīdā diferencēšana	<i>Myeloid differentiation</i>
mg	miligrami	<i>Miligrams</i>
ml	mililitri	<i>Mililitres</i>
MSM	vīrieši, kuriem ir sekss ar vīriešiem	<i>Men who have sex with men</i>
ng	nanogrami	<i>Nanograms</i>
nm	nanometri	<i>Nanometrs</i>
NOD	nukleotīdus saistošais oligomerizācijas domēna receptors	<i>Nucleotide-binding Oligomerization domain-like receptors (NOD-like receptors)</i>
OTU	funkcionālā taksonomiskā vienība	<i>Operational taxonomic unit</i>
pg	pikogrami	<i>Picograms</i>
PCoA	galvenā koordinātu analīze	<i>Principal Coordinate analysis</i>
PĶR	polimerāzes ķēdes reakcija	<i>Polymerase chain reaction</i>
PVO	Pasaules Veselības organizācija	<i>World Health Organisation</i>
RAKUS	Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca	<i>Riga East University Hospital</i>
sCD14	šķīstošais CD14	<i>Soluble CD14 (cluster of differentiation)</i>
SIV	pērtiķu imūndeficīta vīruss	<i>Simian Immunodeficiency virus</i>
TNF	audzēja nekrozes faktors	<i>Tumor necrosis factor</i>
TLR	Toll-līdzīgais receptors	<i>Toll like receptor</i>
U	vienības	<i>Units</i>
μg	mikrogrami	<i>Micrograms</i>
μl	mikrolitri	<i>Microlitres</i>

Ievads

Darba aktualitāte

Cilvēka imūndeficīta vīrusa (HIV) un C hepatīta vīrusa (HCV) izraisītas infekcijas aizvien ir globāla un pieaugoša veselības aprūpes problēma, lai gan ir labi zināmi šo vīrusu transmisijas veidi un tiek atklāti jauni pretvīrusu līdzekļi. Tās ir hroniski noritošas slimības ar plašu izplatību un būtisku ietekmi uz cilvēka veselību un dzīves kvalitāti. Pēc Pasaules Veselības organizācijas (PVO) aplēsēm, kopš HIV infekcijas pandēmijas sākuma vairāk nekā 84 miljoni cilvēku ir bijuši inficēti ar HIV. 2021. gadā pasaulē ar HIV infekciju bija inficēti 38,4 (33,9–43,8) miljoni cilvēku, bet nomira 650 tūkstoši, savukārt ar HCV pasaulē ir inficēti aptuveni 58 miljoni, bet 2019. gadā no HCV infekcijas izraisītām komplikācijām nomira vismaz 290 000–400 000 cilvēku. Turklāt katru gadu tiek atklāts 1,5 miljoni jaunu gan HIV, gan HCV gadījumu (UNAIDS, 2022; WHO, 2022).

Tā kā abām infekcijām ir līdzīgi transmisijas ceļi, aptuveni 25 % ar HIV inficēto vienlaikus tiek atrasta arī HCV infekcija (WHO, 2022), kā dēļ liela vērība pasaulē veltīta abu šo vīrusu – HIV un HCV – mijiedarbības izpētei. HIV / HCV koinfekcijas skarto personu risks saslimt ar cirozi un aknu slimības izraisītām komplikācijām ir augstāks nekā cilvēkiem bez HIV infekcijas (Lo Re et al., 2014). Ir zināms, ka ar HIV inficētiem pacientiem aknu slimības progresē straujāk, ātrāk attīstās aknu ciroze, turklāt aknu slimības ir viens no biežākajiem ne-AIDS nāves cēloņiem ar HIV inficētiem pacientiem (Morlat et al., 2014; Abutaleb & Sherman, 2018). Ar aknām saistītu komplikāciju risku pacientiem ar hronisku HCV infekciju ietekmē vairāki faktori, tostarp ar lielāku vecumu inficēšanās brīdī, lielu alkohola patēriņu, aptaukošanos, zarnu mikrobiotas izmaiņām un cilvēka imūndeficīta vīrusa koinfekciju (Tripathi et al., 2018).

Progresējošas HIV infekcijas raksturīga pazīme ir hroniska imūnā aktivācija, kas izpaužas ar poliklonālo B šūnu aktivāciju, paātrinātu T limfocītu apriti, kā arī ar paaugstinātiem iekaisuma citokīnu un hemokīnu līmeņiem serumā (Brenchley et al., 2006; Hunt et al., 2014; Merlini et al., 2021). Pirms desmit gadiem mikrobu translokācija tika aprakstīta kā iespējamais imūnās aktivācijas cēlonis HIV pacientiem (Sandler & Douek, 2012). Šobrīd HIV infekcijas progresēšana tiek saistīta ar pastāvīgu imūnās sistēmas aktivāciju, ko lielā mērā izraisa mikrobu translokācija no kuņģa-zarnu trakta, tādējādi ļaujot tur esošo baktēriju starpproduktiem nonākt kopējā asins cirkulācijā bez klīniski un laboratoriski nosakāmas bakterēmijas (Epeldegui et al., 2018). Ir pierādīts, ka mikrobu translokācija samazinās pacientiem, kas saņem antiretrovirālo terapiju, tomēr tā saglabājas augstākā līmenī, salīdzinot ar HIV neinficētām personām (Marchetti, Tincati & Silvestri, 2013; Merlini et al., 2021).

Aptuveni 60–80 % $CD4^+$ T šūnu cilvēka organismā atrodas ar zarnām saistītajos limfoīdajos audos. Šo šūnu populācija un zarnu mikrobiotas sastāvs tiek būtiski ietekmēts HIV infekcijas gadījumā, bet tā atjaunošana ir nepilnīga, pat lietojot antiretrovirālo terapiju (Zilberman-Shapira et al., 2016; Mingjun et al., 2022). Ar HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, novēro mazāku kopējo baktēriju gēnu daudzumu zarnu traktā, kā arī mazāku to daudzveidību (Guillen et al., 2018; Ellis et al., 2021; Mingjun et al., 2022). Šīs izmaiņas korelē ar dažādiem faktoriem, t. sk. ar $CD4^+$ T šūnu skaitu, blakusslimībām un saņemtu HIV ārstēšanu (Guillen et al., 2018). Ar HIV inficētiem pacientiem izmaiņas tiek novērotas zarnu mikrobiotā arī atsevišķu baktēriju sugu sastāvā, jo īpaši slimībai progresējot, – pieaug patogēno baktēriju skaits, bet mazinās t. s. labvēlīgo baktēriju skaits zarnu traktā (Kelley et al., 2017; Neff et al., 2018).

Ar HIV inficēto personu zarnu mikrobiotas sastāva un funkcijas izmaiņas ne tikai netieši ietekmē HIV infekcijas norisi, bet arī tieši var sekmēt dažādas ar slimību saistītās izpausmes. Kā viena no iespējamām mikrobiotas izmaiņu radītājam sekām ir zarnu gļotādas barjeras funkcijas traucējumu veicināšana, kā rezultātā baktēriju komponenti vieglāk nokļūst asinsritē un atkal tiek stimulēta un uzturēta imūnā aktivācija, kas turpina uzturēt hronisku iekaisuma stāvokli (Zilberman-Schapira et al., 2016; Neff et al., 2018; Mingjun et al., 2022).

Mikrobu translokācijas inducētas sistēmiskās iekaisuma reakcijas ietekme ir pētīta arī ar HCV inficētiem pacientiem (Sandler et al., 2011; Sacchi et al., 2015), norādot uz paaugstinātiem mikrobu translokācijas marķieriem un tam sekojošu T šūnu aktivāciju (Sacchi et al., 2015; Lattanzi et al., 2018).

Aknu slimību gadījumos novēro zarnu mikrobiotas daudzveidības un sastāva izmaiņas, ko uztur nepārtraukta aknu-zarnu ass savstarpējā mijiedarbība (Tripathi et al., 2018; Albillos, de Gottardi & Rescigno, 2020). Šajā kontekstā palielināta zarnu caurlaidība un disbioze, kas izraisa baktēriju komponentu pārvietošanos, arī varētu būt saistīta ar imūnsistēmas aktivāciju, un tā var palielināt aknu bojājumus (Marchetti et al., 2012). Līdz ar to zarnu disbioze ir saistīta ne tikai ar aknu slimību progresēšanu, bet arī ar hroniskas aknu slimības radītām komplikācijām (Tripathi et al., 2018). Arī ar HCV inficēto personu vidū tiek aprakstītas izmaiņas zarnu mikrobiotas sastāvā, kuras variē atbilstoši slimības smaguma pakāpei (Inoue et al., 2018; Heidrich et al., 2018).

Pēdējos gados pētniecībā liela uzmanība tiek veltīta zarnu mikrobiotas sastāvam un tā izmaiņām, tā ietekmei uz mikrobu translokāciju un imūnās sistēmas aktivāciju. Mikrobu translokācijas marķieru nozīme un saimniekorganisma dažādie atbildes procesi tiek pētīti HIV infekcijas iznākuma prognozēšanā, kā arī ar mērķi nākotnē spēt iedarboties uz kādu no specifiskajiem patoģenēzes posmiem un apturēt vīrusu izplatību.

Tomēr vēl aizvien nav pilnībā skaidrs, kas stimulē infekciju straujāku norisi, un / vai un kāda ir zarnu mikrobiotas loma hroniska iekaisuma uzturēšanā, jo īpaši HIV / HCV koinficētiem pacientiem. Līdz ar to ir nepieciešams padziļināt izpratni par zarnu mikrobiotas un mikrobu translokācijas savstarpējo mijiedarbību un ietekmi uz HIV un HCV infekciju norisi.

Darba mērķis

Noteikt un analizēt ar endotoksīniem saistīto bioķīmisko mikrobu translokācijas marķieru un fēču mikrobiotas atšķirības ar HIV un HCV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, un izvērtēt šo parametru savstarpējo saistību pētījuma grupās.

Darba uzdevumi

1. Noteikt mikrobu translokācijas marķierus pacientu plazmā un izvērtēt šo parametru atšķirības starp pacientu grupām.
2. Noteikt aknu fibrozes marķierus pacientu plazmā un izvērtēt šo parametru atšķirības starp pacientu grupām.
3. Analizēt fēču mikrobiotas atšķirības pacientu grupās, izvērtējot tās daudzveidību un baktēriju kopējo gēnu DNS daudzumu fēcēs.
4. Noteikt baktēriju sugu īpatsvara atšķirības fēču mikrobiotā starp pacientu grupām.
5. Noteikt fēču mikrobiotas savstarpējo saikni ar mikrobu translokācijas marķieriem un aknu fibrozes rādītājiem.

Darba hipotēze

Bioķīmiskie ar mikrobu translokāciju saistītie un aknu fibrozes marķieri ir augstāki pacientiem ar HIV un HCV koinfekciju, salīdzinot ar HIV un HCV monoinficētiem pacientiem, un tie korelē ar mikrobiotu raksturojošiem lielumiem.

Fēču mikrobiota ir atšķirīga pacientiem ar HIV un HCV monoinfekciju un HIV / HCV koinfekciju.

Darba novitāte

Ar HIV inficētu pacientu fēču mikrobiota pasaulē pirmoreiz raksturota 2006. gadā, un turpmākajos gados, attīstoties pētniecības metodoloģijai, pakāpeniski pieaugusi arī kopējā izpratne par mikrobiotas lomu dažādu slimību norisē. Arī aknu slimību, t. sk. C hepatīta vīrusa, gadījumos ir aprakstītas izmaiņas fēču mikrobiotā, tomēr joprojām rodami tikai atsevišķi pētījumi par fēču mikrobiotas īpatnībām ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem.

Fēču mikrobiotas pētniecība Latvijā kopumā ir sākusies nesen, un ir ļoti ierobežots datu apjoms par mikrobiotas atšķirībām noteiktās pacientu grupās.

Šis ir mums zināmais pirmais pētījums Latvijā, kur tiek salīdzināta fēču mikrobiota ar HIV un HCV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, turklāt arī kontekstā ar mikrobu translokācijas parametriem.

Sadarbības partneri

Bioķīmisko un klīnisko parametru noteikšana tika veikta Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas stacionāra "Gaiļezers" laboratorijā. Fēču mikrobiotas testēšana tika veikta Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Laboratorijas dienesta sekvencēšanas daļā.

Personīgais ieguldījums

Darba autore ir veikusi zinātnisko un klīnisko plānošanu, t. sk. pacientu atlasu un pētāmo rādītāju izvēli. Informējusi pacientus par pētījumu un ieguvusi to piekrišanu dalībai pētījumā. Nodrošinājusi izmeklējumu veikšanai nepieciešamo materiālo resursu piesaisti un loģistiku, piedalījies bioķīmisko analīžu noteikšanā un novērtēšanā. Apkopojusi, analizējusi un apstrādājusi iegūtos datus, tostarp izmantojot statistiskās datu analīzes metodes. Ir sagatavojusi zinātniskās publikācijas. Darba autore ir sarakstījusi šo darbu.

Ētiskie aspekti

Pētījums tika veikts saskaņā ar Helsinku deklarācijas ētiskajiem aspektiem, kā arī pētījumam tika saņemts Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Atbalsta fonda Medicīnisko un biomedicīnisko pētījumu ētikas komitejas atzinums Nr. 6-A/16 (05.05.2016.), kā arī Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Zinātnes daļas apliecinājums Nr. AP- ZDA-16/88 (08.06.2016.).

Promocijas darba struktūra

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā. Tas izklāstīts piecās nodaļās: "Literatūras apskats", "Materiāli un metodes", "Rezultāti", "Diskusija" un "Secinājumi". Promocijas darba apjoms ir 128 lappuses, darbā ir 12 tabulas un 21 attēls. Literatūras saraksts sastāv no 235 avotiem.

1. Literatūras apskats

1.1. HIV un HCV aktualitāte

Cilvēka imūndeficīta vīrusa (HIV) infekcija joprojām ir nopietna globāla sabiedrības veselības problēma, kas līdz šim prasījusi vismaz 40,1 (33,6–48,6) miljonu dzīvību. Lai arī no jauna inficēto gadījumu skaits pēdējos 10 gados ir sarucis, tomēr 2021. gadā tika reģistrēti 1,5 miljoni pirmreizēji inficētu cilvēku (UNAIDS, 2022; PVO, 2022). Neskatoties uz zinātnes progresu, vēl aizvien HIV infekcija nav izārstējama, tomēr, pateicoties augsti aktīvai antiretrovirālajai terapijai (ART), slimība ir vadāma un pacienti var dzīvot ilgi un ar saglabātu dzīves kvalitāti.

Pēc Slimību profilakses un kontroles centra datiem, Latvijā 2021. gadā tika atklāti 212 jauni HIV infekcijas gadījumi, bet 39 pacientiem tika konstatēts iegūtā imūndeficīta sindroms (AIDS) (SPKC, 2022). HIV infekcija Latvijā pirmo reizi diagnosticēta 1987. gadā, un, tāpat kā citur pasaulē, tā sākotnēji tika atklāta homoseksuāliem vīriešiem. Sākoties HIV infekcijas izplatībai intravenozo narkotiku lietotāju vidū, ļoti strauji pieauga ar HIV inficēto cilvēku skaits, vislielāko gada laikā diagnosticēto skaitu sasniedzot 2001. gadā, kad tika reģistrēti 807 jauni HIV gadījumi. Kopā Latvijā līdz 2021. gada beigām reģistrēti 8433 HIV pacienti, no tiem 2223 AIDS stadijā, bet 2450 miruši (SPKC, 2022). Tā kā statistikas datus apkopot tikai reģistrētie gadījumi, tiek lēsts, ka inficētība ar HIV Latvijā ir vismaz 1,5 reizes augstāka.

HIV infekcija tiek pārnesta no cilvēka uz cilvēku ar asinīm, izdalījumiem no dzimumorgāniem un ar mātes pienu. HIV infekcijai var izšķirt trīs stadijas: akūta, latentā un AIDS. Akūtā stadijā HIV diagnosticē mazāk nekā 10 % gadījumu, un, tā kā slimība ilgstoši var noritēt bez simptomiem, vairums pacientu tiek diagnosticēti novēloti – nereti tikai AIDS stadijā. Latvijā izmanto Eiropā pieņemto klīnisko HIV stadiju klasifikāciju, kas balstās uz pacienta CD4⁺ T šūnu skaitu un diagnosticētām HIV asociētām slimībām (SPKC, 2022).

C hepatīta vīruss (HCV) izraisa gan akūtu, gan hronisku infekciju. Akūts C hepatīta vīruss visbiežāk norit asimptomātiski, bet līdz 80 % gadījumu tas pāriet hroniskā formā. Pēc Pasaulē Veselības organizācijas (PVO) datiem, 2019. gadā pasaulē hronisks HCV bija 58 miljoniem cilvēku, turklāt lielai daļai šī slimības forma sākotnēji noris asimptomātiski, kā rezultātā ārstēšana bieži ir novēlota vai netiek uzsākta vispār. HCV infekcijai progresējot, 20–30 % neārstētu pacientu 20 gadu laikā attīstās aknu fibroze un tam sekojoši ciroze, bet 1–4 % hepatocelulāra karcinoma (HCC) (Thrift, El-Seraq & Kanwal, 2017; WHO, 2022).

Pēdējos 10 gados hroniska HCV ārstēšanas iespējas ir būtiski uzlabojušās, kopš praksē ir ieviesti tiešas darbības pretvīrusu medikamenti (angļu valodā – *direct acting antivirals*, DAA). Kopējais terapijas kursa ilgums parasti ir salīdzinoši neilgs, 8–24 nedēļas, ārstēšanas ilgumu nosaka gan HCV genotips, gan slimības attīstības stadija. Pēc DAA terapijas vairāk nekā 95 % pacientu izdodas panākt noturīgu virusoloģisku atbildi, kas nozīmē nenosakāmu HCV RNS asinīs 12 nedēļas pēc terapijas pabeigšanas (Ioannou & Feld, 2019). Tomēr, neskatoties uz veiksmīgu vīrusa eradikāciju no organisma, daļai pacientu saglabājas paaugstināts risks HCC attīstībai (Hayes et al., 2018). Hroniska C hepatīta vīrusa pacientiem kā būtiskākie riska faktori aknu slimības progresēšanai jāmin: vecums diagnozes noteikšanas brīdī, pastiprināta alkohola lietošana, aptaukošanās, zarnu mikrobiotas stāvoklis, kā arī koinfekcija ar HIV vīrusu (Tripathi et al., 2018; Chuaypen et al., 2021).

HCV izplatās līdzīgi HIV infekcijai – pārsvarā ar asinīm, taču inficēšanās iespējama arī ar asins daļiņas saturošiem bioloģiskajiem šķidrumiem, vertikāli – no mātes bērnam, kā arī seksuālu kontaktu ceļā (Lee et al., 2014). Tā kā abām infekcijām ir līdzīgi transmisijas ceļi, HIV pacientiem hronisku HCV infekciju konstatē 10–30 % (Macias et al., 2009), turklāt ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem ir augstāks risks aknu cirozes un komplikāciju attīstībai nekā pacientiem bez HIV vīrusa infekcijas (Lo Re et al., 2014; Virseda-Berdices et al., 2022). HIV infekcija nozīmīgi pasliktina jau esošas aknu slimības stāvokli un veicina tās progresēšanu, savukārt HCV ietekme uz HIV infekciju nav skaidri pierādīta, tomēr zināms, ka ar HIV un HCV koinficētiem pacientiem ir augstāks nāves risks, salīdzinot ar monoinficētiem pacientiem (Ingiliz & Rockstroh, 2015). HCV eradikācija ir saistīta ar aknu un ārpusaknu komplikāciju skaita mazināšanos, kā arī dzīves kopējās kvalitātes uzlabošanu (Ioannou & Feld, 2019). Arī HIV terapijai ir pierādīta loma aknu fibrozes attīstības kavēšanā (Macias et al., 2009; Ingiliz & Rockstroh, 2015).

1.2. Imūnās sistēmas aktivācija ar HIV inficētiem pacientiem

Specifiska HIV infekcijas pazīme ir progresējošs CD4⁺ T limfocītu zudums asinīs, limfoīdajos orgānos un gļotādās. HIV infekcija sākas ar akūtu virēmiju un strauju CD4⁺ T šūnu mazināšanos ar gļotādu asociētajos limfātiskajos audos (GALT), īpaši zarnu traktā (Vasallo et al., 2012; Marchetti, Tincati & Silvestri, 2013). Tomēr HIV vīrusa spēja sagraut CD4⁺ T limfocītus izolēti nevar pilnībā izskaidrot slimības attīstības gaitu, jo HIV infekcijas progresēšana veidojas kompleksi, mijiedarbojoties vīrusam un saimniekorganismam, kas noved pie hroniskas imūnās sistēmas aktivācijas un nozīmīgas T šūnu homeostāzes sagraušanas (Marchetti, Tincati & Silvestri, 2013), kas savukārt izraisa HIV infekcijas progresēšanu līdz iegūta imūndeficīta sindromam (AIDS), negatīvi ietekmē CD4⁺ šūnu rekonstitūciju, kā arī ir

nozīmīgs papildu faktors neinfekciozu komplikāciju attīstībā (Brenchley et al., 2006; Jiang et al., 2009).

Pārejot no akūtas uz hronisku HIV infekcijas fāzi, pateicoties slimnieka iegūtajai imūnajai sistēmai, HIV vīrusa replikācija mazinās, bet tā netiek pilnībā apturēta, kā rezultātā $CD4^+$ T šūnu skaits pakāpeniski samazinās (Marchetti, Tincati & Silvestri, 2013), turklāt $CD4^+$ T šūnu skaita mazināšanās ātrums ir atkarīgs gan no HIV RNS daudzuma asinīs, gan no vīrusa asociētās imūnās aktivācijas apjoma. Līdz ar to HIV infekcijas progresēšana ir saistīta ne tikai ar $CD4^+$ T limfocītu pakāpenisku izsīkumu, bet arī ar hronisku imūno aktivāciju.

Pastāv vairāki molekulārie un šūnu mehānismi, ar kuru palīdzību HIV infekcija var izraisīt ģeneralizētu imūnās sistēmas aktivāciju. Starp tiem jāmin HIV replikācija, vīrusa proteīnu imūnmodulējošā ietekme un imūnā atbilde uz vīrusu, kā arī uz citu infekciju reaktivāciju, zarnu gļotādas integritātes zudums ar sekojošu mikrobu translokāciju, izmainīts $CD4^+$ T šūnu apakšgrupu līdzsvars un palielināta proiekaisuma molekulu ražošana. Būtiski, ka katrs mehānisms var ietekmēt citus, tā radot nekontrolētu pozitīvu atgriezenisko saiti, kas veicina HIV infekcijas progresēšanu (Deeks et al., 2004; Paiardini & Müller-Trutwin, 2013).

Epple ar kolēģiem, pētot kuņģa-zarnu trakta gļotādas aizsargfunkciju, konstatēja, ka HIV infekcija inducē gļotādas barjeras defektu, nomācot gļotādas $CD4^+$ T šūnas, kā arī inducē bārkstiņu atrofiju un bojā olbaltumvielu sastāvu blīvo savienojumu vietās (angļu valodā – *tight junction*). Šie bojājumi tiek nodrošināti galvenokārt ar interleikīna (IL) 2, IL-4 un audzēja nekrozes faktora (TNF) alfa palīdzību (Epple et al., 2009).

Pētījumos, kas veikti gan ar pērtiķu imūndeficīta vīrusu (angļu valodā – *simian immunodeficiency virus*, SIV) inficētiem makakiem, gan ar HIV inficētiem cilvēkiem, tika pierādīts, ka imūnās sistēmas disfunkcija sākas agrīni – jau dažas nedēļas pēc vīrusa iekļūšanas organismā. Vīrusa tiešās un netiešās citopātiskās iedarbības rezultātā, tam izplatoties pa gļotādām, strauji sarūk gļotādu $CCR5^+$ $CD4^+$ T šūnu skaits, kā arī notiek, $CD8^+$ T šūnu veicināta, inficēto $CD4^+$ T šūnu iznīcināšana, kas īpaši strauji norisinās kuņģa-zarnu traktā, salīdzinot ar perifēro asinsriti (Cao et al., 1996; Leonardo et al., 2002). Tas nozīmē, ka HIV infekcijas pirmajās nedēļās notiekošā straujā $CD4^+$ T limfocītu skaita mazināšanās kuņģa-zarnu traktā noved pie gļotādas imūnās sistēmas aizsargsistēmas bojājuma (Brenchley et al., 2006). Tā kā tiek bojāta gan zarnu epitēlija mikrovide, gan vienlaicīgi notiek arī imūnās komponentes bojājums, tas noved pie pastāvīgas imūnās aktivācijas hroniskā HIV infekcijas fāzē (Brenchley, Price & Douek, 2006).

Pētījumos ar SIV inficētiem primātiem, kas ir dabīgie SIV infekcijas saimnieki, bet kam šī infekcija ir nepatogēna, tika konstatēts, ka akūtas infekcijas laikā tiem novēro būtisku CD4⁺ T šūnu samazinājumu GALT audos (Gordon et al., 2008), tomēr šis CD4⁺ šūnu nomākums nebija asociēts ar nozīmīgu mikrobu translokāciju un imūno aktivāciju. Turklāt šiem primātiem CD4⁺ šūnu zudums neprogresēja un laika gaitā daļēji atjaunojās (Paiardini et al., 2008). Šie atklājumi ļāva izteikt pieņēmumu, ka zarnās esošo CD4⁺ T šūnu zudums ir nozīmīgs, taču izolēti nepietiekams faktors, lai iniciētu mikrobu translokāciju.

Poliklonālu B šūnu aktivācija tika aprakstīta kā viena no pirmajām patoloģiskajām imunoloģiskajām izpausmēm HIV pacientiem. Turpmākie pētījumi pierādīja palielinātu T šūnu apriti (angļu valodā – *turnover*), palielinātu aktivēto T limfocītu skaitu un paaugstinātus seruma iekaisīgo citokīnu un hemokīnu līmeņus (Brenchley et al., 2006; Sandler et al., 2011). HIV infekcija izraisa T šūnu aktivāciju, kas manifestējas ar palielinātu atsevišķu fenotipisko marķieru, kā HLA-DR un CD38, ekspresiju galvenokārt uz CD8⁺ T limfocītiem (Kestens et al., 1993; Lu et al., 2021). Savukārt biežāka vai lielāka CD38 ekspresija uz CD8⁺ T šūnām korelē ar ātrāku CD4⁺ T šūnu skaita mazināšanos (Sandler et al., 2011; Lederman et al., 2011; Lu et al., 2021) un biežāka CD38 un HLA-DR esamība starp CD4⁺ un CD8⁺ T šūnām saistīta ar zemāku CD4⁺ šūnu atjaunošanos pēc antiretrovirālās terapijas (ART) uzsākšanas (Hunt et al., 2003), bet augstāka CD38 ekspresija uz CD4⁺ un CD8⁺ T šūnām ir prognostisks faktors īsākai dzīvildzei neatkarīgi no plazmas HIV RNS līmeņa (Giorgi et al., 1999; Paiardini & Müller-Trutwin, 2013).

Antiretrovirālā terapija (ART), neskatoties uz pilnīgu HIV replikācijas nomākšanu, pilnībā nevar apturēt imūnās aktivācijas procesus un slimības progresēšanu. Pacientiem, kas ir veiksmīgi ārstēti ar ART, novēro būtisku atšķirību dzīvildzē, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem (Marcus et al., 2016; Teeraananchai et al., 2017), tomēr šis fakts biežāk tiek konstatēts pacientiem, kas ART terapiju uzsāka vēlīnā slimības stadijā, vai arī pacientiem, kuriem nav laba imunoloģiskā atbilde uz terapiju – nenotiek CD4⁺ T šūnu atjaunošanās, neskatoties uz saņemto ārstēšanu (IeDEA and COHERE, 2018).

Kā novēroja *Hunt* ar kolēģiem, pacientiem, kas saņēma ART, saglabājās augsti imūnās aktivācijas rādītāji un tie bija prognostiski marķieri augstākai mirstībai (Hunt et al., 2014). Arī *Sandler* ar kolēģiem konstatēja, ka pacientiem ar HIV infekciju imūnā aktivācija korelē ar slimības progresēšanu (Sandler et al., 2011). Neskatoties uz veiksmīgu virusoloģisko kontroli, daļai pacientu, kas saņem ART, celulārā imunitāte netiek pilnībā atjaunota. Kā viens no iemesliem sliktākai imūnajai atbildes reakcijai ir mikrobu translokācijas ietekme uz CD4⁺ T šūnu atjaunošanos (Baroncelli et al., 2009; Jiang et al., 2009). *Lederman* ar kolēģiem konstatēja, ka pacientiem, kuriem terapijas laikā ar ART novēroja imunoloģisku neveiksmi,

bija augstāki imūnās aktivācijas rādītāji kā sekas mikrobu produktu izraisītam iekaisumam. Šiem pacientiem novēroja zemāku CD4⁺ T limfocītu skaitu, kā arī palielinātu CD4⁺ šūnu apriti, salīdzinot ar veselīgiem cilvēkiem vai ar HIV inficētiem pacientiem ar labu imunoloģisko atbildi uz terapiju. Pacientiem, kuriem, uzsākot ārstēšanu, bija augstāks CD4⁺ T limfocītu skaits, bija labāka imunoloģiskā atbilde un ātrāka CD4⁺ T šūnu atjaunošanās (Lederman et al., 2011).

Imūnās aktivācijas cēloņi HIV pacientiem ir multifaktoriāli, turklāt šie faktori katram indivīdam var spēlēt atšķirīgu lomu. Kā biežākie cēloņi tiek minēti: tiešs specifisku vīrusa olbaltumu, piemēram, Env, Nef, Tat u. c., efekts, iedzimtās un iegūtās imūnās sistēmas atbilde uz HIV vīrusu un tā antigēniem, nepietiekama antivirālās imūnās atbildes regulācija, T un B limfocītu aktivācija, kuru izraisa palielināta proiekaisuma citokīnu, tādu kā TNF- α , IL-1, IL-6 u. c., produkcija, klīnisku vai subklīnisku koinfekciju esamība, lielāka centrālo atmiņas CD4⁺ T šūnu inficētība (Sodora & Silvestri, 2008). Tomēr kā būtiskākie faktori, kas nosaka SIV un HIV vīrusu asociētu imūno aktivāciju, ir mikrobu translokācija un zarnu mikrobioma izmaiņas (Sodora & Silvestri, 2008; Marchetti, Tincati & Silvestri, 2013).

1.3. Cilvēka mikrobiota un mikrobioms

Pirmo reizi mikrobiomu definēja *Whipps* ar kolēģiem 1988. gadā, aprakstot to kā raksturīgu mikrobu kopienu, kas aizņem noteiktu un pietiekami labi definētu biotopu un kam piemīt atšķirīgas fizioloģiski ķīmiskas īpašības (Whipps, Lewis & Cooke, 1988). Tādējādi termins “mikrobioms” attiecināms ne tikai uz iesaistītajiem mikroorganismiem, bet ietver arī to darbību un tiem raksturīgās papildu funkcijas. Cilvēka mikrobiomu veido rezidējošo mikroorganismu gēni un to saražotie produkti, ieskaitot RNS, proteīnus un metabolītus (Aagaard, Luna & Versalovic, 2020), un tam piemīt nozīmīga ietekme kā uz cilvēka fizisko un psihisko veselību, tā arī slimību attīstību (Bassler, 2012).

Cilvēka mikrobiota var tikt definēta kā visu mikroorganismu kopums, kas dzīvo cilvēka ķermenī vai uz tā (Aagaard, Luna & Versalovic, 2020). Ir pierādīts, ka cilvēka organismā dzīvo dažādas baktērijas, sēnītes, vienišūņi un vīrusi (Turnbaugh et al., 2007). Šobrīd ar terminu “mikrobiota” saprot visu dzīvo mikroorganismu kopu, kura apdzīvo noteiktu vidi, bet ar mikrobiomu – noteiktās vides visu mikroorganismu genomu, to strukturālo elementu un metabolītu kopu, kā arī to vides faktoros (Berg et al., 2020). Tā kā bakteriofāgi, vīrusi, plazmīdas, prioni, viroīdi un brīvi cirkulējošās DNS netiek uzskatīti par dzīviem mikroorganismiem, tad tos mikrobiotai nepieskaita, bet tie veido citu dzīvo mikroorganismu apkārtējo vidi, tādējādi iekļaujoties mikrobiomā. Termins “metagenoms” tiek definēts kā mikrobiotas dalībnieku genomu un gēnu kolekcija (Berg et al., 2020).

Cilvēka mikrobiotas pētījumos ir atklāts, ka pat pilnībā veseliem cilvēkiem novēro lielas atšķirības mikroorganismu, kuri tiek atrasti zarnu traktā, uz ādas vai vagīnā, sastāvā un daudzveidībā. Daudzveidības cēloņi vēl aizvien pilnībā nav skaidri, tomēr ir pierādīta diētas, vides, ģenētisko faktoru un agrīnā vecumā saskares ar mikrobiem ietekme. Mikrobu daudzveidība tiek raksturota ar mikroorganismu noteiktu sugu skaitu un izplatības daudzumu (The Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Cilvēka mikrobiotu veido 10–100 triljoni simbiotisku mikroorganismu šūnu, lielākā daļa no tām atrodas kuņģa-zarnu traktā. Mikrobiotas sastāva un daudzveidības atšķirības pirmais aprakstīja Antonijs van Lēvenhuks (*Antonie van Leewenhoek*), kurš konstatēja atšķirības starp mutes dobuma un fēču mikroorganismu sastāvu, kā arī izteica domu, ka šie mikroorganismi atšķiras veseliem un slimiem cilvēkiem. Cilvēka roku un zarnu mikrobiotas atšķirības sasniedz 80–90 %, kamēr cilvēka genoms starp indivīdiem ir vienāds 99,9 %. Cilvēka mikrobiota veidojas pakāpeniski pirmo divu dzīves gadu laikā, lineāri pieaugot tās daudzveidībai pēc jebkurām diētas izmaiņām. Dzīves laikā nepārtraukti notiek cilvēka mikrobiotas savstarpēja mijiedarbība ar apkārtējo vidi, to turpina ietekmēt diētas izmaiņas, medikamentu lietošana un slimības. Mikrobiotas daudzveidība ir atšķirīga ne tikai starp dažādiem indivīdiem, bet arī viena cilvēka dažādās ķermeņa vietās, lielāko daudzveidību sasniedzot mutes dobumā un zarnās (Ursell et al., 2012; Tavakoli et al., 2021).

Dažādas cilvēka ķermeņa vietas apdzīvo dažādas mikrobu kopienas, kuras atšķiras ne tikai pēc mikrobu daudzveidības un sastāva, bet arī ar to metabolajām funkcijām, radot atšķirības vielmaiņas kapacitātē un cilvēka mikrobioma kopējā funkcionalitātē. Mikrobiotas pēc lokalizācijas tiek iedalītas zarnu, mutes dobuma, plaušu, vagīnas un ādas. Zarnu mikrobiota tiek uzskatīta par nozīmīgāko cilvēka veselības uzturēšanā, salīdzinot ar citu lokalizāciju mikrobiotām (Hou et al., 2022). Mikrobioma atšķirības ir konstatētas, salīdzinot mikroorganismu daudzveidību un funkcionalitāti, arī atkarībā no ģeogrāfiskās lokalizācijas, vecuma, etnisko grupu un rasu piederības, kā arī dažādu veselības stāvokļu un slimību kontekstā.

Ķirurģiskas manipulācijas, medikamenti un diētas var būtiski mainīt un bojāt zarnu mikrobioma sastāvu un funkcionalitāti (Maier et al., 2018), turklāt apkārtējās vides faktoru ietekmei ir nozīmīgāka loma, salīdzinot ar ģenētiskajiem, veidojot cilvēka mikrobiomu (Rothschild et al., 2018). *Gacesa* un kolēģu veiktajā pētījumā, kurā tika iesaistīti 8208 Dānijas iedzīvotāji, konstatēja, ka tikai 6,6 % zarnu baktēriju taksonomiskās vienības ir iedzimtas, bet 48,6 % variācijas ir kopīgas neradniecīgiem cilvēkiem no vienas mājsaimniecības (Gacesa et al., 2018).

Analizējot mikrobu sastāva atšķirības dažādās vecuma grupās, *Wu* ar kolēģiem novēroja nebūtiskas atšķirības mutes dobuma mikrobioma sastāvā, bet būtiskas atšķirības atklāja ādas mikrobioma sastāvā starp pētāmajām grupām. Zarnu baktēriju sastāvs būtiski atšķirās tikai simtgadnieku grupā, salīdzinot ar jauniem un veciem cilvēkiem (*Wu et al., 2020*).

Sievietēm novēro lielāku mikrobiotas daudzveidību nekā vīriešiem, bet samazinātu *Bacteroides* un *Prevotella* sugu daudzumu (*Chang & Kashyap, 2021*). Pētījumā ar pelēm konstatēja, ka komensālas baktērijas var aizkavēt 1. tipa cukura diabēta attīstību vīriešu kārtas pelēm, bet to nenovēroja sieviešu kārtas pelēm. Šis protektīvais efekts ir atkarīgs no androgēnu receptoru aktivitātes un var tikt pārņemts uz sieviešu kārtas pelēm, transplantējot zarnu mikroorganismus (*Markle et al., 2013*).

Salīdzinot baktēriju sastāvu dažādās organisma vietās, konstatēts, ka vesela cilvēka mikrobiomā esošie atsevišķie biotopi satur dažādus mikroorganismus un atšķirīgas mikrobu kopienas (*Costello et al., 2009; The Human Microbiome Project Consortium, 2012; Lloyd et al., 2017*). Lai arī neviena no baktēriju taksonomiskajām grupām netika konstatēta pilnīgi visās ķermeņa vietās un visiem indivīdiem, tomēr novēroja atsevišķu mikroorganismu kopienu un metabolo modeļu līdzības, īpaši etniskajās un rasu grupās (*The Human Microbiome Project Consortium, 2012*).

Cilvēka mikrobioma projekta ietvaros, kurā tika pētīti 4788 dažādu lokalizāciju mikrobioma paraugi, kas iegūti no 242 veseliem pieaugušajiem, konstatēja, ka t. s. kanoniskie mikroorganismi, tādi kā *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium avium* un *Salmonella enterica*, nav atrodamīti veseliem pieaugušajiem. Kā būtiskākie izņēmumi tika atklāti *Staphylococcus aureus* un *Escherichia coli*, kurus atrada pētītajiem cilvēkiem. Piemēram, *Escherichia coli* DNS bija nosakāms 61 % veselu pieaugušo, bet 15 % indivīdu tās relatīvais daudzums bija vismaz virs 0,5 %. Savukārt oportūniskie mikroorganismi pretēji kanoniskajiem ir plaši pārstāvēti, konstatējot 56 dažādus oportūnistiskos patogēnus dažādās organisma vietās veseliem cilvēkiem (*The Human Microbiome Project Consortium, 2012*). Šie konstatējumi izskaidro, kādēļ imunosupresīvs stāvoklis bieži rezultējas ar oportūnistiskas infekcijas attīstību (*Aagaard, Luna & Versalovic, 2020*). Arī atsevišķas sēnīšu sugas, tādas kā *Candida* un *Aspergillus*, var atrast zarnu traktā veseliem cilvēkiem, kuras gadījumos, kad tiek izjaukts zarnu mikrofloras balanss, var savairoties un izraisīt slimības (*Ghannoum, 2016*).

Vīrusu izraisītas infekcijas un vīrusu replikāciju ietekmē simbiotiski mikroorganismi, kas apdzīvo noteiktas lokalizācijas. Ir aprakstītas izmaiņas distālā zarnu trakta mikrobiotas sastāvā gan hepatītu izraisīto vīrusu, gan respiratoru vīrusu infekciju gadījumā, tādējādi apstiprinot zarnu-multiplu orgānu ass teoriju, kas norāda par simbiotisku mikroorganismu ietekmi uz dažādu vīrusu izraisītu infekciju slimības iznākumu (*Mizutani et al., 2022*).

Cilvēka mikrobioms plaši tiek pētīts kā iespējamās personalizētās ārstēšanas mērķis, īpaši metabolo un vides slimību kontekstā, jo tas var tikt modulēts ar dažādām terapijas metodēm, kā, piemēram, diētas izmaiņām, prebiotiku un probiotiku lietošanu, kā arī mikrobioma transplantāciju (Berg et al., 2020). Fēču mikrobioma transplantācija tiek izmantota arī rekurentas *Clostridium difficile* infekcijas ārstēšanā. Lai arī metodes efektivitātes mehānisms nav pilnībā skaidrs, tomēr to aizvien plašāk izmanto gastrointestinālu slimību, metabolā sindroma un aknu slimību ārstēšanā (Ley et al., 2005; Berg et al., 2020).

1.3.1. Zarnu mikrobiota un mikrobioms

Zarnu mikrobiotas sastāvs nozīmīgi atšķiras atkarībā no lokalizācijas, tā daudzveidība palielinās virzienā no tievajām uz resnajām zarnām (Hou et al., 2022). Vismazākais baktēriju daudzums ir gremošanas trakta augšdaļā (kuņģī $0-10^2$ šūnas/g lūmena satura, divpadsmitpirkstu zarnā 10^2 , proksimālajā ileumā 10^3), un tas pakāpeniski palielinās līdz 10^7-10^8 terminālajā ileumā un sasniedz 10^{12} šūnas/g resnajā zarnā (Sartor, 2008). Šo mikrobioloģisko profilu var modulēt tādi faktori kā ģenētika, dzimšanas veids, uzturs, higiēna, psiholoģiskais distress, vide un dzīvesveids, infekcija un medikamenti, īpaši antibiotikas (Tavakoli et al., 2021). Neskatoties uz zarnu mikrobiotas daudzveidību, pētījumi un detalizēta informācija ir pieejama tikai par atsevišķām lielām zarnu trakta sadaļām – tievās zarnas, resnās zarnas un fēcēm.

Zarnu mikrobiotu var noteikt, izmantojot dažādas materiālu iegūšanas metodes – zarnu gļotādas biopsijas, fēces, rektālas iztriepes, aspirāciju no zarnām, kā arī no operatīvā ceļā iegūtiem paraugiem. Katrai no šīm metodēm ir savas priekšrocības un trūkumi, tomēr visbiežāk izmantotā metode, lai iegūtu informāciju par zarnu mikrobiomu, tiek lietota fēču materiāla analīze (Tang et al., 2020), kas ļauj salīdzinoši vienkārši un bez invazīvām manipulācijām iegūt izmeklējamo materiālu. Pētījumā ar pelēm tika konstatēts, ka fēču izmeklējumi atspoguļo individuālās starppersonu atšķirības (Ley et al., 2005), turklāt resnās zarnas fēču paraugu atšķirības ir lielākas starp dažādiem indivīdiem, salīdzinot ar viena indivīda paraugiem, ņemtiem no dažādām vietām (Eckburg et al., 2005). Pētījumā, kurā tika analizēti pašu dalībnieku savākti fēču paraugi, konstatēja, ka tie efektīvi atspoguļo distālā zarnu trakta mikrobioma datus. Zarnu biopsijas materiālos iegūtā informācija cieši korelē un pārklājas ar fēču materiāla iegūtajiem datiem par mikrobiotas sastāvu, relatīvo daudzumu un heterogenitāti dažādos zarnu trakta līmeņos (Hong et al., 2011).

Mikrobiotas un mikrobioma analīzei mūsdienās izmanto galvenokārt kultūrneatkarīgas metodes, kas balstās uz amplikonu vai metagenomikas izpēti. Visbiežāk izmantotā metode ir mazās ribosomālās subvienības (16S rRNS) gēnu sekvencēšana. 16S rRNS gēns ir sastopams visos prokariotiskos organismos, ļauj diezgan precīzi noteikt mikrobiotas sastāvu, un tā ir arī

salīdzinoši lētāka par metagenomiskajām izpētes metodēm. Šī metode izmanto universālu primeru pāru selektīvu saistīšanos ar ļoti konservatīvām sekvencēm 16S rRNS gēna hipervariablajos reģionos (piemēram, V3-V5), kas ļauj amplificēt un sekvenēt reģionu, kurā ir pietiekami daudz filoģenētiskās informācijas, lai veiktu taksonomisko klasifikāciju. Šo informāciju izmanto, lai noteiktu funkcionālās taksonomiskās vienības (angļu valodā – *operational taxonomic units*, OTU), kurām ir 97 % sekvences identitāte ar baktēriju taksoniem (Fricker, Podlesny & Fricke, 2019; Gotschlich, Colbert & Gill, 2019; Johnson et al., 2019). 16S rRNS gēns satur deviņus variablos reģionus (V1-V9), mikrobiotas noteikšanai biežāk izmanto V4 un V5 reģionus, kas ļauj izanalizēt baktērijas pārsvarā līdz ģints līmenim, turklāt katram no šiem reģioniem var būt savas priekšrocības atsevišķu baktēriju sugu identificēšanā (Johnson et al., 2019).

Metagenomiskā DNS fragmentu sekvenčēšana ļauj veikt vispusīgāku visu vīrusu, baktēriju un eikariotu mikrobiotas genomu taksonomisko un funkcionālo analīzi. Šī metode aptver visu organismu genomu, nevis koncentrējas uz 16S rRNS gēnu fragmentiem, līdz ar to sniedz informāciju ne tikai par sastāvu, bet arī par mikrobioma funkciju (Fricker, Podlesny & Fricke, 2019; Gotschlich, Colbert & Gill, 2019).

Mikrobiotas sastāvs variē visa gastrointestinālā trakta ietvaros. Dažādi faktori nosaka baktēriju lokalizācijas vietas. Pie šiem faktoriem pieder oksidācijas–redukcijas potenciāls, ķīmisko un barības vielu gradienti, cilvēka imūnās sistēmas aktivitāte un gļotādas stāvoklis. Lielāks baktēriju blīvums, kas saistāms ar lielāku barības vielu pieejamību un lēnāku zarnu trakta motoriku, ir novērojams resnajā zarnā, savukārt tievajās zarnās, kur ir skarbāki vides apstākļi un straujāks tranzīts, baktēriju daudzveidība un blīvums ir mazāki. Skābekļa gradients virzienā no gļotādas uz zarnu lūmenu arī ietekmē baktēriju taksonomiskās vienības un to funkcionālās atšķirības starp lūmena asociētām un gļotādas asociētām baktērijām. Kā gļotādas asociētas baktērijas tiek minētas tās, kuras primāri kā barības vielas izmanto aminoskābes (Chang & Kashyap, 2021).

Resnās zarnas satur ļoti daudzveidīgas un bagātīgas mikroorganismu kopienas, tomēr veseliem pieaugušajiem vairāk nekā 90 % resnās zarnas baktēriju filoģenētiski pieder tikai diviem no 70 zināmajiem domēna baktērijas nodalījumiem – *Firmicutes* un *Bacteroidetes* (Eckburg et al., 2005; Gill et al., 2006; Turnbaugh et al., 2007). Pētījumā, kurā tika analizētas 18 348 fēču 16S rRNS sekvences, iegūtas gada laikā no 14 radnieciski nesaistītiem pieaugušajiem, konstatēja, ka vairāk nekā 70 % no iegūtajiem baktēriju filotipiem ir unikāli katram indivīdam. Tomēr, neskatoties uz sugu daudzveidību, vairāk nekā 90 % piederēja *Firmicutes* un *Bacteroidetes* nodalījumiem (Ley et al., 2006).

Bacteroidetes nodalījumu galvenokārt pārstāv *Bacteroides* baktēriju ģints, bet *Firmicutes* pārstāv dažādas komensālu mikrobu ģintis: *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*. *Bacteroides* ģints pārstāvju dažādība tiek asociēta ar individuālām zarnu mikrobioma variācijām starp veseliem pieaugušajiem, kā, piemēram, pieaugušo vecumā pakāpeniski mazinās *Bifidobacterium* klātbūtne zarnās (Lloyd-Price et al., 2017).

Tievajās zarnās dominē grampozitīvās *Firmicutes* nodalījuma baktēriju sugas, tādas kā *Streptococcus*, *Veillonella* un *Clostridium*, kas ir atšķirīgas no dominējošām mikroorganismu sugām resnajā zarnā. Tievo zarnu distālajā daļā pārsvarā dominē *Bacteroidetes* un *Proteobacteria* (piemēram, *E.coli*) nodalījumu baktērijas (Van den Bogert et al., 2011; Zoetendal et al., 2012).

Zarnu mikrobiota mainās dažādos cilvēka dzīves posmos. Jaundzimušajiem pirmajā dzīves nedēļā novēro liela mēroga svārstības zarnu baktēriju sastāvā. Tomēr salīdzinošās līdzības dvīņu mikroorganismu sastāvā norāda arī uz vides nozīmi zarnu mikrobioma veidošanās procesā. Sasniedzot viena gada vecumu, mikrobu kopienas sāk attāli līdzināties pieaugušo zarnu traktam (Palmer et al., 2007), un šajā laikā dominējošās baktēriju sugas ir *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Veillonella* un *Clostridium* (Hou et al., 2022). Triju gadu vecumā zarnu trakta mikrobioms sasniedz pieaugušo zarnu trakta mikrobiomam raksturīgo daudzveidību, lai gan visu bērnību novēro dinamiskas izmaiņas starp baktēriju ģintīm un sugām. Šajā vecumposmā dominē *Firmicutes*, *Bacteroidetes* un *Actinobacteria* ģinšu baktērijas (Yatsunencko et al., 2012). Pieaugušam cilvēkam zarnu mikrobiotu veido sešu baktēriju nodalījumi – *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* un *Verrucomicrobia* (Hou et al., 2022).

Claesson ar kolēģiem aprakstīja izmaiņas zarnu mikrobiotā gados vecākiem cilvēkiem, turklāt baktēriju sastāvs bija atkarīgs no dažādiem vides faktoriem, piemēram, dzīvesvietas (*Claesson* et al., 2012). Zarnu mikrobiotas daudzveidība pieaug laikā no bērnības līdz pieaugušo vecumam un mazinās vecumā virs 70 gadiem. Gados veciem cilvēkiem īpaši novēro *Bifidobacterium* sugas baktēriju skaita mazināšanos, kas tiek asociēta ar iespējami lielāku noslieci uz dažādiem iekaisīgiem procesiem (Hou et al., 2022).

Fēču mikrobiotas sastāvs veseliem pieaugušajiem ir stabils vismaz vienu gadu, turklāt, izmantojot matemātisko modeļu aprēķinus, kuros analizēja ģimenes locekļu datus, salīdzinātus ar neradniecīgiem cilvēkiem, konstatēja, ka mikrobiotas sastāvs ir stabils desmitgades vai pat, iespējams, visu dzīvi (Shreiner et al., 2015). Ģeogrāfiskā lokalizācija un etniskā piederība arī ietekmē zarnu mikrobiotas atšķirības gan mikrobu sastāva, gan daudzveidības ziņā (Porras et al., 2021).

Tomēr tādi ārējie faktori kā, piemēram, antibiotikas var radīt būtiskas izmaiņas kuņģa-zarnu trakta mikrobu sastāvā. Piemēram, jau trīs līdz četras dienas pēc ciprofloksacīna terapijas uzsākšanas novēro mikroorganismu taksonomisko vienību skaita un daudzveidības sarukumu (Dethlefsen et al., 2008). Lai arī pēc terapijas pārtraukšanas zarnu mikrobiota nedēļas laikā pakāpeniski sāk atjaunoties, tomēr šīs izmaiņas būtiski atšķiras starp indivīdiem, un daļai cilvēku terapijas rezultātā dažas no taksonomiskajām vienībām izzūd (Dethlefsen & Relman, 2011).

Šobrīd cilvēku klasifikācija enterotipos pēc zarnu mikrobiotas sastāva un to globālā nozīme joprojām ir pretrunīga, tomēr baktēriju DNS sekvencēšanas dati no fēču paraugiem liecina, ka veselus cilvēkus var iedalīt trijos pamata enterotipos, kas attiecīgi ir bagātināti ar *Bacteroides*, *Prevotella* vai *Ruminococcus* ģinšu baktērijām. Šo enterotipu funkcionālā nozīme un tas, vai šādi mikrobiomu “tipi” ietekmē cilvēku klīniskos rezultātus dažādu slimību gadījumā, joprojām nav zināms (Aagaard, Luna & Versalovic, 2020).

Lielākajai daļai mikroorganismu, kuri atrodami zarnu traktā, ir būtiska loma cilvēku dzīvē, ieskaitot enerģijas uzņemšanu no pārtikas, kā arī mikrobioma izmaiņas ir saistītas ar aptaukošanos un iekaisīgām zarnu slimībām (Sartor, 2008; Qin et al., 2010; Tavakoli et al., 2021). Arvien vairāk pētījumos tiek apstiprināta cilvēka mikrobiotas saistība ar ēšanas paradumiem un metabolismu (Ursell et al., 2012). Tāpat zarnu mikrobiota ir cieši saistīta ar cilvēka imunitāti, kā arī bioloģisku aktīvu molekulu, tādu kā vitamīnu, aminoskābju un lipīdu, sintēzi (Hou et al., 2022).

1.3.2. Zarnu mikrobiota un imūnā sistēma

Zarnu mikrobiotas un imūnās sistēmas mijiedarbība ir kompleksa un daudzveidīga. Imūnā sistēma iemācās sadarboties ar komensāliem mikroorganismiem, bet reaģēt uz patogēnajiem, savukārt mikrobiotai ir būtiska loma imūnās sistēmas normālas funkcionēšanas apgūšanā. Cilvēka mikrobiota, producējot antimikrobiālas substances, ne tikai pasargā cilvēku no ārējiem patogēniem, bet arī ir nozīmīga komponente zarnu gļotādas un imūnās sistēmas attīstībā (Hou et al., 2022).

Zarnu epitēlija un dendrītiskās šūnas ir pirmās, kas saskaras ar zarnu mikrobiotu, izmantojot TLR un NOD receptorus, tiek atpazīti MAMPs gan uz komensālām, gan patogēnām baktērijām. Lai izdzīvotu zarnu traktā, zarnu mikroorganismi rada t. s. imūno toleranci (Round et al., 2011), iedarbojoties tieši uz T šūnām ar TLR palīdzību vai arī producējot dažādas imūnmodulējošas molekulas (piemēram, citozīnfosfodiesterāzes guanīna DNS, īso ķēžu taukskābes, ATF), kuras iedarbojas uz TLR-9, stimulējot specifiskus sensorus, veicina zarnu

Th 17 šūnu veidošanos un, iedarbojoties uz G proteīna saistīto receptoru, mazina iekaisuma atbildes reakcijas (MacDonald et al., 2011).

Zarnu traktā nepārtraukti notiek imūnregulējošo mikroorganismu un imūnās sistēmas mijiedarbība. Tā, piemēram, samazināta aizsargājošo baktēriju, kas ražo īso ķēžu taukskābes, piemēram, butirātu, koncentrācija var palielināt gļotādas caurlaidību (Sartor, 2008). Atsevišķos eksperimentos ir pierādīts, ka, piemēram, nepatogēnās *Clostridium* sugas spēj inducēt zarnu regulatorās T šūnas. Kā viens no iespējamiem mehānismiem ir butirāta producēšana, kas ietekmē Foxp3 promoterus, kuri kontrolē T regulētājšūnu attīstību (Shreiner et al., 2015). Turpretī palielināta patogēno baktēriju koncentrācija palielina adjuvantu un antigēnu daudzumu, kas izraisa patogēnas imūnās reakcijas vai palielina toksisku metabolītu, piemēram, sērūdeņraža, veidošanos, kas palielina gļotādas caurlaidību un bloķē butirāta metabolismu (Sartor, 2008).

Savukārt imūnā sistēma palīdz veidot un uzturēt zarnu mikrobiotas kompozicionālo sastāvu. Zarnu epitēlijšūnas producē antibakteriālus proteīnus, kā, piemēram, α -defensīnus, kas limitē baktēriju kontaktu ar zarnu epitēlijšūnām (Hooper, Littman & Macpherson, 2012). Saimnieka – mikroorganismu signālsistēmas darbības traucējumi noved pie zarnu mikrobiotas atsevišķu komponentu nepareizas izplešanās un savairošanās, kas savukārt negatīvi ietekmē iekaisuma atbildes reakcijas un palielina dažādu slimību risku (Brown, Sadarangani & Finaly, 2013).

1.3.3. Zarnu mikrobioms un predispozīcija slimībām

Zarnu mikrobiomam ir ļoti svarīga loma zarnu epitēlija barjeras uzturēšanā, kā arī šķidrums un elektrolītu transportā. Atsevišķi zarnu mikrobiotas pārstāvji spēj ietekmēt blīvo savienojumvietu proteīnu ekspresiju, mikrobu metabolīti, kā, piemēram, butirāts, nozīmīgi ietekmē zarnu epitēliālo barjeru, kā arī mikrobiota var negatīvi ietekmēt žultsskābju metabolismu.

Zarnu mikrobiota veselam pieaugušajam ir ar lielu mikrobu daudzveidību, savukārt samazināta mikrobu daudzveidība ir asociēta ar palielinātu slimību risku, kā arī zarnu saslimšanu recidīviem (Sartor, 2008; Chang et al., 2009; Tavakoli et al., 2021). Mikrobu daudzveidības un to skaita samazinājumam piemīt negatīva ietekme uz mikrobioma imunomodulatorajām funkcijām, kā arī rezistenci pret zarnu patogēniem, tādējādi veicinot infekcioza enterīta un kolīta attīstību (Pflughoeft & Versalovic, 2012). Piemēram, pacientiem ar rekurentām *Clostridium difficile* infekcijām novēro mazāku baktēriju daudzveidību, salīdzinot ar cilvēkiem, kuriem ir bijusi viena šīs infekcijas epizode (Chang et al., 2009). Pierādīta saistība ir arī iekaisīgām zarnu slimībām, nekrotizējošam enterokolītam un

samazinātai mikrobu daudzveidībai un to skaitam zarnās (Eckburg et al., 2005; Tavakoli et al., 2021).

Dažādām slimībām novēro dažādas asociācijas ar zarnu mikrobiotas daudzveidību un izmaiņām, spēcīgākās asociācijas konstatētas kardiovaskulāru un metabolu slimību gadījumos, kā, piemēram, nealkohola taukainā hepatoze un 2. tipa cukura diabēts, un gastrointestinālu slimību gadījumos (Hansen et al., 2015; Hartstra et al., 2015; Martinez-Guryn et al., 2018; Tavakoli et al., 2021). Dažas no izmaiņām zarnu mikrobiomā ir kopīgas savstarpēji nesaistītām slimībām, kā arī ir atrastas pazīmes, kas raksturīgas veseliem cilvēkiem. Savstarpēji nesaistītu slimību gadījumā raksturīgas iezīmes ir palielināts *Anaerotruncus*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Holdemania*, *Flavonifractor*, *Eggerthella* un *Clostridium* sugu daudzums, bet samazināts *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Subdoligranulum*, *Oxalobacter*, *Eubacterium* un *Roseburia* sugu baktēriju skaits (Gacesa et al., 2022).

1.3.4. HIV infekcijas ietekme uz fēču mikrobiotas kompozīciju un daudzveidību un tā ietekme uz imūno aktivāciju

Pēdējos gados pieaugošais pētījumu skaits ir apstiprinājis zarnu mikrobioma lomu imunitātes un vispārējā veselības stāvokļa uzturēšanā. Vairākos pētījumos ir pierādīta zarnu mikrobioma un tā sastāva būtiskā nozīme lokālās un sistēmiskās imunitātes nodrošināšanā ar HIV inficētiem pacientiem (Paiardini et al., 2008; Ellis et al., 2011; Brenchley & Douek, 2012; Dillon et al., 2016).

Zarnu mikrobiotas izmaiņas var ietekmēt HIV infekcijas dabīgo norisi un progresēšanu visā slimības gaitā. Imūnās disfunkcijas smaguma pakāpe variē atkarībā no slimības stadijas, kā arī no cilvēka individuāliem faktoriem. Būtiskākās atšķirības, kuras var novērot zarnu mikrobiotas sastāvā un attiecīgi imūnās aktivācijas pakāpē, vērojamas akūtas HIV infekcijas pacientiem, pacientiem ar hronisku jeb latentu infekciju, kas neārstētiem indivīdiem ilgst 7–10 gadus un ko raksturo pakāpenisks CD4⁺ T šūnu zudums pacientiem ar smagu imūndeficītu, kas noved pie oportūnistisku infekciju pievienošanās un AIDS, un atsevišķi izdalāma pacientu grupa, kuriem bez ART saglabājas augsti CD4⁺ T šūnu līmeņi perifērajās asinīs (Li et al., 2016).

Analizējot ar HIV asociētu mikrobu translokāciju kontekstā ar zarnu mikrobiotas izmaiņām, tiek skatīti vairāki parametri: baktēriju kopējais daudzums un piesātinājums, atsevišķu sugu izmaiņas gan to skaitā, gan piesātinājumā, kā arī šo parametru iespējamā asociācija ar imūno šūnu skaitu, mikrobu translokācijas marķieriem un dažādiem iekaisuma rādītājiem.

Gori ar kolēģiem demonstrēja atšķirības zarnu mikrobiotas sastāvā ar HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem. Viņš norādīja, ka jau agrīnā HIV infekcijas stadijā vērojamas izmaiņas zarnu mikrobiotā, kā arī parādās oportūnistisku patogēnu, tādu kā *Pseudomonas areruginosa* un *Candida albicans*, dominance un protektīvo baktēriju, kā, piemēram, laktobaciļu, samazinājums (*Gori et al.*, 2008). Savukārt *Ton* ar kolēģiem pierādīja, ka ar HIV inficētiem pacientiem ir ne tikai izmainīts zarnu mikrobioms, bet fēcēs ir arī paaugstināts kalprotektīna līmenis, ko sekretē zarnu sienas iekaisuma procesos iesaistītie neitrofilie leikocīti (*Ton et al.*, 2000).

Līdzīgā pētījumā tika konstatēta lielāka *Enterobacteriales* proporcija ar HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu, turklāt ar HIV inficētiem pacientiem bija zemāks CD4⁺ šūnu līmenis divpadsmitpirkstu zarnas gļotādā, un tas negatīvi korelēja ar kopējo baktēriju daudzumu zarnās. Šiem pacientiem konstatēja arī korelāciju starp *Enterobacteriales* un *Bacteroides* proporciju zarnās un aktivētu CD8⁺ T limfocītu skaitu gan zarnās, gan perifērajā asinsritē (*Ellis et al.*, 2011). Šie dati norāda uz normāla fizioloģiska zarnu mikrobioma sagraušanu un patogēnās zarnu mikrofloras saistību ar zarnu iekaisumu ar HIV inficētiem pacientiem (*Gori et al.*, 2008).

Sākotnēji pētījumi par zarnu mikrobiomu bija balstīti galvenokārt kvantitatīvajā polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) tehnoloģijā, kas ļāva noteikt tikai atsevišķu sugu mikrobus (*Ton et al.*, 2000; *Gori et al.*, 2008). Pēdējos 10 gados, ieviešot aizvien modernākas tehnoloģijas, kā, piemēram, nākamās paaudzes sekvenčēšanu, ir izdevies iegūt daudz detalizētāku informāciju par mikrobiomu kopumā, kā arī par HIV infekcijas izraisītu disbiozi. Izmantojot atbilstošas informācijas apstrādes metodes, ir iespējams aprēķināt arī α un β daudzveidību. α daudzveidība raksturo mikroorganismu daudzumu un vienmērīgumu viena parauga ietvaros, bet β daudzveidība apraksta mikroorganismu atšķirības starp diviem vai vairāk paraugiem. Lai noteiktu zarnu mikrobiotas α daudzveidību, tiek izmantoti vairāki indeksi, kā, piemēram, Simpsona (*Simpson*) un Šanona-Vīnera (*Shanon-Wiener*), β daudzveidību parasti nosaka ar Chao1 indeksa palīdzību (*Dubourg et al.*, 2017).

Ar HIV inficētiem pacientiem hroniskā slimības fāzē novēro mazāku kopējo baktēriju gēnu daudzumu fēcēs, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, turklāt zemāks kopējais gēnu skaits ir saistīts ar lielākiem sistēmiskajiem iekaisuma rādītājiem. Arī zemāks CD4⁺ T limfocītu skaits šiem pacientiem korelē ar augstākiem iekaisuma rādītājiem, kā, piemēram, IL-6, kā arī ar enterocītu bojājuma pakāpi (*Guillen et al.*, 2018).

Ar HIV inficētiem pacientiem tiek novērota mazāka zarnu mikrofloras daudzveidība, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem (*Guillen et al.*, 2018; *Ellis et al.*, 2021; *Mingjun et al.*, 2022), turklāt cilvēki ar mazāku mikrofloras daudzveidību ir gados vecāki, biežāk sievietes un

eiropēdās rases pārstāvji (Guillen et al., 2018), kā arī HIV terapiju nesaņēmuši pacienti (Li et al., 2016). *Dillon* ar kolēģiem konstatēja arī samazinātu α daudzveidību hroniskiem neārstētiem HIV pacientiem zarnu biopsijas, bet ne fēču materiālos (Dillon et al., 2014). Līdzīga atrade, salīdzinot fēču un zarnu biopsiju materiālus, konstatēta arī citu pētnieku darbos (Mutlu et al., 2014).

Guillen ar kolēģiem konstatēja nozīmīgas atšķirības zarnu mikrofloras sugu kompozīcijā pacientiem ar lielu un mazu kopējo baktēriju gēnu daudzumu zarnās. Pacientiem ar lielu baktēriju gēnu daudzumu atklāja lielāku daudzumu *Methanobrevibacter*, sulfātus mazinošo baktēriju *Desulfovibrio* un butirātu producējošo *Ruminococcaceae*, kā arī *Eubacterium* sugu daudzumu, bet pacientiem ar zemu kopējo baktēriju gēnu skaitu dominēja *Bacteroides* sugas (Guillen et al., 2018).

Zarnu mikrobiotas relatīvā daudzuma salīdzinošā pētījumā konstatētas piecas dominējošās baktēriju sugas ar HIV inficētiem cilvēkiem: *Bacteroides* (23,45 %), *Prevotella* (19,23 %), *Fusobacterium* (12,40 %), *Lachnospira* (3,81 %) un *Escherichia-Shigella* (3,12 %), bet veseliem cilvēkiem: *Bacteroides* (25,19 %), *Prevotella* (7,08 %), *Faecalibacterium* (5,62 %), *Subdoligranulum* (4,71 %) un *Lachnospira* (4,19 %). Veicot lineāru regresijas analīzi, šie pētnieki konstatēja būtiskas atšķirības ģinšu līmenī, īpaši *Prevotella*, *Klebsiella*, *Fusobacteriota*, *Fusobacterium* un *Bacteroides* (Mingjun et al., 2022).

HIV infekcijas gaitā pacientiem attīstās zarnu mikrobiotas kompozīcijas atšķirības, turklāt atsevišķu baktēriju sugu pieaugums zarnās ir saistīts ar iekaisuma citokīnu līmeņu palielināšanos plazmā. HIV pacientiem, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, biežāk novēro *Firmicutes* baktēriju nodalījuma, kas ietver arī *Clostridia* klasi, samazinājumu, bet izteikts samazinājums tiek novērots *Bacteroides* un *Alistipes* sugās. Savukārt *Proteobacteria* klases baktērijas tiek novērotas relatīvi lielākā daudzumā (Gori et al., 2008; Vujkovic-Cvijin et al., 2013; Dillon et al., 2014; Li et al., 2016; Rocafort et al., 2019), kā arī pieaug atsevišķu oportūnistisko patogēnu, kā *Staphylococcus* un *Pseudomonas* sugu, relatīvie daudzumi (Li et al., 2016). HIV infekcijai progresējot, mazinās arī *Akkermansia* un *Bifidobacterium* sugu baktēriju daudzums (Rocafort et al., 2019). HIV infekcijas gadījumā ir novērots arī gramnegatīvo anaerobo baktēriju *Prevotella* relatīvā daudzuma pieaugums, kas vienlaikus asociējas ar samazinātu *Bacteroides* daudzumu, turklāt šī attiecība novērota gan fēču izmeklējumos, gan resnās zarnas biopsijas materiālos. *Prevotella* baktēriju daudzums nozīmīgi korelē ar gļotādu dendrītisko un T šūnu aktivāciju, kā arī zarnu gļotādas CD4⁺ un aktivēto CD8⁺ T šūnu skaitu, kas ir saistīts ar gļotādas INF- γ producēšanu, un potenciāli ietekmē lokālo iekaisumu un palielina epiteliālās barjeras caurlaidību, kā rezultātā izmaiņas *Prevotella-Bacteroides* gradientā uztur hronisku iekaisumu (Vujkovic-Cvijin et al., 2013; Dillon et al.,

2014; Li et al., 2016; Neff et al., 2018). Pretējus rezultātus aprakstīja *Rocafort* ar kolēģiem Āfrikas populācijā, kurā HIV-1 inficētiem pacientiem nenovēroja izmaiņas *Prevotella* daudzumā, tomēr ir jāņem vērā, ka pētījumā netika apskatīta iespējamā diētas atšķirību ietekme, kā arī Āfrikas populācijā kopumā ir vērojama būtiska *Prevotella* sugu dominance fēču mikrobiomā (Rocafort et al., 2019).

Vairāku pētnieku darbos fēču mikrobioma izmaiņas, kurām raksturīgs palielināts *Prevotella* un samazināts *Bacteroides* daudzums un kuras tiek izmantotas kā HIV izraisītas disbiozes pazīme, ir konstatētas vīriešiem, kuriem ir sekss ar vīriešiem (MSM) neatkarīgi no HIV statusa (Noguera-Julian et al., 2016; Kelley et al., 2017; Neff et al., 2018), turklāt HIV negatīviem MSM novēro ievērojami lielāku CD14⁺ monocītu aktivāciju salīdzinājumā ar HIV negatīvajiem heteroseksuāliem vīriešiem, kas norāda, ka MSM mikrobioms var būt ar iekaisumu veicinošām iezīmēm (Neff et al., 2018).

Bifidobacterium un *Clostridia* sugām ir aprakstīta pretiekaisuma darbība, to skaita samazinājums uztur hronisku iekaisumu HIV pacientiem. *Akkermansia* sugas baktērijām ir nozīmīga loma tauku un cukuru metabolismā, kā arī tās stimulē CD8⁺ T šūnu mediēto imūno atbildi, kas vērsta uz pretvēža imūnajiem modulatoriem (tādiem kā PD-1 un CTLA4), līdz ar to izmaiņas šīs sugas baktēriju daudzumā var būt saistāmas ar HIV asociētām metabolajām izmaiņām un CD8⁺ šūnu samazinātu efektivitāti. *Akkermansia* un *Clostridia* sugu samazinājums negatīvi korelē ar zarnu integritātes rādītājiem un mikrobu translokācijas marķieriem, kā, piemēram, attiecīgi kalprotektīns un sCD14 (Rocafort et al., 2019). Citos pētījumos tika konstatēta sCD14, kas ir sliktāku klīnisko rezultātu marķieris, un lipopolisaharīdu jeb endotoksīnu (LPS) rādītāju korelācija attiecīgi ar *Lanchnospira* un *Roseburia* lielāku daudzumu zarnās (Dillon et al., 2014; Verstrepen et al., 2016).

Noteiktu baktēriju sugu relatīvais daudzums zarnu gļotādās ir saistīts ar dažādu plazmas citokīnu un hemokīnu, ieskaitot IL-6, TNF- α , IL-10, lielumu. Piemēram, *Mutlu* ar kolēģiem konstatēja apgrieztu korelāciju starp IL-6 līmeni plazmā un *Bacteroides* sugu baktēriju relatīvo daudzumu zarnās, no kurām vismaz dažām ir pierādīta pretiekaisuma darbība (Mutlu et al., 2014). Nesenā pētījumā *Mingjun* ar kolēģiem līdzīgi aprakstīja dažādu iekaisuma citokīnu saistību ar baktēriju sugu daudzumu zarnu traktā, kā, piemēram, *Ruminococcaceae* un *Bacteroides* negatīvi korelēja ar TNF- α plazmā, bet *Gammaproteobacteria* relatīvais daudzums korelēja pozitīvi. Līdzīgi konstatēja arī IL-2 un IL-8 pieaugumu plazmā pacientiem, kuriem novēroja lielāku *Agathobacter* skaitu (Mingjun et al., 2022).

Zarnu mikrobiotai ir pierādīta loma arī mieloīdo šūnu iekaisuma citokīnu izraisītai T šūnu aktivizācijai. HIV pacientiem mikrobiota inducē paaugstinātu TNF- α un IL-6 veidošanos monocītos un bloķē TNF- α veicinātu T šūnu aktivāciju (Neff et al., 2018). Jau

iepriekš ir pierādīts, ka TNF- α un tā signalizācijas ceļam ir būtiska nozīme HIV infekcijas patogēnēzē (Herbein & Khan, 2008; Pasquereau, Kumar & Herbein, 2017).

Pieaugot pētījumu skaitam, palielinās arī relatīvi pretrunīgi pētījumu rezultāti par zarnu mikrobiotas α daudzveidības samazināšanos, mazinoties CD4⁺ T šūnu skaitam. Piemēram, *Mingjun* ar kolēģiem konstatēja, ka CD4⁺ T šūnu skaits asinīs būtiski neietekmē α daudzveidību, tomēr CD4⁺ T šūnu daudzuma korelācija ir novērota atsevišķu baktēriju sugu līmenī (Mingjun et al., 2022). *Guillen* ar kolēģiem aprakstīja samazinātu kopējo baktēriju gēnu daudzumu fēcēs, tomēr konstatēja, ka disbioze attīstās tikai zema CD4⁺ T šūnu skaita (< 500 šūnām/ μ L) gadījumā, turklāt risks būtiski pieaug, CD4⁺ T šūnu skaitam mazinoties zem 100 šūnām/ μ L (Guillen et al., 2018).

Ishizaka ar kolēģiem apstiprināja CD4⁺ T šūnu skaita saistību ar α daudzveidību. Pacienti ar zemu CD4⁺ T šūnu skaitu, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, bija samazināta α daudzveidība, kas atjaunojās, palielinoties vai normalizējoties CD4⁺ T šūnu skaitam asinīs, bet, neskatoties uz α daudzveidības atjaunošanos, saglabājās baktēriju kompozicionālās atšķirības starp grupām. Ar HIV inficētiem pacientiem bija lielāks *Negativicutes*, *Bacilli* un *Coriobacteria* sugu skaits, bet mazāks *Clostridia* sugu skaits, turklāt šie baktēriju sugu daudzumi korelēja ar iekaisuma citokīnu koncentrāciju asinīs (Ishizaka et al., 2021). Baktēriju sugas, kuru daudzumā novēro atšķirības starp pacientiem ar zemu un augstu CD4⁺ T šūnu skaitu, ir *Clostridium*, *Lachnoanaerobaculum* un *Firmicutes* (Mingjun et al., 2022). Turklāt *Clostridia* sugu skaita mazināšanās fēcēs korelē ar samazinātu CD4⁺ T šūnu skaitu perifērajās asinīs (Ishizaka et al., 2021; Mingjun et al., 2022), rezultātā, samazinoties anaerobajām *Clostridia* sugām, bet palielinoties fakultatīvi anaerobo baktēriju daudzumam, palielinās skābekļa daudzums zarnās un zarnu sienas caurlaidība, kas palielina Th1 inducētās iekaisuma reakcijas un stimulē citokīnu produkciju, tādējādi uzturot hronisku iekaisumu un imūno aktivāciju (Ishizaka et al., 2021).

Šie atklājumi apstiprina, ka ar HIV inficētiem pacientiem ir mazāks baktēriju daudzums zarnās, kā arī to sastāvs atšķiras no HIV neinficētiem cilvēkiem, turklāt izmaiņas zarnu trakta mikrobiotā un mikrobu daudzumā ir saistītas ar CD4⁺ šūnu samazinājumu GALT un CD8⁺ šūnu aktivāciju (Ishizaka et al., 2021; Mingjun et al., 2022). Kā arī, korelējot zarnu mikrobiotas specifiskām pazīmēm un HIV infekcijas progresijas indikatoriem, tiek apstiprināta tieša zarnu mikrobioma loma ar HIV inficētu pacientu sistēmiskās imūnās aktivācijas procesā.

1.3.5. Pretvīrusu terapijas ietekme uz mikrobu translokāciju un fēču mikrobiotu

Antiretrovirālai terapijai ir neaizstājama loma ar HIV inficētu pacientu veselības un dzīves kvalitātes uzlabošanā. Mazinot HIV vīrusu replikāciju, tā netieši ietekmē gan CD4⁺ T šūnu atjaunošanos, gan mazina CD8⁺ T šūnu aktivāciju, tādējādi mazinot kopējo imūnās sistēmas aktivāciju un ierobežojot oportūnistisku infekciju pievienošanos.

HIV infekcijas radītās izmaiņas zarnu trakta mikrobiotā jau agrīnās HIV infekcijas stadijās, ietekmējot lokālo un sistēmisko imūno aktivāciju, veicina HIV infekcijas progresēšanu, kā arī negatīvi ietekmē atbildes reakciju uz ART. Zarnu mikrobiotas sastāvu un tā daudzveidību ar HIV inficētiem un ART saņēmušiem pacientiem ietekmē dažādi faktori: ART ilgums, CD4⁺ šūnu skaits terapijas sākumā, terapijā izmantotie medikamenti un CD4⁺ T šūnu atjaunošanās GALT. Dažkārt pacientiem, kas ilgstoši saņem ART, zarnu mikrobiotas kompozīcija var sākt līdzināties HIV neinficētu indivīdu mikrobiotai (Dubourg et al., 2017). ART var pozitīvi ietekmēt zarnu mikrobiotas sastāvu, tomēr pat veiksmīgi ārstētiem HIV pacientiem tas reti pilnībā atgādina HIV negatīvu indivīdu mikrobiotas kompozīciju zarnās, kas var norādīt uz to, ka zarnu mikrobiotas izmaiņas var veicināt slimību patogēnēzi, kuras var attīstīties, neskatoties uz saņemto ART terapiju (Lazupone et al., 2013; Lazupone et al., 2014).

Pacientiem, kas saņem ART, zarnu mikrobiotas sastāvs ir līdzīgāks HIV neārstētiem pacientiem, salīdzinot ar HIV neinficētiem veseliem indivīdiem. *Lazupone* ar kolēģiem konstatēja mazāku *Bacteroides* un *Odoribacter* sugu daudzumu HIV inficētiem pacientiem, un šīs izmaiņas bija vērojamas arī ART saņēmušiem pacientiem. Atsevišķas baktērijas *Prevotella* ģintī, kā, piemēram, *Eubacterium bifforme*, atrod lielākā skaitā gan HIV ārstētiem, gan neārstētiem pacientiem. Lai gan HIV ārstētiem pacientiem šis pieaugums ir relatīvi mazāks, tomēr tas nesasniedz HIV negatīvu indivīdu rādītājus (Lazupone et al., 2014). Turklāt *in vitro* pētījumos *Eubacterium bifforme* spēj inducēt iekaisumu izraisošo citokīnu kaskādi (Lazupone et al., 2013).

Pacientiem ar sliktu imunoloģisko atbildes reakciju uz ART novēro arī lielāku *Enterobacteriaceae* sugu translokāciju uz asinīm, bet praktiski nevēro probiotisku baktēriju, tādu kā *Lactobacillus*, sugu translokāciju (Merlini et al., 2011). Turklāt ir pierādīta *Lactobacillus* imunomodulatorā un pretiekaisuma darbība, t. sk. supresējoša ietekme uz *Escherichia coli* aktivētu monocītu proiekaisuma citokīnu producēšanu (Cecchinato et al., 2008).

Kā aprakstīts iepriekš, HIV pacientiem novēro samazinātu a daudzveidību zarnās, bet pacientiem, kas saņem ART, tā var būt vēl izteiktāka. Mikrobiotas daudzveidības rādītājus ietekmē ne tikai HIV infekcija un tās radītais iekaisums zarnu traktā, bet arī ART medikamenti var radīt papildu negatīvu ietekmi. Turklāt samazināta a daudzveidība ir aprakstīta arī citu zarnu

iekaisīgu slimību vai stāvokļu gadījumos, ieskaitot diareju, kas var būt atsevišķu ART medikamentu blakusefekts (Lazupone et al., 2014).

Interesantu faktu atklāja *Nganou-Makamdop* ar kolēģiem, konstatējot, ka HIV pacientiem, kuriem uzsākta ART, pakāpeniski gada laikā mainās baktēriju sastāvs zarnu traktā, jo īpaši *Serratia* sugu attiecība pret citām baktērijām. Padziļināti pētot translocēto baktēriju sastāvu asinīs, pētnieki konstatēja, ka tādas baktēriju sugas kā *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* un *Firmicutes* ir saistītas gan ar α , gan β daudzveidības izmaiņām gada laikā pēc ART uzsākšanas. Turklāt translocēto *Proteobacteria* sugu daudzums negatīvi korelē ar CD4:CD8 T šūnu attiecību, bet pozitīvi ar *Bacteroidetes* sugu daudzumu. Šie atklājumi apstiprina faktu, ka arī no zarnām translocēto mikroorganismu daudzveidība un daudzums korelē ar HIV infekcijas klīnisko iznākumu, balstoties uz CD4⁺ T šūnu skaitu un CD4:CD8 T šūnu attiecību (Nganou-Makamdop et al., 2021).

Interesants ir arī fakts, ka pacientiem, kuriem pēc terapijas uzsākšanas ar ART tika panākta laba virēmijas kontrole, t. i., nenosakāma HIV RNS asinīs, tika novērotas atšķirības zarnu mikrobiotas sastāvā jau pirms terapijas. Pacientiem ar labu atbildes reakciju uz terapiju bija augstāki *Bacteroides* skaita rādītāji, bet zemāki *Clostridiales*. Turklāt šiem pacientiem arī terapijas gaitā saglabājās augstāka *Bacteroidales/Clostridiales* attiecība, kā arī lielāka kopējā baktēriju gēnu daudzveidība zarnās (Borgognone et al., 2022).

1.3.6. Aknu slimības un zarnu mikrobiota

Pētījumos ir pierādīta zarnu-aknu ass divvirzienu ietekme. Tas saistīts ar žults sekrēciju un asinsriti caur portālo sistēmu, caur ko mikroorganismi vai to sekretētie produkti var nonākt no zarnu trakta aknās (Hou et al., 2022). Arī zarnu mikrobiotas daudzveidības un sastāva izmaiņas ir cieši saistītas ar aknu slimībām zarnu-aknu ass savstarpējās saiknes dēļ (Albillo, de Gottardi & Rescigno, 2020). Zarnu mikrobioma ietekme uz aknu funkcionālajiem procesiem notiek ar vairāku mehānismu palīdzību, kā, piemēram, žultsskābju metabolisma regulācija, zarnu sieniņas caurlaidības izmaiņas, hronisks iekaisuma process un imūnās atbildes mediēšana. Zarnu mikrobiotas produkti un šūnu komponentes, nonākot aknās caur sistēmisko cirkulāciju, ietekmē aknu funkciju un modulē aknu slimību patogēnētiskos procesus, kā arī pretēji – dažādiem aknu produktiem nonākot zarnās, tiek ietekmēta zarnu mikrobiotas kompozīcija un zarnu sieniņas funkcionālā integritāte (Tripathi et al., 2018; Mizutani et al., 2022). Ir zināms, ka hepatocīti mijiedarbojas ar holangiocītiem, kas ietekmē žultsskābju profilu žultsceļos (Wellhoner et al., 2021), savukārt žultsskābju profila izmaiņām var būt tieša ietekme uz mikrobu daudzveidību un to struktūru zarnu traktā (Parasar et al., 2019). Žultsskābes tieši mijiedarbojas ar zarnu mikrobiotu, saistoties pie farnesoīda X receptora. Tās inducē

antimikrobiālu peptīdu produkciju, kuri ir tieši iesaistīti zarnu mikrobiotas pāraugšanas inhibēšanā un arī zarnu barjeras disfunkcijas regulācijā (Inagaki et al., 2006; Parseus et al., 2017; Albillos, de Gottardi & Rescigno, 2020). Disbalanss starp žultsskābēm un zarnu mikrobiotu ierosina imūnās atbildes kaskādi, kas sekmē aknu slimības progresēšanu (Tripathi et al., 2018), savukārt iekaisums aknās izraisa imūnās atbildes reakcijas, veicinot izmaiņas zarnu mikrobiotas sastāvā (Macpherson & Slack, 2007).

Pašreizējā izpratne par vairāku aknu slimību patogēnēzi tiek saistīta ar iekaisumu veicinošiem procesiem saimniekorganismā. Zarnu trakta disbioze un palielināta zarnu sieniņu caurlaidība ir nozīmīgākie faktori, kas potencē dažādu zarnu trakta mikroorganismu un to produktu, t. sk. gramnegatīvo baktēriju, šūnu sienas endotoksīnu, β -glikānu no sēnītēm un baktēriju DNS translokāciju no zarnām uz asinsriti (Tripathi et al., 2018), kas veicina imūno aktivāciju, iekaisuma procesus un palielina aknu bojājumu (Marchetti et al., 2012; Tilg, Cani & Mayer, 2016). Šos ar mikrobiem saistītos molekulāros modeļus (MAMPs) atpazīst aknu šūnu imūnie receptori Kupfera šūnās un zvaigžņveida šūnās, kā arī zarnu sieniņas *lamina propria*, kas iniciē un uztur iekaisuma kaskādi, kurai, pakāpeniski progresējot, attīstās aknu fibroze un ciroze (Csak et al., 2011; Seki & Schnabl, 2012; Anand, Zarrinpar & Loomba, 2016). Iepriekš pierādītā saikne starp zarnu veselību un vairākiem jaunveidojumu veidiem liecina par potenciālu mikrobiotas lomu hepatocelulāras karcinomas (HCC) attīstībā (Schwabe & Jobin, 2013). Turklāt aknas un mikrobiota iesaistās ksenobiotiku, tostarp kancerogēnu (piemēram, ar uzturu iegūta 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f] hinolīna), kopīgā metabolismā, kas var neatkarīgi radīt noslieci uz HCC (Koppel, Maini Rekdal & Balskus, 2017).

Zarnu sieniņa ierobežo mikrobu un to molekulu iekļūšanu sistēmiskajā cirkulācijā, bet vienlaikus selektīvi nodrošina barības vielu aktīvu transportu. Būtiskākie barjeras komponenti ir mucīns, antibakteriālie lektīni, imunoglobulīni, jo īpaši IgA, un zarnās esošās komensālās baktērijas. Tiekot bojātam kādam no šiem elementiem, tiek ietekmēta zarnu barjeras integritāte. Zarnu sieniņas caurlaidību būtiski palielina iekaisums zarnās un disbioze, kas ir tieši saistīta ar diētu, alkohola lietošanu, ilgstošu antibiotiku lietošanu un imūnmediētām iekaisīgām slimībām, piemēram, iekaisīgas zarnu slimības (Tripathi et al., 2018).

Palielināta zarnu sieniņas caurlaidība ir aprakstīta dažādu aknu slimību gadījumā. Aknu bojājums savukārt ir asociēts ar tievo zarnu baktēriju pāraugšanu un disbiozi resnajās zarnās (Philips et al., 2017). Šīs izmaiņas noved pie MAMPs translokācijas portālajā cirkulācijā, kur, nonākot aknās, tie inducē lokālu iekaisumu Kupfera un zvaigžņveida šūnās (Isayama et al., 2006), un endotoksīni aktivē TLR-4 un TLR-9, kas ir primārie imūnās atbildes virzītāji (Isayama et al., 2006; Tripathi et al., 2018).

Mouzaki ar kolēģiem pacientiem ar nealkohola steatohepatītu konstatēja mazāku *Bacteroidetes* ģints baktēriju skaitu, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem (Mauzaki et al., 2013). Savukārt adipoziem pacientiem ar nealkohola taukaino aknu slimību novēro palielinātu *Lactobacillus* sugu un atsevišķu *Firmicutes* sugu daudzumu (Raman et al., 2013). Aknu cirozes pacientiem *Chen* ar kolēģiem aprakstīja samazinātu *Bacteroidetes* ģints baktēriju daudzumu, bet palielinātu *Fusobacteria* un *Proteobacteria* sugu skaitu (Chen et al., 2011).

1.3.7. HCV infekcijas ietekme uz fēču mikrobiotas kompozīciju un daudzveidību

HCV RNS daļiņas ir atrastas ne tikai asinīs, bet arī fēcēs, kas var norādīt arī uz tiešu vīrusa iedarbību uz zarnu mikrobiotu (Heidrich et al., 2016; Mizutani et al., 2022).

Par fēču mikrobiotas izmaiņām ar HCV inficētiem pacientiem pētījumos aprakstīti pretrunīgi rezultāti, pārsvarā atzīmējot samazinātu mikrobu daudzveidību un samazinājumu atsevišķās baktēriju sugās, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem (Aly et al., 2016; Inoue et al., 2018; Heidrich et al., 2018). Tomēr HCV pacientiem ir aprakstīta arī daudzveidības palielināšanās (Sultan et al., 2021). Šīs atšķirības var izskaidrot ar vairāku citu zarnu mikrobiotu ietekmējošu faktoru klātbūtni, kā, piemēram, rase, slimības stadija, dažādu medikamentu lietošana, HCV vīrusa genotips, diēta, alkohola lietošanas paradumi, smēķēšana un citi (Heidrich et al., 2016; Milosevic et al., 2021; Mizutani et al., 2022).

HCV pacientiem izmaiņas fēču mikrobiotā parādās jau agrīni, arī pacientiem ar subklīniski noritošu slimības gaitu. Sākotnēji novēro *Enterobacteriaceae* un *Bacteroides* sugu daudzuma palielināšanos. Slimībai progresējot, samazinās tādas komensālu baktēriju sugas kā, piemēram, *Lachnospiraceae* un *Ruminococcaceae*, ieskaitot *Clostridiales* sugas, bet novēro pieaugumu *Bacilli* sugas baktērijās, kuru nozīmīgākie pārstāvji ir *viridans* grupas streptokoki un laktobaciļi, kā arī *Veillonella* un *Alloprevotella* sugu baktērijas (Heidrich et al., 2018; Inoue et al., 2018). Izmaiņas pieaug HCV slimības attīstības gaitā, nozīmīgākās konstatējot pacientiem ar aknu cirozi un HCC. Turklāt aknu cirozes un HCC pacientiem konstatē arī augstāku fēču pH, kas ir izskaidrojams ar *Streptococcus viridans* grupas baktēriju kodētā ureāzes gēna palielināšanos un slāpekļa koncentrācijas pieaugumu fēcēs (Aly et al., 2016; Heidrich et al., 2018; Inoue et al., 2018).

Tiešas darbības antivirālie līdzekļi (DAA), kas šobrīd tiek plaši lietoti HCV ārstēšanā, iedarbojoties uz HCV olbaltumvielām, inhibē vīrusu replikāciju un eliminē tos no organisma. Šobrīd ir dati, kas liecina, ka mikrobiotas stāvoklis pirms terapijas ar DAA uzsākšanas ietekmē terapijas iznākumu (Virsedo-Berdices et al., 2022). Pacientiem ar neizteiktu aknu fibrozi bez cirozes mikrobiotas sastāvs pēc terapijas ar DAA atjaunojas un līdzinās veselu cilvēku mikrobiotai. Šiem pacientiem terapija ietekmēja arī α daudzveidību, kas uzlabojās pēc

ārstēšanas (Chuaypen et al., 2021; Honda et al., 2021; Wellhoner et al., 2021). Šādi dati parāda agrīnas terapijas nozīmību aknu funkcionālā stāvokļa un zarnu mikrobiotas uzlabošanā. Arī pētījumos ar HCV izraisītas cirozes pacientiem DAA terapija uzlaboja α daudzveidību, kā arī mazinājās potenciāli patogēno baktēriju (*Enterococcus*, *Enterobacteriaceae* un *Staphylococcus*) daudzums zarnās, turklāt zarnu mikrobiotas kompozīcija korelēja ar aknu fibrozes marķieriem. Lai arī terapijas rezultātā serumā nozīmīgi mazinās citokīnu un hemokīnu daudzums, tomēr zarnu caurlaidības un iekaisuma marķieri paliek neizmainīti (Ponziani et al., 2018). Savukārt *Bajaj* ar kolēģiem aprakstīja pretējus rezultātus – HCV pacientiem aknu cirozes stadijā pēc terapijas ar DAA nenovēroja uzlabošanos zarnu mikrobiotas sastāvā un daudzveidībā, kā arī nemazinājās iekaisuma marķieru lielums (Bajaj et al., 2016).

1.3.8. HIV un HCV koinfekcijas ietekme uz fēču mikrobiotas kompozīciju un daudzveidību

Šobrīd literatūrā ir tikai atsevišķi ziņojumi par HIV un HCV koinfekcijas ietekmi uz zarnu mikrobiotu. *Chuaypen* ar kolēģiem, salīdzinot HCV monoinficētus pacientus ar HIV/HCV koinfēcītiem, konstatēja nozīmīgi mazāku *Faecalibacteria* un *Blautia* sugu daudzumu koinfēcītiem pacientiem, savukārt pacientiem ar aknu cirozi koinfēcīto grupā bija lielāka *Lachnospira* sugas klātbūtne. Starp HCV monoinficētiem un koinfēcītiem ar HIV netika novērotas atšķirības α un β daudzveidībā (Chuaypen et al., 2020). Savukārt *Taylor* ar kolēģiem apraksta mazāku α un β daudzveidību koinfēcītiem pacientiem, salīdzinot ar HIV monoinficētiem (Taylor et al., 2020).

Chuaypen ar kolēģiem, turpinot pētniecību, konstatēja augstāku *Proteobacteria* daudzumu koinfēcītiem pacientiem, salīdzinot ar monoinficētiem vai veseliem cilvēkiem, kā arī HIV/HCV koinfēcītiem ART saņēmušiem un ar nenosakāmu HIV vīrusa klātbūtni asinīs bija nozīmīgi zemāka *Firmicutes-Bacteroidetes* attiecība, salīdzinot ar HCV monoinficētiem un veseliem cilvēkiem. Savukārt HCV terapija ar DAA uzlaboja zarnu mikrobiotas stāvokli, palielinājās α daudzveidība, kā arī konstatēja labvēlīgo baktēriju sugu, tādu kā *Parabacteroides* un *Subdoligranulum*, pieaugumu, bet patogēno baktēriju sugas *Eubacterium* samazinājumu (Chuaypen et al., 2021).

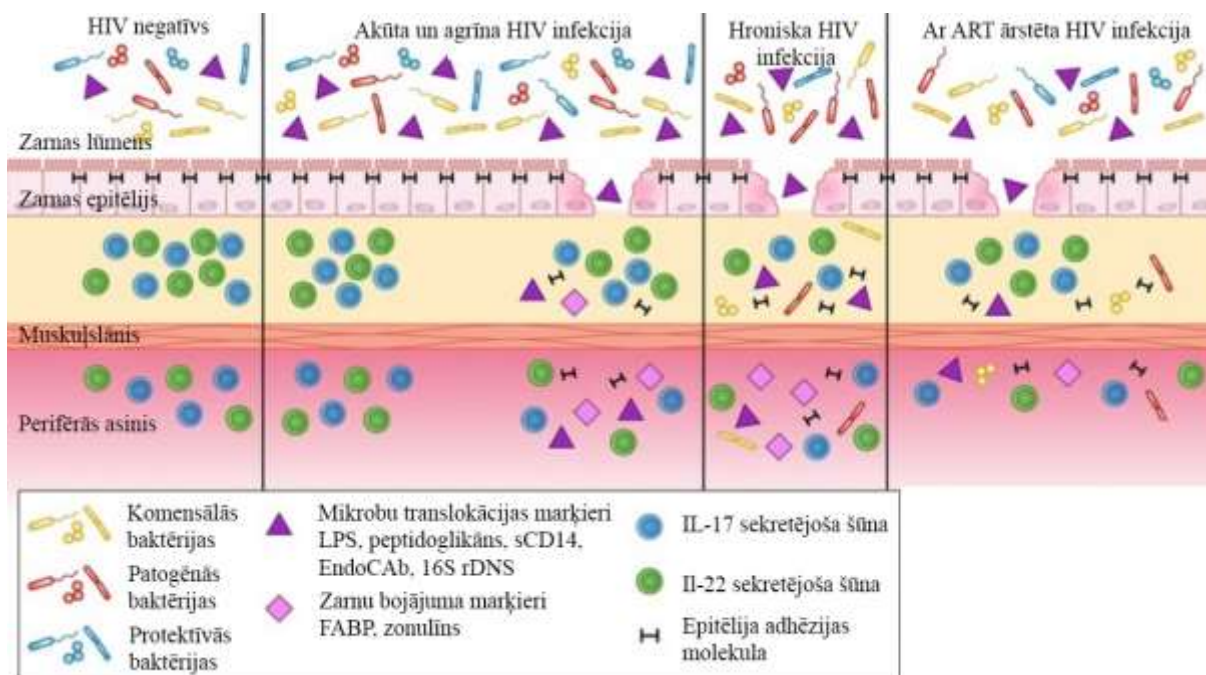
1.4. Mikrobu translokācija

Mikrobu translokācija tiek definēta kā mikrobu un to komponentu, tādu kā lipopolisaharīdu (LPS), peptidoglikānu, lipoteikoīdskābes, flagelīnu un baktēriju ribosomālā 16S RNS, translokācija no zarnām uz perifēro cirkulāciju bez redzamas bakterēmijas. Mikrobu translokāciju veicina strukturālas izmaiņas zarnās un zarnu integritātes zudums, persistējošs

iekaisums gļotādā, straujš imūnregulējošo šūnu un CD4⁺ T limfocītu skaita sarukums zarnās, samazināta intraluminālā imunoglobulīna A (IgA) koncentrācija, masīva enterocītu apoptoze un izmainīts zarnu mikrobioms (Sandler et al., 2011; Marchetti, Tincati & Silvestri, 2013; Sandler & Douek, 2012; Vassallo et al., 2012), turklāt tas notiek neatkarīgi no oportūnistisku infekciju klātbūtnes (Epple et al., 2009).

Par nozīmīgāko mikrobu translokācijas marķieri tiek uzskatīts LPS, kas ir gramnegatīvo baktēriju šūnu sienas komponents un Toll-līdzīgā receptora (TLR) 4 agonists (Beutler, 2000). LPS neitralizācijā kā pirmie darbojas zarnu gļotādas lokālie aizsargmehānismi, neļaujot baktēriju produktiem iziet no zarnu trakta, tālāk iesaistās aknu attīrošā funkcija, kā arī imūnās sistēmas aizsargmehānismi asinsritē, limitējot mikrobu translokācijas un LPS kā imūnās sistēmas aktivatora darbību (Caradonna et al., 2000; Schietroma et al., 2006). Veseliem indivīdiem mikrobu un to daļiņu pārvietošanos bloķē zarnu gļotādas strukturālā integritāte. No zarnām translocētie mikrobi un to produkti tiek fagocitēti *lamina propria* un mezenterīālajos limfmezglos, kā arī, pateicoties, piemēram, IL-17 un IL-22 producējošo imūno šūnu funkcijai, tā rezultātā neveidojas klīniski nozīmīga mikrobu translokācija.

Akūtas HIV infekcijas agrīnā etapā netiek novērotas būtiskas izmaiņas zarnu mikrobiotas sastāvā un mikrobu translokācijas rādītājos (Tincati, Douek & Marchetti, 2016) (1.1. attēls). Mikrobu translokācija sākas akūtas HIV infekcijas vēlīnā fāzē (~ 21–28 dienas pēc infekcijas sākuma). Infekcijas pirmajās dienās saglabājas organisma spēja kavēt mikrobu produktu nokļūšanu asinsritē. Lielākā daļa mikrobu tiek fagocitēti kuņģa-zarnu trakta *lamina propria* audu makrofāgos (Dubourg et al., 2017). Tomēr, slimībai progresējot, zarnu gļotādas Th 17 šūnu zudums veicina epiteliālās barjeras bojājumu (Klatt et al., 2012). Veidojas nozīmīgs bojājums zarnu epitēlija savienojumu veidojošajos olbaltumos (Tincati, Douek & Marchetti, 2016). Šīs izmaiņas notiek vienlaicīgi ar zarnu mikrobiotas kompozicionālām un funkcionālām izmaiņām, kā arī samazinās IL-17 un IL-22 sekretējošo šūnu, dendrītisko šūnu, makrofāgu un granulocītu daudzums zarnās, kas kavē mikrobu produktu savākšanu no zarnām, ļaujot tiem nokļūt asinsritē (Tincati, Douek & Marchetti, 2016; Dubourg et al., 2017).



1.1. attēls. **Izmaiņas zarnu traktā un mikrobu translokācija HIV neinficētiem un HIV inficētiem cilvēkiem** (adaptēts no Tincati, C., Douek, D. C., Marchetti, G. 2016.

Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *AIDS Research and Therapy*. 13 (19). doi.org/10.1186/s12981-016-0103-1)

HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss; ART – antiretrovirālā terapija; LPS – lipopolisaharīds, sCD14 – šķīstošais CD14 receptors; EndoCAB – antivielas pret endotoksīnu, 16S rDNS – ribosomālā 16S dezoksiribonukleīnskābe; FABP – taukskābes saistošais olbaltums; IL – interleikīns.

Mikrobu translokācijas produkti izraisa spēcīgas iekaisumu veicinošas reakcijas, aktivizējot vairākus receptorus: nukleotīdus saistošo oligomerizācijas domēnu 1 (NOD1) un NOD2, kā arī Toll-līdzīgu receptoru (TLR) 2, TLR4, TLR5, TLR6 un TLR9, kurus ekspresē dažādas šūnas. Iedzimtās imunitātes šūnas, piemēram, monocīti, makrofāgi un dendrītiskās šūnas, saistoties ar šiem receptoriem pie mikrobu komponentēm, aktivē signālkaskādi, izraisot iekaisumu veicinošu citokīnu – interleikīna (IL) 1 β , IL-6, audzēja nekrozes faktora (TNF) α un I tipa interferonu (IFN), tostarp IFN α un IFN β , – veidošanos. Lai gan šīs iekaisuma atbildes reakcijas var būt labvēlīgas un ir būtiskas akūtu infekciju gadījumā, tomēr HIV infekcijas gadījumā tās veicina slimības progresēšanu (Sandler & Douek, 2012).

Pētījumā ar primātiem *Estes* ar kolēģiem pierādīja, ka ar SIV inficētiem rēzus makakiem mikrobu translokācija ir saistīta ar zarnu epitēlija barjeras integritātes sabrukumu, turklāt gļotādas bojājuma apjoms korelēja ar mikrobu translokācijas apmēru, tādējādi radot iekaisuma citokīnu veidošanos un makrofāgu disfunkciju fagocitēt translocētos mikrobu produktus. Turpretī šāds fenomens netika novērots to sugu primātiem, kuriem SIV infekcija neprogresē līdz AIDS stadijai un kuriem ir konstatēta minimāla imūnā aktivācija. Autori, izmantojot imunohistoķīmiju un fluorescences mikroskopiju, konstatēja *Escherichia coli* LPS klātbūtni resnās zarnas gļotādā jau agrīnā SIV infekcijas etapā, kas pakāpeniski turpināja pieaugt visas

hroniskās infekcijas laikā, norādot uz epitēlija barjeras disfunkciju. LPS klātbūtni konstatēja arī perifērajos limfmezglos un aknās, turklāt LPS daudzums perifērijā pozitīvi korelēja ar LPS zarnās, tādējādi apstiprinot zarnu mikrobu elementu sistēmisku izplatību (Estes et al., 2010).

Šie paši autori, turpinot izpēti par makrofāgu fagocitozes dinamiku hroniskas infekcijas fāzē, neatrada baktēriju šūnas zarnu makrofāgos (Estes et al., 2008). Šie atklājumi liecina, ka SIV / HIV inducētās mikrobu translokācijas patoģenēzē ir iesaistīta arī zarnu makrofāgu fagocītiskās funkcijas izsīkšana un ekstracelulāru mikrobu komponentu akumulācija.

1.4.1. Mikrobu translokācijas marķieri

Zarnu baktēriju un to produktu klātbūtni asinīs un to daudzumu var noteikt ar tiešām un netiešām metodēm. Pie tiešajiem mikrobu translokācijas marķieriem pieder baktēriju endotoksīns jeb lipopolisaharīds (LPS) un baktēriju ribosomālais 16S rRNS.

Ar netiešajām metodēm nosaka dažādas saimniekorganisma atbildes molekulas, kuras veidojas asinsritē zarnu patogēnu klātbūtnē, kā, piemēram, antivielas pret lipopolisaharīdu serdes antigēnu (EndoCAb), lipopolisaharīdus saistošo olbaltumu (LPB), šķīstošo CD14 (sCD14). Kā zarnu barjeras integritātes marķierus izmanto zarnu taukskābju saistošo olbaltumu (FABP) 2, haptoglobīnu un zonulīnu-1 un reģenerējošo saliņu atbrīvoto proteīnu-3a (angļu valodā – *regenerating islet-derived protein-3a*) (Abad-Fernandez et al., 2013; Marks et al., 2013; Hunt et al., 2014; Epeldegui et al., 2018; Ouyang et al., 2020).

Vairumā zinātnisko pētījumu publikācijās tiek izmantoti sCD14, EndoCAb antivielas un LBP, kuru noteikšanai izmanto imūnfermentatīvo noteikšanas (*Enzyme-linked Immunosorbent assay*, ELISA) metodi, ar kuru iegūtie rezultāti tiek uzskatīti par uzticamiem un viegli reproducējamiem. Savukārt LPS noteikšanā izmanto *Limulus* amebocītu lizātu (LAL) testēšanas metodi, kas ļauj noteikt LPS kvantitatīvi, tādējādi ļauj iegūt endotoksīnu koncentrāciju, kas ir tiešs endotoksēmijas parametrs. Tomēr visām šīm metodēm piemīt būtiski limitējoši faktori, piemēram, LPS testēšanas metode ir tehniski ļoti sarežģīta gan iespējamās paraugu kontaminācijas, gan atsevišķu plazmā esošo komponentu inhibējošās darbības dēļ. Turklāt LPS ir atrodams tikai gramnegatīvās baktērijās, līdz ar to tas ir papildus limitējošs faktors, jo atspoguļo tikai gramnegatīvo baktēriju translokāciju (Abad-Fernandez et al., 2013; Marchetti et al., 2013). 16S rRNS ļauj noteikt gan grampozitīvo, gan gramnegatīvo baktēriju klātbūtni asinīs, tomēr tehniski tā noteikšanu var traucēt asinīs esoša DNS kontaminācija. sCD14 var būt paaugstināts arī ar HIV nesaistītu slimību gadījumos (Abad-Fernandez et al., 2013).

1.4.2. Lipopolisaharīds (endotoksīns)

Lipopolisaharīds (LPS) jeb endotoksīns ir gramnegatīvu baktēriju šūnas sienas komponents, kas tiek producēts zarnās, baktērijām ejot bojā. Tālāk tas tiek absorbēts zarnu kapilāros, un nelielās koncentrācijās to var konstatēt asinīs arī veseliem cilvēkiem.

Cirkulējošie LPS saistās galvenokārt pie lipoproteīnu saistošā olbaltuma (LBP). Šim kompleksam savukārt piemīt augsta afinitāte pret CD14 receptoriem, kas ir atrodamī uz nobriedušiem monocītiem un makrofāgiem, piemēram, Kupfera šūnām (Meiler et al., 2005). LPS saistoties ar šķīstošo sCD14 un mieloīdās diferencēšanas (MD)-2 TLR4 kompleksu, tiek stimulēta IL-6, IL-1, TNF un I tipa interferonu sintēze (Sandler et al., 2011).

Veseliem cilvēkiem LPS tiek ātri izvadīts no asinsrites, pateicoties dažādiem mehānismiem: LPS-LBP kompleksu izveidei, EndoCAb antivielu darbības rezultātā, kā arī tas tiek transportēts uz augsta blīvuma lipoproteīniem, kur to atbrīvo sCD14 (Sandler et al., 2011).

Šķērsriezuma pētījumā, kurā salīdzināja 227 ar HIV inficētus pacientus ar 15 kontroles grupas indivīdiem, Jiang ar kolēģiem pierādīja, ka HIV infekcija izraisa augstāku LPS un baktēriju 16S rRNS līmeni plazmā un ka šīs vērtības ir saistītas ar T šūnu aktivācijas marķieriem, tādiem kā CD38⁺ un HLA (Jiang et al., 2009).

HIV infekcijas gadījumā LPS korelē ar sistēmisko imūno aktivāciju, palielinātu CD38⁺ HLA-DR⁺ proporciju CD8⁺ T šūnās, palielinātu interferona alfa līmeni plazmā, kā arī LPS atspoguļo mikrobu translokāciju (Brenchley et al., 2006a; Vasallo et al., 2012).

Pastāvīga augsta LPS klātbūtne asinsritē HIV pacientiem izraisa antivielu pret LPS serdes proteīnu, īpaši IgM (IgM EndoCAb), patēriņu un attiecīgi samazinājumu, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem (Marchetti et al., 2013; Dinh et al., 2015; Epeldegui et al., 2018), turpretī palielinās LBP un sCD14 daudzums, kā arī pieaug makrofāgu aktivitāte un dažādu citokīnu un hemokīnu ražošana (Epeldegui et al., 2018). Marchetti ar kolēģiem pētījumā konstatēja, ka hroniskas HIV infekcijas pirmajos gados cirkulējošā LPS daudzums cieši un pozitīvi korelē ar slimības progresēšanu neatkarīgi no CD4⁺ T šūnu skaita un HIV virēmijas lieluma (Marchetti et al., 2013). Pacientiem ar izteikti augstiem LPS rādītājiem vidējais laiks līdz klīniski nozīmīgiem notikumiem, saistītiem ar HIV infekcijas progresēšanu, bija 1,5 gadi, salīdzinot ar 4 gadiem pacientiem ar zemākiem LPS līmeņiem (Marchetti et al., 2011).

Pretēji dati tika aprakstīti Merlini un kolēģu pētījumā, kurā nekonstatēja mikrobu translokācijas marķieru, tādu kā LPS, EndoCAb antivielu un LBP, asociāciju ar HIV slimības progresēšanu, kā iespējamu cēloni minot HIV infekcijas radītā iekaisuma procesa dominēšanu pār mikrobu translokāciju un tās izraisīto imūno aktivāciju (Merlini et al., 2021).

Uzsākot ART, mazinās cirkulējošā LPS līmenis asinīs, tomēr tas visbiežāk nerasniedz HIV neinficētu veselu cilvēku rādītājus (Brenchley et al., 2006; Marchetti et al., 2008; Jiang

et al., 2009). Pacienti ar ART imunoloģisku neveiksmi ($CD4^+$ T šūnu skaits ≤ 200 šūnas/ μ L) saglabājas augsti LPS līmeņi, neskatoties uz nenosakāmu HIV RNS klātbūtni asinīs (Marchetti et al., 2008; Cassol et al., 2010).

1.4.3. Lipopolisaharīdus saistošais olbaltums

Lipopolisaharīdus saistošais olbaltums (angļu valodā – *lipopolysachharide binding protein*) (LBP) ir akūtās fāzes proteīns, tas pārsvarā tiek sintezēts aknās, bet mazākā daudzumā to producē arī plaušu, kuņģa-zarnu trakta un nieru epitēlijšūnas (Klein et al., 1998). Tā izdali stimulē IL-1, IL-6, kā arī LPS. LBP piemīt unikāla spēja atpazīt LPS multimerus tūlīt pēc LPS nokļūšanas asinīs, LBP saistās ar LPS, un tikai šādu kompleksu spēj atpazīt t. s. LPS receptori – membrānu un šķīstošais CD14, MD-2 un TLR-4 receptori, kā rezultātā tiek aktivēta intracelulāru procesu kaskāde, ko mediē vairāki mehānismi, kā, piemēram, kodolu faktora kapa B (NF-kB) aktivācijas un iekaisuma citokīnu produkcijas (Anderson, 2000; Nystrom et al., 2015). Pieaugot LPS daudzumam asinīs, LBP neitralizē LPS, rezultātā mazinot iekaisuma citokīnu izdali (Nystrom et al., 2015).

1.4.4. Baktēriju ribosomālais 16S rRNS

Baktēriju vai to degradācijas produktu klātbūtni asinīs var noteikt, izmantojot arī ribosomālo 16S rRNS.

Ar HIV neinficētiem cilvēkiem asinīs 16S rRNS parasti nav atrodams. HIV inficētiem pacientiem tas var būt asinīs nosakāmā daudzumā. Piemēram, *Jiang* ar kolēģiem konstatēja, ka visiem pētījumā iesaistītajiem ar HIV inficētiem pacientiem 16S rRNS ir nosakāms asinīs, turklāt pacientiem, kuri ilgstoši saņēma ART, baktēriju 16S rRNS līmeņi bija zemāki nekā ART nesaņēmušiem HIV pacientiem, tomēr tie bija nosakāmi. Nozīmīga tieša asociācija tika konstatēta starp baktēriju 16S rRNS un HIV RNS līmeni plazmā terapiju nesaņēmušiem pacientiem, salīdzinot ar ART grupu. Kā arī netika konstatēta asociācija starp $CD4^+$ T šūnu skaitu un 16S rRNS līmeni (*Jiang* et al., 2009).

1.4.5. CD14 un šķīstošais CD14

CD14 ir glikosilfosfotidilinositola saistīts membrānu glikoproteīns (mCD14), kas tiek ekspresēts galvenokārt uz monocītiem un makrofāgiem, t. sk. Kupfera šūnām aknās, bet to atrod arī uz neitrofilajiem leukocītiem. CD14 eksistē arī šķīstošā formā (sCD14), kas ir nosakāms asinīs. Uz šūnu membrānām esošais CD14 saistās ar LPS un citiem nemikrobiāliem ligandiem LBP klātbūtnē, kā rezultātā tiek aktivizēti dažādi Toll-līdzīgie receptori un iekaisuma procesu

veicinošas kaskādes. sCD14 spēj tieši piesaistīt LPS, tādējādi uzlabojot atbildes reakcijas pret LPS šūnās, kurās nav mCD14 (Lien et al., 1998).

Iekaisuma vai infekcijas gadījumā IL-6 inducē sCD14 ekspresiju un atbrīvošanos, rezultātā sCD14 tiek uzskatīts par akūtās fāzes proteīnu, kas paaugstinās dažādu akūtu un hronisku iekaisuma slimību un infekciju gadījumos. Tāpat kā mCD14, sCD14 spēj izraisīt LPS aktivāciju mCD14 negatīvās šūnās, kā, piemēram, endotēlija un gludās muskulatūras, kā dēļ CD14 paaugstinās arī aterosklerozes gadījumā. sCD14 paātrina LPS pārnesanu no micellām uz lipoproteīniem, kā arī uzlabo ar monocītiem saistītā LPS atbrīvošanu, pārnesot to uz plazmu un lipoproteīniem tālākai eliminācijai, kā rezultātā samazinās celulārā atbildes reakcija, piemēram, TNF un IL-6 sintēze (Meiler et al., 2005; Reiner et al., 2012).

Veseliem cilvēkiem sCD14 arī ir nosakāms asinīs. Paaugstinātus sCD14 novēro slimību, kurām ir raksturīga endotoksēmija vai kuras tiek aktivētas endotoksēmijas dēļ, gadījumos, tādos kā reimatoīdais artrīts, hepatīts, sepse un sistēmas sarkanā vilkēde, tomēr ne visās situācijās, kurās paaugstinās akūtās fāzes iekaisuma marķieri, tostarp pēc lielām ķirurģiskām operācijām vai vīrusu infekciju gadījumā (Lien et al., 1998; Sandler et al., 2011). Augstākus sCD14 rādītājus novēro arī pārmērīgas alkohola lietošanas gadījumā, un tas tiek asociēts ar gēnu polimorfismu gēna reģionā, kas kodē CD14 (-159C/T) (Sandler et al., 2011). Šī paša gēna polimorfisms tiek asociēts ar augstākiem sCD14 rādītājiem hroniska C vīrusa hepatīta pacientiem (Meiler et al., 2005).

Vairākos pētījumos ir pierādīts, ka HIV infekcija inducē sCD14 ekspresiju un ir prognostisks marķieris ar HIV inficētiem pacientiem (Lederman et al., 2011; Marchett et al., 2011; Sandler et al., 2011; Merlini et al., 2021). *Lederman* un kolēģu pētījumā, kurā salīdzināja HIV pacientus ar vai bez imunoloģiskas neveiksmes ($CD4^+ < 200$ šūnām/ μ L) ar veseliem cilvēkiem, konstatēja augstākus sCD14 rādītājus HIV pacientiem ar imunoloģisku neveiksmi nekā pārējās grupās (Lederman et al., 2011). HIV pacientiem ar nosakāmu vīrusa slodzi asinīs konstatē paaugstinātus sCD14 rādītājus, kuri var normalizēties ART rezultātā (Vyboh et al., 2015).

Lien ar kolēģiem secināja, ka ar HIV inficētiem pacientiem, kuriem konstatēja aktīvi noritošu slimības gaitu, bija augstāki sCD14 rādītāji, salīdzinot ar HIV inficētiem asimptomātiskiem pacientiem. Īpaši sCD14 rādītāji paaugstinās *Mycobacterium avium* (MAC) infekcijas gadījumā, salīdzinot ar citām oportūnistiskām infekcijām un patoloģijām, piemēram, *Pneumocystis jirovecii*, Kapoši sarkoma un *Toxoplasma gondii*. Pacientiem AIDS stadijā sCD14 bija nozīmīgi augstāki nekā pacientiem, kuriem nekonstatēja AIDS, turklāt paaugstināti sCD14 rādītāji bija asociēti ar pacientu nāvi (Lien et al., 1998). *Sandler* un kolēģu pētījumā ar HIV inficētiem pacientiem pierādīja, ka pacientiem, kuriem bija augstāki sCD14 rādītāji, bija sešas

reizes lielāks risks letālam slimības iznākumam, turklāt sCD14 rādītāji korelēja ar IL-6, CRO un D-dimēru līmeni asinīs (Sandler et al., 2011).

Arī LPS stimulācija inducē monocītu sCD14 sekrēciju (Landmann et al., 1996), palielinot sCD14 ekspresiju 2,5 reizes (Talwar et al., 2006), tādējādi norādot uz monocītu un makrofāgu aktivāciju. Savukārt augsti sCD14 rādītāji palielina CD38⁺ ekspresiju uz CD4⁺ vai CD8⁺ T šūnām, kas ir prognostisks rādītājs CD4⁺ T šūnu zudumam un bojāejai (Hunt et al., 2003).

sCD14 nozīmīgi korelē arī ar HIV RNS līmeni asinīs, pacientiem ar augstu HIV RNS vīrusu slodzi novēro augstākus sCD14 rādītājus (Marchetti et al., 2008; Sandler et al., 2011). Interesanti, ka šādu sakarību nekonstatēja CD4⁺ T limfocītu skaitam starp izdzīvojušiem un mirušiem pacientiem (Lien et al., 1998).

1.4.6. EndoCAb antivielas

EndoCAb ir T šūnu atkarīgo B limfocītu producētas dabīgi veidojušās antivielas pret LPS serdes antigēnu, kuras neitralizē LPS aktivitāti. Tās var atrast arī veselu cilvēku plazmā. Pēkšņas mikrobu translokācijas gadījumā, kā, piemēram, sepse, EndoCAb antivielas saistās pie LPS un izvada tos no cirkulācijas, kā rezultātā antivielu skaits mazinās. Hronisku mikrobu translokāciju, kādu novēro, piemēram, iekaisīgu zarnu slimību gadījumā, raksturo paaugstināti EndoCAb līmeņi, kas darbojas kā normāla humorāla atbilde uz LPS klātbūtni asinīs (Vassallo et al., 2012).

Pētījumā ar SIV inficētiem rēzus makakiem (*Rhesus macaque*) konstatēja ievērojami zemāku EndoCAb antivielu daudzumu akūtā SIV infekcijas fāzē, salīdzinot ar veseliem indivīdiem, turklāt antivielu līmeņi bija zemāki grupā ar progresējošu slimības gaitu, kas norāda, ka imūndeficītu vīrusu infekcijas gadījumā EndoCAb antivielu līmenis var būt nepietiekams, lai neitralizētu cirkulējošo LPS (Benchley et al., 2006a).

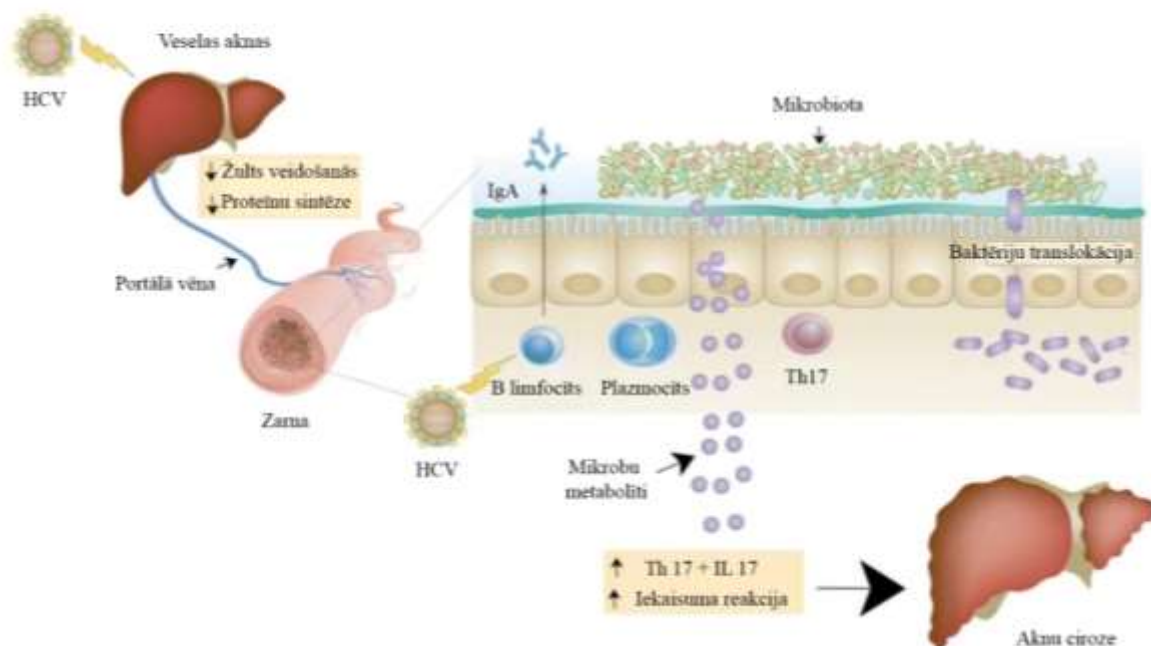
1.4.7. Mikrobu translokācija un aknu slimības

Patoloģiska mikrobu translokācija tiek novērota arī dažādu aknu slimību gadījumā, tomēr tā pieaug, progresējot aknu slimībai un jo izteiktāk cirozes stadijā. Mikrobu translokāciju cirozes pacientiem uztur mikrobiotas izmaiņas un baktēriju pāraugšanas sindroms, zarnu barjeras bojājums un GALT, kas uztur imūnās atbildes reakcijas pret translocētajiem mikroorganismiem (Wiest, Lawson & Geuking, 2014).

Ir pierādīts, ka dažādi baktēriju produkti, jo īpaši LPS, inducē un uztur aknu iekaisuma procesus. *Nanji* un kolēģi pētījumā ar dzīvniekiem konstatēja, ka LPS daudzums korelē ar aknu bojājuma smaguma pakāpi alkohola lietošanas rezultātā. Alkohols samazina Kupfera šūnu spēju mazināt endotoksīnus, kā arī palielina gļotādu caurlaidību. Aknās alkohola inducētas aknu slimības gadījumā izteikti palielinās reaktivitāte uz endotoksīnu klātbūtni, pat nelielās koncentrācijās, turklāt hroniska alkohola lietošana potencē endotoksīnu hepatotoksiskos efektus (*Nanji et al., 1993*).

Hronisku aknu slimību gadījumā samazinās endotoksīnu eliminācija aknās, progresējot aknu slimībai, pieaug mikrobu translokācija un attiecīgi paaugstinās LPS daudzums perifērajās asinīs. *Meiler* ar kolēģiem konstatēja, ka pacientiem ar hroniskām aknu slimībām LPS līmenis korelē ar slimības smaguma pakāpi un, mazinot endotoksīnu daudzumu, iespējams samazināt aknu bojājumu (*Meiler et al., 2005*).

Hroniska HCV gadījumā notiek vīrusu izraisīta hepatocītu arhitektoniskās struktūras destrukcija, kas, padziļinoties bojājumam, pakāpeniski izraisa izmaiņas zarnu homeostāzē. Tā rezultātā izmainās zarnu mikrobiotas daudzveidība un kompozicionālais sastāvs, savukārt atsevišķu mikrobu sugu producētie metabolīti var izraisīt pastiprinātu iekaisuma mediatoru izdali un veicināt mikrobu translokāciju (*Aly et al., 2016*) (1.2. attēls). Hroniskas HCV infekcijas gadījumā arī tiek novērota mikrobu translokācijas un ar to saistīto marķieru palielināšanās, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem. Palielināti plazmas LPS rādītāji paaugstina aknu slimības progresijas risku ar HCV inficētiem pacientiem – LPS saistoties ar Kupfera šūnām aknās, palielina iekaisumu un fibrozi veicinošo citokīnu, piemēram, TNF α , interleikīna 1 (IL-1), IL-6 un IL-12, ekspresiju (*Caradonna et al., 2002; Balagopal et al., 2008*). Rezultātā HCV infekcija ne tikai ierosina imūno atbildi pret virālu infekciju, bet arī uztur hronisku iekaisumu, imūno aktivāciju, imūno disfunkciju un paātrina cirozes attīstību (*Aly et al., 2016; Lattanzi et al., 2018; Medrano et al., 2021*).



1.2. attēls. Zarnu-aknu ass hroniska HCV pacientiem

(adaptēts no Aly et al. 2016. Gut microbiome alterations in patients with stage 4 hepatitis C. *Gut Pathogens*. 8 (42). doi.org/10.1186/s13099-016-0124-2)

HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss; HCV – C hepatīta vīruss; IgA – imunoglobulīns A; IL – interleikīns; Th – T līdzētājšūna.

1.4.8. Mikrobu translokācijas un HIV ietekme uz aknu slimības progresēšanu ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem

Aknu slimības vēl aizvien turpina būt nozīmīgs nāves cēlonis ar HIV inficētiem cilvēkiem visā pasaulē, pārsvarā hronisku vīrusu hepatītu dēļ. Ar HIV inficētiem cilvēkiem ir augstāks risks hroniska B hepatīta vīrusa (HBV) un HCV koinfekcijām. Pēc akūtas HCV infekcijas 90 % HIV pacientu attīstās hronisks C hepatīta vīruss, kas ir daudz augstāks rādītājs nekā cilvēkiem bez HIV infekcijas, kam atbrīvošanās no vīrusa notiek vairāk nekā 30 % gadījumu (Sulkowski, 2007).

Ir zināms, ka hroniska HCV pacientiem fibroze attīstās lēni – vairāku gadu desmitu garumā (Francini et al., 2001), turklāt fibrozes attīstības ātrums variē atkarībā no infekcijas ilguma, vecuma inficēšanās brīdī, alkohola patēriņa, un ir zināms, ka vīriešiem tā parasti attīstās straujāk (Poynard et al., 1997; Benhamou et al., 1999). Pretēji tam pacientiem ar HIV / HCV koinfekciju novēro sešas reizes straujāku aknu slimības progresēšanu līdz cirozei un tās dekompensāciju (Tuyama et al., 2010), kā arī aknu slimības ir viens no lielākajiem nāves cēloņiem pacientiem ar HIV koinfekciju (Graham et al., 2001; Hernandez & Sherman, 2011; van der Helm et al., 2013).

HIV infekcijas klātbūtne palielina dažādus hroniska hepatīta gaitu negatīvi ietekmējošus faktorus, kā, piemēram, C hepatīta vīrusa replikāciju, aknu iekaisumu, hepatocītu apoptozi un mikrobu translokāciju, kā arī negatīvi ietekmē specifiskās imūnās atbildes reakcijas pret C hepatīta vīrusu (Medrano et al., 2021). Arī iedzimtiem ģenētiskiem faktoriem ir būtiska loma aknu slimības patoģenēzē HIV / HCV koinficētiem pacientiem. Piemēram, dabīgiem HIV vīrusa supresoriem, t. i., pacientiem, kuriem bez specifiskas HIV terapijas saglabājas zema HIV RNS slodze (< 400 šūnām/ml) asinīs, koinficētiem ar HCV, novēro augstāku spontānu atbrīvošanos no HCV, salīdzinot ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem, attiecīgi 23,3 % vs 6,5 % (Sajadi et al., 2010).

Ar HIV inficētiem pacientiem kopumā novēro augstāku HCV RNS slodzi asinīs, kas daļēji var tikt skaidrots ar $CD4^+$ un $CD8^+$ T šūnu atbildes reakciju uz infekcijas klātbūtni, tomēr liela nozīme ir arī paša HIV tiešai iedarbībai uz dažādām aknu šūnām (Tuyama et al., 2010; Hernandez & Sherman, 2011). Turklāt HIV asociēta imūnsupresija paātrina aknu slimību progresēšanu. Kā viens no faktoriem ir mikrobu translokācijas tiešā ietekme uz aknu šūnām, jo īpaši Kupfera šūnām, jo brīvi cirkulējošie LPS, veidojot kompleksus ar sCD14 un LBP, pie tām saistās (Medrano et al., 2021).

Tiešu HIV vīrusa negatīvo ietekmi uz aknu šūnām pierādīja *Blackard* ar kolēģiem, atklājot, ka HIV RNS daudzums asinīs ir asociēts ar palielinātiem FIB-4 skalas rādījumiem, kas ir netiešs aknu fibrozes rādītājs neatkarīgi no vīrusu hepatītu klātbūtnes, saņemtas ART vai alkohola lietošanas (Blackard et al., 2011). Arī *Abutaleb* un *Sherman*, izmantojot aknu blīvuma, kas arī ir aknu fibrozes netiešs rādītājs, mērījumus, aprakstīja sliktāku aknu stāvokli HIV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar veselīgiem pieaugušajiem (Abutaleb & Sherman, 2018).

HIV / HCV koinficētiem pacientiem novēro straujāku aknu fibrozes attīstību nekā HIV vai HCV monoinficētiem pacientiem. Pētījumos ir izteiktas dažādas hipotēzes par potenciālajiem fibrozes attīstības ātrumu ietekmējošiem faktoriem. Kā būtiskākie tiek minēta tieša vīrusu iedarbība uz hepatocītiem un zvaigžņveida šūnām aknās (Hernandez & Sherman, 2011), ART spēja kontrolēt HIV virēmiju, imūnās supresijas pakāpe, HIV inducētās imūnās aktivācijas ilgums un mērogs, ko lielā mērā uztur mikrobu translokācija no zarnām (Lackner, Mohan & Veazey, 2009) un antiretrovirālo medikamentu potenciālā hepatotoksicitāte (Maida et al., 2006; Bani-Sadr et al., 2008; Hughes et al., 2009; Arends et al., 2015).

Straujāka fibrozes attīstība tiek skaidrota arī ar tiešu HIV iedarbību uz aknu šūnām, saistoties pie CCR5 un CCR4 receptoriem, kuri tiek ekspresēti uz dažādām aknu šūnām, disbalansu starp $CD4^+$ un $CD8^+$ T šūnu aktivitāti, palielinātu IL-4, IL-5 un transformētā augšanas faktora α aktivitāti, kas netieši stimulē fibroblastu kolagēna depoziāciju. Straujāka

fibrozes attīstība tiek novērota arī pacientiem ar zemāku CD4⁺ T šūnu skaitu asinīs (Iannello et al., 2008; Hernandez & Sherman, 2011). Turklāt pētījumā HIV / HCV koinficētiem hemofilijas pacientiem CD4⁺ T šūnu samazinājums bija neatkarīgi asociēts ar pacientu nāvi (Rockstroh et al., 1996).

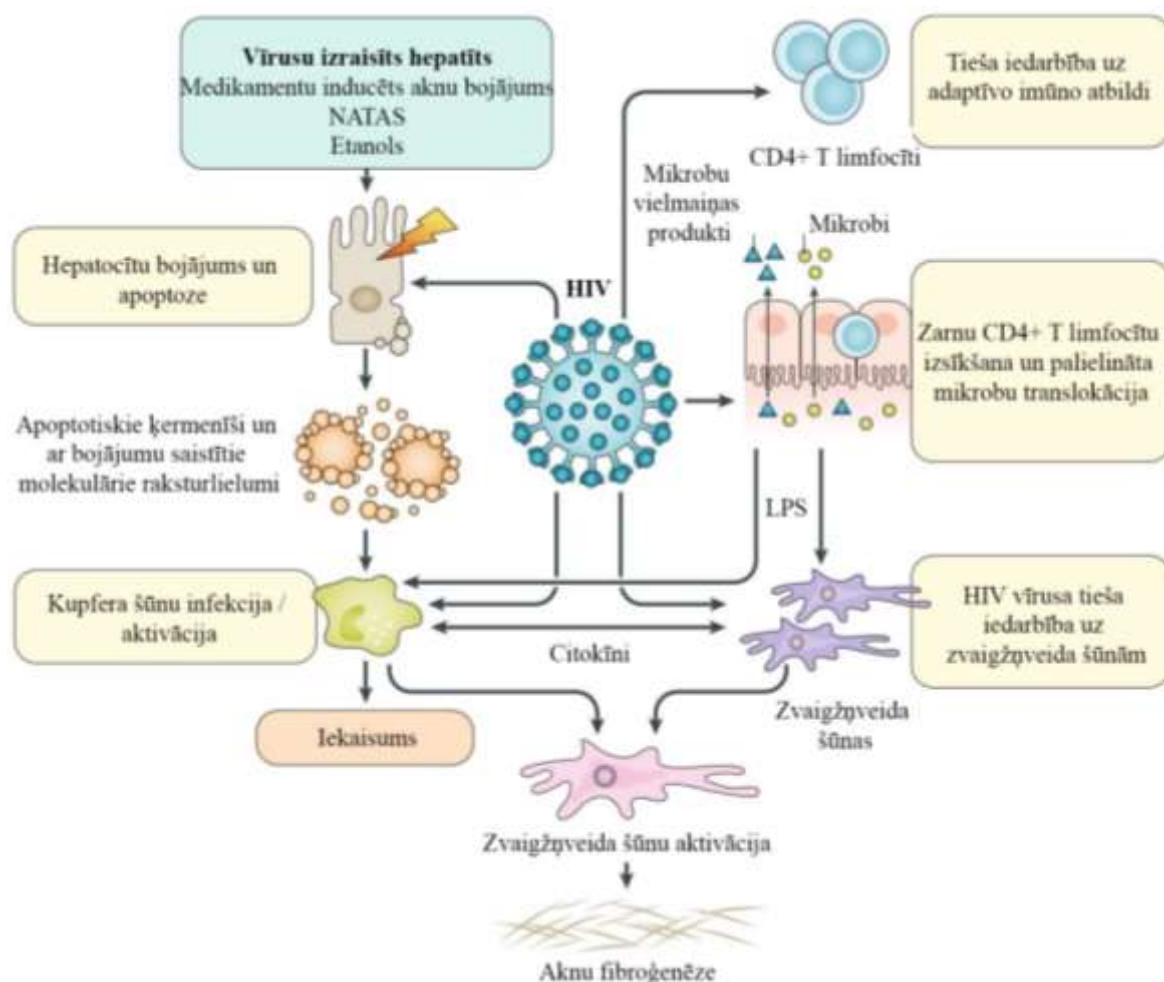
HIV terapija ir pierādījusi ietekmi arī HCV izraisītas aknu fibrozes attīstības kavēšanā. *Brau* un kolēģi aprakstīja lēnāku aknu fibrozes progresēšanu HIV / HCV koinficētiem pacientiem, kuri saņēma ART un kuriem bija nenosakāma HIV RNS slodze asinīs. Šai pacientu grupai aknu fibrozes rādītāji bija līdzīgi HCV monoinficētiem pacientiem. Autori izteica minējumu, ka HIV slodze asinīs, nevis CD4⁺ T šūnu skaits, ir neatkarīgs aknu fibrozes prognostisks faktors, norādot uz agrīni, pirms nozīmīga T šūnu nomākuma, uzsāktas HIV ART nozīmi aknu fibrozes attīstības kavēšanā (Brau et al., 2006).

Lai arī ir pierādīts, ka ART kavē aknu fibrozes attīstību, mazina klīniskās komplikācijas un nāves risku aknu slimības dekompensācijas dēļ, tomēr HIV / HCV koinficētiem pacientiem, neskatoties uz HIV terapiju, saglabājas augsti imūnās aktivācijas, mikrobu translokācijas, iekaisuma un koagulācijas rādītāji plazmā (Abutaleb & Sherman, 2018). Koinficētiem pacientiem ar augstākiem aknu fibrozes rādītājiem novēro augstākus iekaisuma (IL-6) un mikrobu translokācijas (sCD14) marķierus (French et al., 2013; Peters et al., 2014), bet, pārtraucot ART, turpināja pieaugt tikai IL-6, savukārt sCD14 nemainījās (Peters et al., 2014). IL-6 piemīt nozīmīga loma aknu reģenerācijas procesos, tomēr ilgstoši paaugstināts IL-6 līmenis var radīt pretēju efektu (Jin et al., 2006).

Ar HIV inficētiem pacientiem mikrobu translokācijas rādītāji ir cieši asociēti ar HCV izraisītas aknu slimības progresēšanu līdz cirozei (1.3 attēls). Pētījumā *Balagopal* ar kolēģiem konstatēja, ka HCV monoinfekcija neizraisa nozīmīgu mikrobu translokāciju HIV un HCV koinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem. Šiem pacientiem statistiski nozīmīgi paaugstinājās tikai sCD14 rādījumi, bet koinfekcijas gadījumā konstatēja vairāku mikrobu translokācijas marķieru paaugstinātus rādījumus, kā arī, analizējot aknu biopsijas materiālus, konstatēja straujāku aknu slimības progresēšanu (Balagopal et al., 2008). Citos pētījumos tika aprakstīti augstāki sCD14 rādītāji koinficēto grupā, salīdzinot ar HIV monoinficētiem pacientiem, bet atšķirības netika konstatētas LPS līmeņos, kas var būt saistīts ar augstāku sCD14 daudzumu, kas attiecīgi saista un eliminē LPS no cirkulācijas (French et al., 2013; Medrano et al., 2018). Savukārt *Shmagel* ar kolēģiem aprakstīja vairāku translokācijas un zarnu integritātes marķieru paaugstināšanos koinficēto grupā (LPS, sCD14, FABP) (Shmagel et al., 2016). Pretēji dati tika iegūti *Wurfel* un kolēģu pētījumā, kurā ART naiviem HIV / HCV koinficētiem pacientiem ar augstu CD4⁺ T šūnu skaitu lielāki sCD14 rādītāji bija neatkarīgi asociēti ar zemāku aknu slimības progresēšanas risku (Marchetti et al., 2011). Šāda

atrade var tikt pamatota ar sCD14 kavējošo ietekmi uz LPS saistīšanos ar fagocītu mCD14, tādējādi kavējot iekaisuma reakciju (Wurfel, Hailman & Wright, 1995).

HCV terapija, jo īpaši kopš praksē ir ieviesti tiešie antivirālie preparāti (DAA), ne tikai nozīmīgi ietekmē aknu stāvokli, bet arī mazina mikrobu translokāciju, kā rezultātā mazinās imūnās aktivācijas izraisītie kaitīgie efekti (Lattanzi et al., 2018). Kā pierādīja *Medrano* ar kolēģiem, HCV terapija ar DAA būtiski uzlabo aknu slimības stāvokli HIV un HCV koinficētiem aknu cirozes pacientiem, turklāt HCV eradikācija mazina iekaisuma un imūnās aktivācijas marķierus plazmā. Aknu stāvoklis pētījumā tika izvērtēts ar aknu cietības mērījumiem, aknu venozā spiediena gradientu un *Child-Pugh-Turcotte* skalu (*Medrano* et al., 2021). Savukārt pacientiem, kuriem nav pietiekama atbildes reakcija uz HCV terapiju, saglabājas palielināta mikrobu translokācija, salīdzinot ar pacientiem, kuriem ir laba atbildes reakcija uz terapiju un tiek panākta vīrusa eradikācija (*Vassallo* et al., 2009) (1.3. attēls).



1.3. attēls. **HIV vīrusa ietekme uz aknu šūnu iekaisumu un fibrozes veicināšana hronisku aknu slimību gadījumā** (adaptēts no Chamroonkul, N., Bansal, M. B. 2019. HIV and the liver. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 16 (1–2).

Iegūts no: doi: 10.1038/s41575-018-0085-7)

NATAS – nealkohola taukainā aknu steatoze; HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss; LPS – lipopolisaharīds.

1.5. Aknu fibrozes un apoptozes marķieri

Pētījumos ir pierādīts, ka aknu fibrozes pakāpe aknu slimību gadījumos korelē ne tikai ar slimības smagumu, bet arī ar aknu šūnu apoptozes intensitāti (Canbay, Friedman & Gores, 2004).

Aknu fibroze ir process, kura rezultātā notiek pastiprināta ekstracelulāru matricas proteīnu, ieskaitot kolagēnu, uzkrāšanās aknās ar pakāpenisku audu pārbūvi, kā rezultātā attīstās ciroze (Bataller & Brenner, 2005). Apoptoze ir augsti organizēts un ģenētiski kontrolēts šūnu nāves veids, kas ir būtisks gan embrionālās attīstības laikā, lai nodrošinātu pareizu organoģenēzi, gan arī pieaugušo organismā (Guicciardi & Gores, 2005). Pastāv pierādījumi, ka arī mikroorganismi var sekmēt apoptozi, paātrinot audu bojājumu, vai otrādi – to kavējot (Häcker, Kirschnek & Fischer, 2006). Pastiprinātas apoptozes gadījumā tai var novērot “patoloģisku” raksturu ar iekaisuma reakciju, kura stimulē fibroģenēzi. Kā atzīmē Canbay ar kolēģiem, pirmā hepatocītu reakcija uz dažādu virālo un toksisko aģentu iedarbību ir hepatocītu apoptoze (Canbay, Friedman & Gores, 2004).

Savstarpēja apoptozes un fibrozes saistība nesen tika parādīta *in vitro* pētījumā (Ganesan et al., 2018). Eksperiments atklāja, ka ar HIV un HCV vīrusu inficēto hepatocītu apoptoze pastiprinājās vēl vairāk, kad šūnas atradās gelā, kurš radīja aknu fibrozes blīvumam līdzīgu efektu. Šis modelis ļauj izskaidrot, kāpēc ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem aknu fibroze turpina progresēt arī veiksmīgas ART terapijas gadījumā. Pēc pētnieku domām, HIV / HCV koinfekcijas gadījumā izmainīts aknu blīvums aknu fibrozes dēļ sekmē hepatocītu apoptozi un tādējādi veicinot fibrozi (Ganesan et al., 2018).

1.5.1. Aknu fibrozes neinvazīvie marķieri

Aknu fibrozes diagnostikā un izvērtēšanā var izmantot gan invazīvas, gan neinvazīvas metodes. Par “zelta standartu” vēl aizvien tiek uzskatīta aknu biopsija, tomēr ne visos gadījumos tā ir iespējama, kā arī tai piemīt vairāki trūkumi un ir iespējamās komplikācijas, piemēram, asiņošana. Arvien lielāka nozīme aknu stāvokļa diagnostikā ir neinvazīvajām metodēm, pie kurām pieder gan attēldiagnostikas un aknu elasticitātes mērījumi, kā, piemēram, ultraskaņas elastogrāfija, magnētiskā rezonanse un citas, gan bioķīmisko tiešo un netiešo fibrozes un apoptozes marķieru noteikšana (Valva et al., 2016).

Pie tiešajiem aknu fibrozes rādītājiem pieder ekstracelulārā matricas sintēzes un degradācijas produkti, kā arī faktori, kas pastiprina un kavē fibroģenēzi aknās (hialuronskābe, glikoproteīni, kolagēni, metaloproteināzes un to inhibitori, laminīns, kolagēns IV, transformējošais augšanas faktors un citi). Pie netiešajiem marķieriem pieder rādītāji, kas ir

asociēti ar aknu funkciju un tieši nav saistīti ar fibrotisko procesu (aminotransferāzes, bilirubīns, apolipoproteīns A, albumīns, holesterīns, protrombīna laiks, transferīns, ceruloplazmīns, hepcidīns trombocītu skaits un citi) (Schmid et al., 2015). Neinvazīvus marķierus aknu fibrozes izvērtēšanai izmanto gan atsevišķi (Kim et al., 2016), gan kopā ar aknu biopsiju (Kelleher et al., 2005; Konerman et al., 2014; Schmid et al., 2015).

Aknu fibrozes novērtēšanai izmanto arī dažādus indeksus. Tie ietver tādus rādītājus kā AST, ALT, trombocītu skaits, gamma-glutamilttransferāze, holesterīns, hialuronskābe, metāloproteināzes un to inhibitori (TIMP-1), kā arī atsevišķi demogrāfiskie parametri, piemēram, vecums un dzimums. Kā biežāk izmantotie jāmin AST / ALT attiecība, FIB-4, APRI, fibrotests, *Forn* skala (ietver vecumu, trombocītu skaitu, gamma-glutamilttransferāzi, holesterīnu), FCI (fibrozes-cirozes indekss) un citi. Lielākā daļa no tiem ir pētīti arī hronisku vīrusu hepatītu gadījumā un HIV / HCV koinfekcijas pacientu grupās (Sterling et al., 2006; Laurrouse et al., 2007; Schmid et al., 2015; Kim et al., 2016; Klieman et al., 2016).

Pētniecībā viens no biežāk izmantotajiem indeksiem ir FIB-4 indekss, kura aprēķināšanā izmanto AST, ALT, trombocītu skaitu un vecumu. Galvenā FIB-4 indeksa priekšrocība ir iespējas prognozēt fibrozi, izmantojot rutīnas laboratoriskos testus.

Sterling ar kolēģiem ir noteikuši FIB-4 *cut-off* jeb robežlīmeņus (1,45 un 3,25) pacientiem ar HIV / HCV koinfekciju, ko vēlāk sāka izmantot arī citos pētījumos (Schmid et al., 2015; Kim et al., 2016; Klieman et al., 2016). FIB-4 < 1,45 norāda uz fibrozes neesamību vai fibrozi sākuma fāzē, bet FIB4 > 3,25 apstiprina izteiktu fibrozi un cirozi (F3-F4 pēc METAVIR klasifikācijas) ar specifiskumu 90 % un jutīgumu 65 % (Sterling et al., 2006). Turklāt FIB4 ≥ 3,25 šiem pacientiem ne tikai liecina par progresējošu fibrozi, bet prognozē negatīvu iznākumu, asociētu ar aknu slimību un palielinātu kopējo mirstību (Kim et al., 2016). Atsevišķos pētījumos ar HIV / HCV koinfēcītiem pacientiem ir pierādīts, ka fibrozi ≥ F3 stadijā var prognozēt pat zemāki FIB-4 rādītāji nekā 3,25 un *cut-off* līmenis var būt 1,94 (Schmid et al., 2015).

1.5.2. Aknu šūnu apoptozes rādītāji

Kā aknu šūnu bojāejas marķierus izmanto citokeratīnu 18 (CK18) un fragmentēto CK18, dažādus šūnu bojāejas receptorus un to ligandus (šķīstošie Fas receptori un Fas ligandi, šķīstošais TNF receptors un TNF- α , šķīstošie TRAIL receptori), augstas mobilitātes grupa -1 (HMGB-1), mikro RNS un mikrodaļiņas (Yilmaz, 2009).

1.5.3. Citokeratīns 18

Citokeratīni 18 (CK18) ir intracelulārie starpfilamenti – keratīnu saturoši olbaltumi, kuri atrodas epitēlijšūnu citoplazmatiskā skeletoņa filamentos un veido šūnas skeletu. Šobrīd ir zināmi vismaz 20 CK paveidi, kas daļēji ir orgānu specifiski, tomēr visvairāk CK18 atrodas hepatocītos. Šūnu apoptozes laikā citokeratīns 18 tiek sašķelts ar kaspāzēm dažādos fragmentos un tiek izsviests ekstracelulārajā telpā. Viens no tiem ir Asp396 (CK18 neoepitops), kuru var noteikt asinīs serumā ar monoklonālām antivielām M30 (CK18-M30). Veseliem cilvēkiem CK18 līmenis asinīs ir vidēji līdz 150 U/l (Biven et al., 2003; Yilmaz, 2009).

Biežāk CK18-M30 novērtējums tiek izmantots pacientiem ar nealkohola izcelsmes steatohepatītu, alkohola izraisītu aknu slimību, virālu hepatītu un HCC gadījumos (Aida et al., 2014; Kobayashi et al., 2017; Benmassaoud et al., 2018).

Hronisku vīrusu hepatītu gadījumā CK18 var paaugstināties jau pirms aknu enzīmu pieauguma, līdz ar to tā var būt jutīgāka metode agrīna aknu bojājuma noteikšanai (Bantel et al., 2004). Vairākos pētījumos ir apstiprināta korelācija starp aknu enzīmu aktivitāti, CK18 rādītājiem un ultrasonogrāfiski noteiktu aknu fibrozes stadiju (Yilmaz et al., 2009). Balstoties uz asociāciju starp CK18 un transferāžu līmeni serumā, var teikt, ka CK18-M30 var būt arī iekaisuma aktivitātes un aknu fibrozes pakāpes rādītājs (Parfieniuk-Kowerda et al., 2014).

Pētījumu ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem, kuros būtu iekļauta CK18 rādītāju analīze, nav daudz, tomēr esošie dati parāda augstākus CK18-M30 rādītājus koinficēto pacientu grupā, salīdzinot ar HIV monoinficētiem pacientiem, turklāt CK18 uzrādīja saistību ar AST, ALT un aknu fibrozes pakāpi (Rohrbach et al., 2014).

1.6. Mikrobu translokācija un mikrobiota HIV un HCV pacientiem un to loma imūnās aktivācijas uzturēšanā

Fēču mikrobiotas saistība ar mikrobu translokāciju raisījusi interesi daudzos pētniekos. Vairākos pētījumos ir demonstrēta atsevišķu baktēriju sugu korelācija ar imūnās aktivācijas marķieriem ar HIV inficētiem pacientiem (Vujkovic-Cvijin et al., 2013; Dillon et al., 2016), tomēr vēl aizvien nav pilnībā pierādīta šo korelāciju tieša saistība.

Tā, piemēram, Ellis un kolēģi pētījumā, kurā salīdzināja fēču mikrobiotas daudzveidību un mikrobu translokācijas marķierus ar HIV inficētiem un veseliem cilvēkiem, konstatēja kopējā universālā fēču 16S rRNS un sCD14 daudzumu negatīvu korelāciju, līdzīgi kā aprakstīts iepriekš ar CD4⁺ T šūnu skaitu GALT un CD8⁺ T šūnu aktivāciju zarnās. Šī pētnieku grupa nenovēroja asociāciju starp sCD14 līmeni asinīs un kādas īpašas zarnu mikrobiotas sugas daudzumu (Ellis et al., 2011).

Atsevišķām baktēriju sugām ir aprakstīta saistība gan ar CD4⁺ un CD8⁺ T limfocītu skaita izmaiņām, gan arī ar atsevišķu mikrobu translokācijas marķieru palielināšanos. Tā, piemēram, *Prevotella* dzimtas un atsevišķām *Proteobacteria* nodalījuma baktērijām ir saistība ar CD4⁺ T limfocītu aktivāciju un skaita samazinājumu (Ellis et al., 2011; Vujkovic-Cvijin et al., 2013; Dillon et al., 2014). Plazmas LPS un sCD14 līmeņu palielināšanās saistīta ar *Enterobacteriaceae* sugu relatīvā daudzuma palielināšanos zarnu mikrobiotā (Dihn et al., 2015; Dillon et al., 2016). HIV pacientiem vairākos pētījumos tiek aprakstīta *Proteobacteria* sugu baktēriju relatīvā daudzuma palielināšanās (Vujkovic-Cvijin et al., 2013; Dillon et al., 2014; Dihn et al., 2015; Sun et al., 2016), kā rezultātā tas, iespējams, ir saistāms ar mikrobu translokāciju un imūnās aktivācijas uzturēšanu, neskatoties uz pieaugošo publikāciju un datu skaitu, kā atzīst vairums pētnieku, ir grūti izdarīt nepārprotamus secinājumus.

2. Materiāli un metodes

2.1. Pētījuma dizains

Šķērsriezuma pētījums tika veikts Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas stacionārā “Gaiļezers” no 2016. gada jūnija līdz 2021. gada septembrim. Pētījumam tika saņemta Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas atbalsta fonda Medicīnisko un biomedicīnisko pētījumu ētikas komitejas atļauja (Nr. 6-A/16). Visi pacienti, kas tika iekļauti pētījuma izlasē, bija informēti par pētījuma norisi un bija parakstījuši brīvprātīgu piekrišanu dalībai pētījumā.

Iekļaušanas kritēriji pētījumā bija vecums virs 18 un zem 65 gadiem, apstiprināta HIV infekcija ar koinfekciju ar HCV vai bez tās, apstiprināta hroniska HCV infekcija, nav saņemta antibakteriālā terapija ilgāk par piecām dienām pēdējo triju mēnešu laikā.

Izslēgšanas kritēriji: iepriekš saņemta specifiska pretvīrusu terapija pret HIV un HCV infekciju, HBV infekcija, HIV asociētas bakteriālas oportūnistiskas infekcijas, grūtniecība, onkoloģiskas patoloģijas, cukura diabēts, hroniska sirds mazspēja, koronārā sirds slimība, iekaisīgas zarnu slimības, pacienti pēc orgānu transplantācijas, zināma hroniska, ar HCV nesaistīta aknu patoloģija, pacienti, kuri ilgstoši saņem glikokortikosteroīdus vai imūnsupresējošus medikamentus, hronisks alkoholisms, veģetārisms.

HIV diagnoze tika apstiprināta, pacientu asinīs atklājot specifiskās HIV antivielas, nosakot tās ar 4. paaudzes imūnfermentatīvo analīzi (*ELISA*), un veicot apstiprinošo testu, nosakot specifiskās antivielas pret HIV-1/2 (*Western blot* un *Immunoblot* metodes), un veicot kvantitatīvu HIV slodzes (HIV RNS) noteikšanu ar polimerāzes ķēdes reakciju.

HIV imūnais statuss tika noteikts, balstoties uz CD4⁺ T šūnu skaitu.

HCV statuss tika noteikts ar pozitīvām anti HCV antivielām (imūnfermentatīva analīze, *ELISA*) un apstiprināts ar HCV vīrusa kvalitatīvu noteikšanu (HCV RNS) ar polimerāzes ķēdes reakciju reālā laika režīmā vai nosakot HCV *Core Ag* (imūnfermentatīva analīze, *ELISA*) klātbūtni plazmā.

Pētījuma dalībniekiem, iesaistoties pētījumā, tika noteikti šādi parametri:

- 1) HIV infekcijas aktivitātes rādītājs – HIV slodze (HIV RNS);
- 2) imunoloģiskie rādītāji – CD4⁺ T limfocītu skaits, CD8⁺ T limfocītu skaits, CD4 / CD8 indekss. Rādītāji 1) un 2) noteikti tikai pacientiem ar HIV pozitīvu testu;
- 3) hematoloģiskie rādītāji (leikocīti, eritrocīti, trombocīti, hemoglobīns);
- 4) asins bioķīmiskie rādītāji, aknu fermenti – alanīnaminotransferāze (ALT), aspartātaminotransferāze (AST);

- 5) mikrobu translokācijas netiešie rādītāji – lipopolisaharīdus saistošais proteīns (LBP), šķīstošais CD14 receptors (sCD14), antivielas pret endotoksīnu IgM un IgG klases;
- 6) hepatocītu apoptozes marķieris – citokeratīna 18 fragments M30 (CK18-M30);
- 7) fēču mikrobiotas analīze;
- 8) ķermeņa masas indekss (ĶMI).

2.2. Materiālu iegūšana un uzglabāšana

2.2.1. Asins paraugu iegūšana un uzglabāšana

Asins paraugi standarta klīniskajiem un bioķīmiskajiem (pilna asinsaina, ALT, AST) laboratoriskajiem izmeklējumiem tika iegūti no venozajām asinīm. Izmeklējumi tika veikti tūlīt pēc materiālu savākšanas un nogādāšanas laboratorijā.

Ar baktēriju translokāciju saistīto marķieru (LBP, sCD14, EndoCAb IgM, IgG) asins izmeklējumu paraugi pēc nogādāšanas laboratorijā tika centrifugēti (1500 apgriezieni / min., 20 min.) istabas temperatūrā, atdalot plazmu un serumu, pēc tam tika sasaldēti –80 °C temperatūrā. Ar mikrobu translokāciju saistītie parametri tika testēti atsaldētos plazmas vai seruma paraugos, atbilstoši ražotāju rekomendācijām.

2.2.2. Fēču paraugu iegūšana un uzglabāšana

Hospitalizētiem pacientiem fēču paraugi tika iegūti, izmantojot sterilus trauciņus fēču savākšanai, un pēc to iegūšanas tie uzreiz nogādāti laboratorijā, kur tika sasaldēti –80 °C temperatūrā līdz tālākai izmeklēšanai.

Ambulatoriem pacientiem fēces tika iegūtas pašsavākšanas ceļā, izmantojot sterilus trauciņus fēču savākšanai. Fēces tika nogādātas laboratorijā stundas laikā, kur uzreiz sasaldētas –80 °C temperatūrā un uzglabātas līdz tālākai izmeklēšanai.

2.3. Laboratorisko parametru noteikšanas metodes

2.3.1. HIV vīrusa slodzes noteikšana

Vīrusu slodzes (HIV RNS) noteikšanai tika izmantotas venozās asinis ar antikoagulantu EDTA (7,5 ml), no kuras ar centrifugēšanu (1500 apgriezieni / min., 20 min.) istabas temperatūrā tika atdalīta plazma (1,5 ml). Plazmas sagatavošanu veica sešu stundu laikā pēc asins parauga noņemšanas.

HIV RNS tika noteikts ar polimerāzes ķēdes reakciju reālā laika režīmā. Testēšanā tika izmantots *AmpliPrep / COBAS TaqMan Specimen Pre-Extraction Reagent (SPEX) kits (Roche Molecular Systems, ASV)* reaģentu komplekts un automatizēts aparāts *COBAS TaqMan Analyzer*. HIV RNS noteikšanas diapazons: 20–10 000 000 kopijas / ml.

2.3.2. CD4⁺ un CD8⁺ T limfocītu noteikšana

Limfocītu subpopulāciju noteikšana tika veikta, izmantojot plūsmas citometrijas metodi. Analīzei tika izmantoti svaigi venozo asiņu paraugi ar antikoagulantu EDTA, *CD4 % easy count kit* un *CD8 % easy count kit* reaģentu komplekti, automatizēts citometrijas aparāts (*Sysmex Partec*). Katra parauga analīzei bija nepieciešami 20 µl venozo asiņu. Pirmstesta parauga sagatavošana un inkubācija notika ārpus automatizēta aprāta, atbilstoši ražotāja instrukcijai.

2.3.3. Lipopolisaharīdu saistošā olbaltuma noteikšana

Lipopolisaharīdu saistošā olbaltuma (LBP) līmenis tika noteikts ar *Human LBP (Lipopolysaccharide binding protein) ELISA (Hycult Biotech, Nīderlande)* reaģentu komplektu cilvēka LBP kvantitatīvai noteikšanai serumā. Analīzei tika izmantots asins serums, kas iegūts, centrifugējot venozās asinis (1500 apgriezieni / minūtē) 20 minūšu laikā istabas temperatūrā. Līdz testa noteikšanai visi asins seruma paraugi tika sasaldēti –80 °C temperatūrā.

Tests iekļāva šādus soļus:

- 1) četrkārtēja mikroplates iedobumu atmazgāšana;
- 2) standartu, kontroles komplektu un 1000 × atšķaidītu paraugu (pa 100 µl) iepilināšana mikroplates iedobumos, to inkubācija vienu stundu istabas temperatūrā;
- 3) iedobumu četrkārtēja atmazgāšana un biotinilētas antivielas pret cilvēka LBP pievienošana (100 µl) katrā iedobumā;
- 4) inkubācija vienu stundu istabas temperatūrā, pēc kā sekoja četrkārtēja atmazgāšana;
- 5) atšķaidīta streptavidīna-peroksidāzes konjugāta pievienošana (100 µl) katrā iedobumā, vienu stundu inkubācija istabas temperatūrā, četrkārtēja atmazgāšana;
- 6) hromogēna substrāta (tetrametilbenzidīna šķīduma) pievienošana (100 µl) un 30 minūtes – inkubācija istabas temperatūrā;
- 7) stop-reaģenta pievienošana (100 µl) un rezultātu nolasīšana, izmantojot spektrofotometru viļņa garumā 450 nm.

Reakcijas beigu etapā tika izmantota produkta kolorimetriskā detekcijas metode.

LBP noteikšanas diapazons: 4,4–50 ng/ml.

2.3.4. Endotoksīna serdes antivielu (EndoCAb) noteikšana

Endotoksīna serdes antivielu (EndoCAb) IgM un IgG līmeņi tika noteikti pacientu serumā, izmantojot imūnfermentatīvo testu (*ELISA*) (*Hycult*, Nīderlande). Analīzei tika izmantots asins serums, kas tika iegūts, centrifugējot venozās asinis (1500 apgriezieni / minūtē) 20 minūšu laikā istabas temperatūrā. Līdz testa noteikšanai visi asins seruma paraugi tika sasaldēti –80 °C temperatūrā.

Tests iekļāva četrus soļus:

- 1) standartu, kontroles komplektu un 50 × atšķaidītu paraugu (pa 100 µl) iepilināšana mikroplates iedobumos, to inkubācija vienu stundu 37 °C temperatūrā;
- 2) iedobumu četrkārtēja atmazgāšana un atšķaidīta streptavidīna-peroksidāzes konjugāta pievienošana (100 µl) katrā iedobumā, vienu stundu inkubācija 37 °C temperatūrā,
- 3) iedobumu četrkārtēja atmazgāšana un hromogēna substrāta (tetrametilbenzidīna šķīduma) pievienošana (100 µl) un 30 minūtes inkubācija istabas temperatūrā;
- 4) stop-reagenta pievienošana (100 µl) un rezultātu nolasīšana, izmantojot spektrofotometru viļņa garumā 450 nm.

Testa noteikšanas diapazons: IgM EndoCAb 0,05–3,5 U/ml, IgG EndoCAb 0,13–8 U/ml.

2.3.5. Šķīstošā sCD14 noteikšana

sCD14 līmenis asins serumā tika noteikts ar cietās fāzes imūnfermentatīvo metodi (*Quantikine ELISA Human CD14 Immunoassay, R7D Systems, ASV*). Analīzei tika izmantots asins serums, kas iegūts, centrifugējot venozās asinis (1500 × g) 20 minūšu laikā istabas temperatūrā. Līdz testa noteikšanai visi asins seruma paraugi tika sasaldēti –80 °C temperatūrā.

Tests iekļāva šādus soļus:

- 1) atšķaidīšanas buferšķīduma iepildīšana mikroplates iedobumos pa 100 µl;
- 2) standartu, kontroles komplektu un paraugu (pa 100 µl) iepilināšana mikroplates iedobumos, to inkubācija trīs stundas istabas temperatūrā;
- 3) sekojoša četrkārtēja atmazgāšana;
- 4) atšķaidīta streptavidīna-peroksidāzes konjugāta pievienošana (200 µl) katrā iedobumā, vienu stundu inkubācija istabas temperatūrā un četrkārtēja atmazgāšana;

- 5) hromogēna substrāta (tetrametilbenzidīna šķīduma) pievienošana (200 µl) un inkubācija 30 minūtes istabas temperatūrā;
- 6) stop-reagēnta pievienošana (pa 50 µl) un rezultātu nolasīšana, izmantojot spektrofotometru viļņa garumā 450 nm.

Nosakāmā koncentrācija viena testa ietvaros: 250–16 000 pg/ml.

2.3.6. Citokeratīna 18 fragmenta M30 noteikšana

CK18-M30 rodas epitēlijaudu apoptozes rezultātā no epitēlijaudu starpfilamenta CK18, aktivizējoties kaspāzei -3, -7 vai -9. CK18-M30 daudzums pacientu asins serumā tika noteikts ar cietās fāzes imūnfermentatīvo metodi (*M30 Apoptosense ELISA*, *PEVIVA*, *Zviedrija*). Pacientu asins serums tika iegūts, centrifugējot venozās asinis (1500 apgriezieni / minūtē) 20 minūšu laikā istabas temperatūrā. Līdz testa noteikšanai visi asins seruma paraugi tika sasaldēti -80 °C temperatūrā.

Tests iekļāva šādus soļus:

- 1) standartu, kontroles komplektu un paraugu (pa 25 µl) iepilināšana mikroplates iedobumos, to inkubācija istabas temperatūrā ar vienlaicīgu maisīšanu maisītājā;
- 2) iedobumu atmazgāšana un atšķaidīta specifiska konjugāta (M30) pievienošana (75 µl) katrā iedobumā;
- 3) četru stundu inkubācija ar vienlaicīgu maisīšanu un pieckārtēja atmazgāšana;
- 4) hromogēna substrāta (tetrametilbenzidīna šķīduma) pievienošana (200 µl) un 20 minūtes inkubācija tumsā;
- 5) stop-reagēnta pievienošana (50 µl) un rezultātu nolasīšana 30 minūšu laikā, izmantojot spektrofotometru viļņa garumā 450 nm.

Testa CK18-M30 noteikšanas diapazons ir 75–1000 U/l. Testa references intervāli: nedaudz paaugstināts līmenis ir 150–200 U/l, paaugstināts līmenis ir virs 200 U/l.

2.3.7. Hematoloģiskie parametri

Hematoloģiskie parametri tika noteikti ar automātisko hematoloģisko analizatoru. Analīzes veikšanai izmantoja venozo asiņu paraugs (2,7 ml) ar antikoagulantu EDTA.

Paraugā tika noteikti šādi parametri: leukocīti (WBC), eritrocīti (RBC), hemoglobīns (HGB), trombocīti (PLT). Citi pilnas asins ainas rādītāji netika izmantoti analīzei.

2.3.8. Bioķīmisko parametru noteikšana

Bioķīmisko parametru noteikšanai tika izmantotas venozās asinis bez antikoagulanta (2,7 ml). Tika noteikti šādi parametri:

- 1) alanīnaminotransferāze, ALT (U/l), tika noteikta ar kinētisko fermentatīvo metodi, izmantojot aparātu *Cobas Mira Plus*.
- 2) aspartātaminotransferāze, AST (U/l), tika noteikta ar kinētisko fermentatīvo metodi, izmantojot aparātu *Cobas Mira Plus*.

2.3.9. FIB-4 indeksa noteikšana

Papildus tika aprēķināts aknu fibrozes indekss – FIB-4 indekss, kas pieder pie netiešiem aknu fibrozes rādītājiem (Sterling et al., 2006):

$$FIB-4 = \text{vecums (gadi)} \times AST(U/l) / (\text{trombocītu skaits } (10^9/l) \times ALT (U/l))^{1/2}$$

2.3.10. Baktēriju frakcijas iegūšana no fēču paraugiem

Kopējās fēču mikrobiotas DNS tika iegūts, izmantojot *FastDNA Spin Kit for Soil* un *FastPrep-2 (MP Biomedicals, ASV)* ierīci, saskaņā ar ražotāja protokolu un iekļāva šādus soļus:

- 1) atkausētu fēču paraugu suspendēšana 1 ml nātrija fosfāta buferšķīdumā un pārvešana stobriņā ar mikrolodīšu matricu (*Lysing Matrix E*) un MT buferšķīdumu;
- 2) homogenizēšana *FastPrep* instrumentā 40 sekundes;
- 3) centrifugēšana ar ātrumu $14\,000 \times g$ 10 minūtes, šķidrās augšējās daļas t. s. supernatanta pārvešana uz tīru 2,0 ml stobriņu un 250 μ l PPS (proteīna nogulsnešanas šķīdums) pievienošana, samaisīšana;
- 4) centrifugēšana ar ātrumu $14\,000 \times g$ 10 minūtes, supernatantu pārvešana uz tīru 15 ml stobriņu;
- 5) *Binding Matrix* suspensijas samaisīšana un 1,0 ml pievienošana supernatantam 15 ml stobriņā;
- 6) stobriņu invertēšana divu minūšu garumā, lai nodrošinātu DNS saistīšanos, ar sekojošu trīs minūšu sedimentāciju;
- 7) 500 μ l supernatanta noņemšana un atkārtota *Binding Matrix* suspendēšana atlikušajā supernatantā;
- 8) 600 μ l maisījuma pārvešana uz SPIN™ filtru un centrifugēšana ar ātrumu $14\,000 \times g$ vienu minūti;

- 9) 500 µl sagatavotā reaģenta SEWS-M pievienošana un nosēduma suspendēšana, izmantojot pipeti;
- 10) divkārtēja centrifugēšana ar ātrumu 14 000 × g vienu un divas minūtes;
- 11) SPIN™ filtra žāvēšana gaisā piecas minūtes istabas temperatūrā;
- 12) 50–100 µl elūcijas buferšķīduma DES (DNāzes / pirogēnbrīvs ūdens) pievienošana;
- 13) centrifugēšana ar ātrumu 14 000 × g vienu minūti eluētā DNS iegūšanai tīrā uztveršanas stobriņā;
- 14) iegūtā DNS uzglabāšana –80 °C līdz lietošanai.

Izdalītā DNS tika kvantificēta, izmantojot *Qubit* fluorometru (*Invitrogen*, ASV) un uzglabāta –20 °C līdz tālākai lietošanai. Papildus kvalitātes kontroles nolūkā DNS tika izdalīta arī no elūcijas buferšķīduma un zināma satura baktēriju maisījuma *ZymoBIOMICS Microbial Community Standard D6300* (*ZymoBIOMICS*, ASV), kas tika izmantots kā negatīvā un pozitīvā kontrole.

2.4. 16S rRNS gēna amplikonu sagatavošana un sekvencēšana

Mikrobiotas analīzei jeb baktēriju taksonomiskā sastāva noteikšanai tika izmantota 16S ribosomālā RNS (rRNS) gēna hipervariabla reģionu sekvencēšanas metode. Sākotnēji tika noteikts 16S rRNS gēna reģions V3-V4, V4 un V4-V5 amplikonu efektivitāte un tālākai analīzei darbā tika izmantoti V4 reģiona dati, jo tie saturēja visvairāk informācijas par pētījumā iekļauto paraugu taksonomisko sastāvu.

16S rRNS gēna V4 hipervariablā reģiona amplikonu iegūšanai tika izmantots deģenerētu praimeru pāris 515F-806R (2.1. tabula). Amplikonu saderībai ar sekvencēšanas platformu gan tiešajam, gan atgriezeniskajiem praimerim tika pievienotas adapteru sekvenses:

- 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-tiešais praimeris;
- 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-atgriezeniskais praimeris.

2.1. tabula

Praimeru sekvenses 16S rRNS gēna V4 hipervariablā reģiona amplikonu ieguvei

Praimera nosaukums	Sekvence 5'-3'	Garums	Atsauce
515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	19	Parada et al., 2015
806R	GGACTACNVTGGTWTCTAAT	20	Apprill et al., 2015

Sekvencēšanas bibliotēku jeb indeksēto sekvencējamo amplikonu kopas iegūšanai tika izmantota divu soļu amplifikācijas metode. Pirmajā amplifikācijas solī reakcija tika veikta 96 lauciņu platē, kur katrā bedrītē tika sajaukts:

- 1) 12,5 µl – 2× KAPA HiFi HotStart Ready Mix (*Roche*, Šveice);
- 2) 0,4 µl – 1 uM 515F tiešais praimeris (*Metabion*, Vācija);
- 3) 0,4 µl – 1 uM 806R reversais praimeris (*Metabion*, Vācija);
- 4) 1 µl – 5ng/µl izdalītā DNS;
- 5) 10,7 µl – PĶR tīrības H₂O.

PĶR reakcijas apstākļi:

- 1) denaturācija 95 °C, trīs minūtes;
- 2) 20 cikli:
 - denaturācija 98 °C, 30 sekundes,
 - pielipšana (angļu valodā – *annealing*) 50 °C, 45 sekundes,
 - elongācija 72 °C, 45 sekundes;
- 3) beigu elongācija 72 °C, 10 minūtes.

PĶR reakcijā iegūto DNS fragmentu kvalitāte tika attēlota uz 2 % agarozes gela (65 mA, 100 V 1 stundu) ar *SYBR Gold* nukleīnskābju krāsvielu (*ThermoFisher*, ASV). Veiksmīgi iegūtie PĶR produkti tika attīrīti un normalizēti, izmantojot kombinēto attīrīšanas–normalizēšanas plati *SequalPrep normalization plate kit* (*ThermoFisher*, ASV), sekojot ražotāja protokolam, kas iekļāva šādus soļus:

- 1) 15 µl PĶR produkta pārnese uz normalizācijas plates bedrīti;
- 2) 15 µl saistīšanās buferšķīduma pievienošana;
- 3) 60 minūšu inkubēšana istabas temperatūrā;
- 4) uzmanīga visa šķidrums noņemšana, neskrāpējot bedrītes pamatni;
- 5) 50 µl mazgāšanas buferšķīduma pievienošana un tūlītēja noņemšana;
- 6) 20 µl elūcijas buferšķīduma pievienošana un piecu minūšu inkubēšana istabas temperatūrā.

Attīrītie pirmā PĶR fragmenti tika izmantoti otrā soļa PĶR jeb sekvencēšanas adapteru un indeksu pievienošanas reakcijā, kur tika izmantotas *Illumina Nextera XT2* kombinatorās indeksu sekvences (*Illumina*, ASV). Katrā 96 lauciņu bedrītē tika sajaukts:

- 1) 12 µl – 2× KAPA HiFi HotStart Ready Mix (*Roche*, Šveice);
- 2) 0,5 µl – 1 uM *Nextera XT* indeks 1 tiešais praimeris (*Metabion*, Vācija);
- 3) 0,5 µl – 1 uM *Nextera XT* indeks 2 reversais praimeris (*Metabion*, Vācija);
- 4) 12 µl – normalizētais pirmā PĶR produkts (~ 4 ng/µl).

PĶR reakcijas apstākļi:

- 1) denaturācija 95 °C, trīs minūtes;
- 2) astoņi cikli:
 - denaturācija 98 °C, 20 sekundes,
 - pielipšana (angļu valodā – *annealing*) 55 °C, 20 sekundes,
 - elongācija 72 °C, 20 sekundes;
- 3) beigu elongācija 72 °C, piecas minūtes.

Otrā PĶR solī iegūtie indeksētie amplikoni tika attīrīti, izmantojot attīrīšanas–normalizēšanas plates, un 5 µl no katras bedrītes ar atšķirīgām indeksu iezīmēm tika apvienoti vienā stobriņā. Apvienoto sekvencēšanas bibliotēku DNS vidējais fragmentu garums tika noteikts, izmantojot *QIAxcel DNA High Resolution kit* un *QIAxcel Advanced* kapilārās elektroforēzes sistēmu (*Qiagen*, Vācija) un kvantificēti izmantojot reālā laika PĶR sekvencēšanas bibliotēku kvantificēšanas reaģentus *KAPA Library quantification kit* (*Roche*, Šveice).

Galējā apvienotā bibliotēka tika sekvencēta ar pārotiem lasījumiem (2 × 300 cikli) uz *Illumina MiSeq*, izmantojot v3 600 ciklu reaģentu komplektu (*Illumina*, ASV).

2.5. Sekvenču analīze

Sekvenču analīze tika veikta Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas Laboratorijas dienesta sekvencēšanas nodaļā.

Sekvencēšanā iegūtie jēldati tika demultipleksēti un attīrīti no indeksiem un adapteriem ar *cutadapt* un *fastp*. Iegūtie dati mikrobiotas analīzei tika apstrādāti, izmantojot “R” programatūru (versija 4.2.1.). Lasījumu pirmapstrāde veikta ar *DADA2* pakotni (versija 1.16) (Callahan et al., 2016), kur lasījumi tika šķiroti pēc garuma, kvalitātes un unikalitātes. Sapludināto nolasījumu pāri tika attīrīti no himēriskām sekvencēm, iegūstot sekvences amplikonu variantu (t. i., sekvences, kas atšķiras par vismaz vienu nukleotīdu) atkārtojumu skaitu katrā paraugā. Iegūtajiem amplikonu sekvences variantiem tika piešķirta taksonomiskā piederība, izmantojot *Decipher* pakotni (versija 2.20.0) (Murali, Bhargava & Wright, 2018) ar *SILVA* 138 SSU datubāzi (2019. gada 138. versija) ar standarta parametriem (60 % ticamības līmeni). No iegūtajiem amplikonu sekvences variantiem ar atpazītu taksonomisko piederību, izmantojot *decontam* (versija 1.12.0) pakotni, tika izņemti visi lasījumi, kas tika atrasti negatīvajās kontrolēs. Pozitīvās kontroles sekvencēšanas un klasificēšanas rezultāti redzami 2.2. tabulā.

Pozitīvās kontroles taksonomiskais sastāvs

Sagaidāmais pozitīvās kontroles taksonomiskais sastāvs		Iegūtais pozitīvās kontroles taksonomiskais sastāvs (Decipher, SILVA)	
Sugas	gDNS relatīvais daudzums (%)	Sugas	gDNS relatīvais daudzums (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,03
<i>Escherichia coli</i>	12	<i>Escherichia coli</i>	17,16
<i>Salmonella enterica</i>	12	<i>Salmonella enterica</i>	5,44
<i>Lactobacillus fermentum</i>	12	<i>Lactobacillus fermentum</i>	7,47
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	<i>Enterococcus faecalis</i>	11,64
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	<i>Staphylococcus aureus</i>	16,38
<i>Listeria monocytogenes</i>	12	<i>Listeria monocytogenes</i>	10,62
<i>Bacillus subtilis</i>	12	<i>Bacillus subtilis</i>	20,25
<i>ZymoBIOMICS Microbial Community Standard (D6300)</i>			

2.6. Datu apstrādes statistiskās metodes

Datu statistiskā apstrāde tika veikta, izmantojot *Statistical Package For Social Sciences IBM* (SPSS) 23. versiju (*IBM Corporations*, ASV). Pirmā analīzes soļa mērķis bija salīdzināt rādītāju atšķirības starp pētījuma grupām. Tā kā iegūtie dati neatbilst normālsadalījumam, trīs grupu salīdzinājumā tika lietots neparametriskais Kruskala–Valisa (*Kruskal–Wallis*) tests. Divu grupu salīdzinājumā tika lietots Manna–Vitnija (*Mann–Whitney*) kritērijs. Otrajā analīzes solī tika izpētītas pazīmju savstarpējās saistības. Saistību analīzei tika izmantots Spīrmena (*Spearman*) rangu korelācijas koeficients (r_s). Korelācijas ciešums tika interpretēts atbilstoši korelācijas koeficienta lielumam: ļoti vāja korelācija, ja $r_s < 0,19$; vāja korelācija, ja $r_s = 0,2–0,39$; vidēja korelācija, ja $r_s = 0,4–0,59$; cieša korelācija, ja $r_s = 0,6–0,79$; ļoti cieša korelācija, ja $r_s > 0,8$. Rezultātus uzskatīja par statistiski nozīmīgiem, ja p vērtība bija mazāka par 0,05. Parciālas korelācijas aprēķins tika lietots, lai izslēgtu grupas efektus no pazīmju savstarpējo saistību novērtējuma. Parciālās korelācijas aprēķini tika veikti JASP brīvpieejas programmā (*JASP 0.16.3 for Windows*).

Fēču mikrobiotas datu apstrāde

Mikrobioma statistiskā analīze tika veikta ar *phyloseq* (versija 1.40.0), *vegan* (versija 2.6-2), *microbiome* (versija 1.18.0), *DESeq2* (versija 1.36.0) pakotnēm un rezultāti vizualizēti ar *ggplot2* (versija 3.3.6). Paraugu iekšējā jeb alfa daudzveidība un starpparaugu jeb beta daudzveidība tika noteikta, izmantojot *phyloseq* un *vegan*. Permutācijas daudzfaktoru ANOVA jeb PERMANOVA analīze tika veikta, izmantojot *adonis* funkciju no *vegan* pakotnes.

3. Rezultāti

3.1. Pacientu raksturojums

Pētījumā tika iekļauts 81 pacients, no tiem 47 vīrieši (58 %) un 34 sievietes (42 %) vecumā no 18 līdz 65 gadiem (vecuma mediāna 44 gadi, IQR [37; 50]), atbilstoši noteiktajām diagnozēm viņi tika dalīti trijās grupās: HIV mono-infekcijas grupa, HIV / HCV koinfekcijas grupa un HCV infekcijas grupa.

HIV monoinfekcijas grupā bija 28 pacienti: 18 vīrieši (64 %) un 10 sievietes (36 %), vecuma mediāna 42,5 gadi, IQR [36,0; 55,8]). HIV / HCV koinfekcijas grupā bija 29 pacienti: 21 vīrietis (72 %) un 8 sievietes (28 %), vecuma mediāna 44 gadi, IQR [39,5; 49;0]. HCV monoinfekcijas grupā bija 24 pacienti: 8 vīrieši (33 %) un 16 sievietes (67 %), vecuma mediāna 44,5 gadi, IQR [36,0; 51,5]. Atšķirības starp grupām vecumos netika konstatētas.

HIV un HIV / HCV pacientu grupu raksturošanai tika izvērtētas iespējamās atšķirības starp grupām imunoloģiskajos rādītājos ($CD4^+$, $CD8^+$ T limfocītu skaitā un $CD4 / CD8$ indeksā) un HIV slodzē (HIV RNS). Atšķirības starp grupām tika izvērtētas ar Manna–Vitnija (*Mann–Whitney*) kritēriju (3.1. tabula).

3.1. tabula

Atšķirības starp HIV monoinficēto un HIV / HCV koinfēto pacientu grupām HIV RNS, $CD4^+$ un $CD8^+$ T limfocītu daudzumā

Parametri	Grupas		Manna–Vitnija U tests
	HIV (n = 28)	HIV / HCV (n = 29)	
HIV RNS (kopijas / ml), mediāna (IQR)	$6,0 \times 10^5$ ($2,7 \times 10^4$; $2,3 \times 10^6$)	$1,1 \times 10^5$ ($4,3 \times 10^3$; $5,9 \times 10^5$)	269,0*
< 50 kopijas /ml, pacientu skaits, %	0 %	0 %	–
$CD4^+$ T limfocīti (šūnas / mm^3), mediāna (IQR)	78 (33; 214)	131 (58; 270)	327,0
< 200 šūnas / mm^3	75 %	66 %	–
$CD8^+$ T limfocīti (šūnas / mm^3), mediāna (IQR)	546 (256; 915)	693 (452; 1009)	314,0
$CD4 / CD8$ indekss	0,19 (0,07; 0,37)	0,18 (0,09; 0,31)	383,0

HIV RNS – HIV slodze, $CD4 / CD8$ – $CD4^+$ T limfocītu un $CD8^+$ T limfocītu attiecība. * – $p < 0,05$.

Pacientiem ar HIV mono un HIV / HCV koinfekciju nebija atšķirības $CD4^+$ un $CD8^+$ T limfocītu skaitā, kā arī $CD4 / CD8$ indeksā. Jāatzīmē, ka $CD4^+$ T limfocītu skaits < 200 šūnām / μ l tika konstatēts 75 % pacientu HIV monoinfēto grupā un 66 % pacientu HIV / HCV koinfēto grupā. Savukārt HIV slodze (HIV RNS) bija augstāka pacientiem ar HIV monoinfekciju ($6,0 \cdot 10^5$ kopijas / ml, IQR [$2,7 \cdot 10^4$; $2,3 \cdot 10^6$]) nekā pacientiem ar HIV / HCV koinfekciju ($1,1 \cdot 10^5$ kopijas / ml, IQR [$4,3 \cdot 10^3$; $5,9 \cdot 10^5$]), Manna–Vitnija kritērijs U (55) = 269,0, $p < 0,029$. Nevienam pacientam no abām grupām nekonstatēja HIV RNS

< 50 kopijām / ml, jo visi pacienti no HIV un HIV / HCV grupām bija iekļauti pētījumā uzreiz pēc diagnozes noteikšanas līdz ART uzsākšanai. Līdzīgi arī pacienti ar HCV tika iesaistīti pētījumā uzreiz pēc diagnozes noteikšanas, līdz ar to visu izmeklējumu veikšanas laikā tie vēl nebija saņēmuši HCV specifisko DAA terapiju. HCV pacientiem imunoloģiskais stāvoklis netika noteikts.

Ņemot vērā, ka rādītāji neatbilda normālsadalījumam, atšķirību noteikšanai citos analizējamajos parametros tika izmantots Kruskala–Valisa (*Kruskal–Wallis*) tests (1. pielikums). Atšķirības starp grupām detalizētāk tiks izskatītas tālāk, grupējot parametrus rutīnas klīniskajos rādītājos (leikocītu, eritrocītu, trombocītu skaits, ALT, AST, ĶMI), bioķīmiskajos mikrobu translokācijas marķieros (LBP, sCD14, IgM un IgG antivielas pret endotoksīna serdi), aknu apoptozes (CK18-M30) un fibrozes rādītājos (FIB-4) un mikrobiotu raksturojošos parametrus (novērotā daudzveidība, Šenona indekss, apgrieztais Simpsona indekss).

Izvērtējot leikocītu, eritrocītu, trombocītu skaitu, hemoglobīnu, ALT, AST un ĶMI, atšķirības starp grupām tika konstatētas ĶMI indeksā, eritrocītu skaitā, hemoglobīnā, ALT un AST (3.2. tabula). Savukārt atšķirību nebija starp grupām leikocītu un trombocītu skaitā.

3.2. tabula

Atšķirības starp HIV, HIV / HCV un HCV inficēto pacientu grupām rutīnas klīniskajos rādītājos

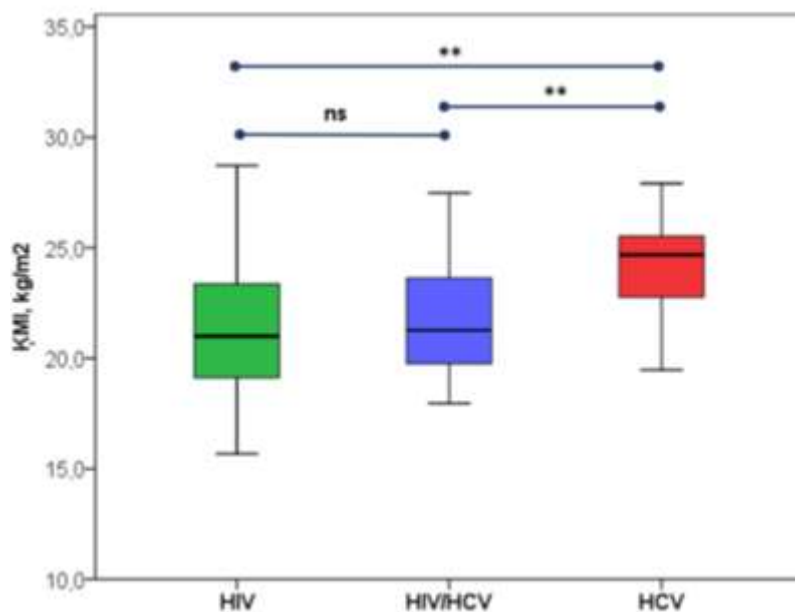
Parametri	Grupas			Kruskala–Valisa tests
	HIV (n = 28)	HIV / HCV (n = 29)	HCV (n = 24)	
	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	H
ĶMI, kg/m ²	21,0 ^a (19,1; 23,4)	21,3 ^a (19,7; 23,8)	24,7 ^b (22,6; 25,6)	14,36**
Leikocīti × 10 ⁹ /l	4,71 (3,76; 7,38)	5,68 (4,00; 7,50)	5,47 (4,42; 7,05)	0,61
Eritrocīti × 10 ¹² /l	4,00 ^a (3,37; 4,47)	3,84 ^a (3,59; 4,34)	4,75 ^b (4,37; 5,03)	16,77***
Hemoglobīns, g/dl	11,75 ^a (9,95; 13,20)	12,10 ^a (10,35; 12,70)	14,25 ^b (13,45; 15,53)	20,80***
Trombocīti × 10 ⁹ /l	214 (136; 237)	170 (126; 243)	202 (182; 247)	2,45
ALT, U/l	20 ^a (14; 39)	28 ^a (18; 59)	69 ^b (47; 101)	19,72***
AST, U/l	24 ^a (15; 43)	40 ^{a,b} (29; 53)	53 ^b (33; 75)	13,30**

ĶMI – ķermeņa masas indekss, ALT – alanīnaminotransferāze, AST – aspartāminotransferāze.

a, b – indeksi, kas norāda uz atšķirībām starp grupām.

** – p < 0,01, *** – p < 0,001.

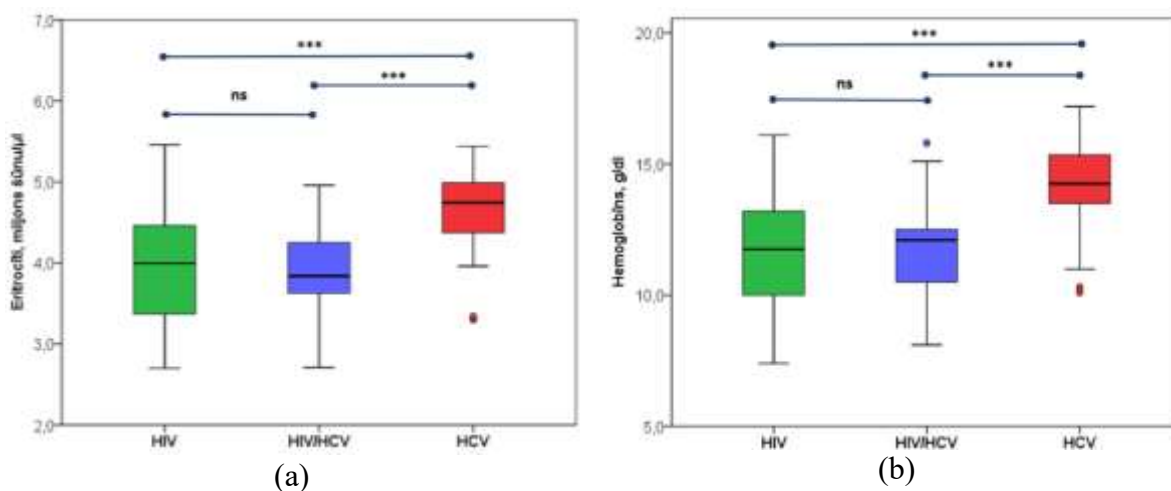
Ķermeņa masas indekss (3.1. attēls) bija augstāks pacientiem ar HCV (24,7 kg/m², IQR [22,6; 25,6]) nekā pacientiem ar HIV (21,3 kg/m², IQR [19,7; 23,8]) un pacientiem ar HIV / HCV (21,0 kg/m², IQR [19,1; 23,4]), p < 0,01. Savukārt starp HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem nenovēroja atšķirības ĶMI.



3.1. attēls. **Ķermeņa masas indeksa atšķirības starp grupām**

** – $p < 0,01$, ns – nav ticamas atšķirības.

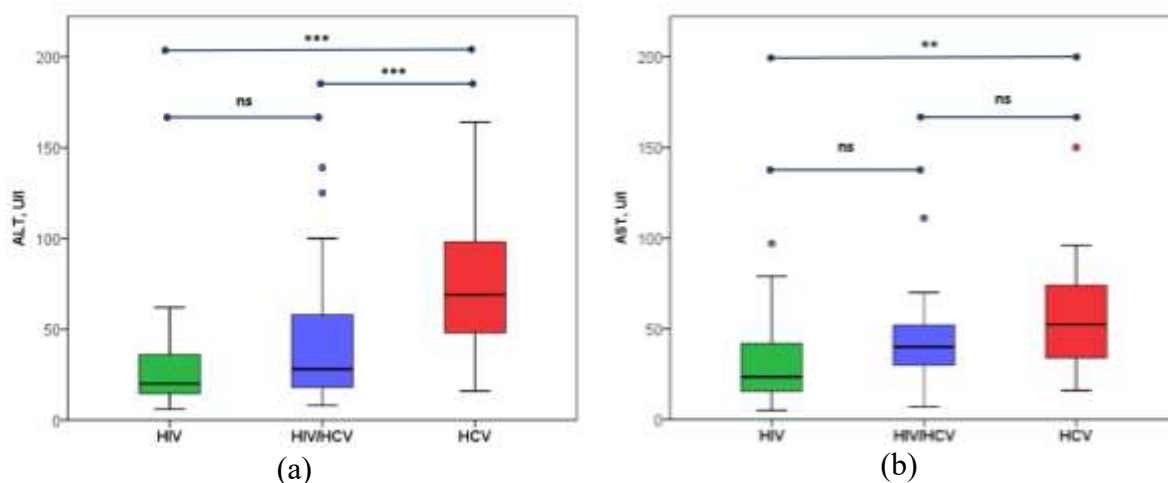
Pacientiem ar HCV infekciju bija augstāks eritrocītu skaits (3.2.(a) attēls) un hemoglobīna līmenis (3.2.(b) attēls) nekā pacientiem ar HIV mono un HIV / HCV koinfekciju.



3.2. attēls. **Eritrocītu (a) un hemoglobīna (b) rādītāju atšķirības starp grupām**

*** – $p < 0,001$, ns – nav ticamas atšķirības.

Pacientiem ar HCV infekciju bija augstāks arī ALT rādītājs (3.3.(a) attēls) nekā pacientiem ar HIV mono un HIV / HCV koinfekciju. AST rādītājs (3.3.(b) attēls) bija augstāks pacientiem ar HCV monoinfekciju (53 U/l, IQR [33; 75]) nekā pacientiem ar HIV monoinfekciju (24 U/l, IQR [15; 43]), bet AST neatšķīrās starp HCV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem. Ne ALT (28 U/l, IQR [18; 59]), ne AST (40 U/l, IQR [29; 53]) rādītāji neatšķīrās pacientiem ar HIV / HCV koinfekciju un HIV monoinfekciju.



3.3. attēls. ALT (a) un AST (b) rādītāju atšķirības starp grupām

** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, ns – nav ticamas atšķirības.

3.2. Bioķīmiskie mikrobu translokācijas marķieri

Analizējot mikrobu translokācijas marķierus, statistiski nozīmīgu atšķirību konstatēja tikai LBP līmenim (3.3. tabula).

3.3. tabula

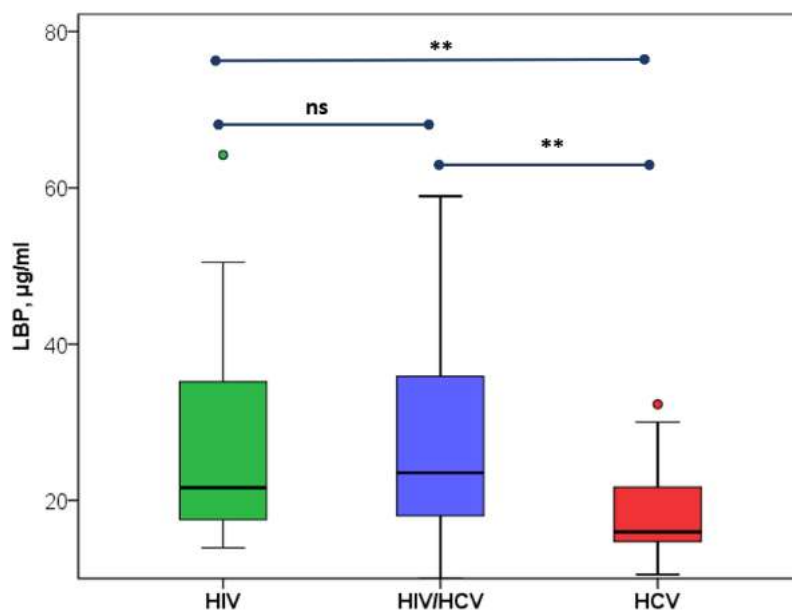
Atšķirības mikrobu translokācijas marķieros pacientiem ar HIV monoinfekciju, HIV / HCV koinfekciju un HCV monoinfekciju

Parametri	Grupas			Kruskala-Valisa tests
	HIV (n = 28)	HIV / HCV (n = 29)	HCV (n = 24)	
	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	H
LBP, $\mu\text{g/ml}$	21,6 ^a (17,4; 35,2)	23,5 ^a (17,9; 39,0)	16,0 ^b (14,7; 22,1)	12,12**
sCD14, ng/ml	7253 (5258; 13912)	6483 (5224; 7713)	5216 (4289; 7720)	5,21
IgM EndoCAb, U/ml	0,33 (0,20; 0,58)	0,40 (0,19; 0,68)	0,52 (0,28; 0,76)	3,72
IgG EndoCAb, U/ml	175,6 (100,1; 295,7)	174,8 (107,2; 263,0)	210,8 (124,4; 331,4)	1,50

LBP – lipopolisaharīdu saistošais proteīns, sCD14 – šķīstošais CD14 receptors, IgM EndoCAb – IgM klases antivielas pret endotoksīnu, IgG EndoCAb – IgG klases antivielas pret endotoksīnu.

a, b – indeksi, kas norāda uz atšķirībām starp grupām. ** – $p < 0,01$.

Pacientiem ar HIV monoinfekciju un HIV / HCV koinfekciju LBP bija augstāks nekā HCV monoinficētiem pacientiem, bet tā līmenis neatšķīrās starp HIV mono un HIV / HCV koinficēto pacientu grupām (3.4. attēls).



3.4. attēls. Atšķirības starp grupām LBP līmeņos

** – $p < 0,01$, ns – nav ticamas atšķirības.

Savukārt atšķirības starp grupām sCD14 un IgM un IgG EndoCAb antivielu rādītājos netika konstatētas. Atsevišķi rādītāji, kā IgM EndoCAb un IgG EndoCAb, uzrādīja līdzīgu tendenci atšķirībās, respektīvi, tie bija augstāki pacientiem ar HCV nekā pacientiem ar HIV mono un HIV / HCV koinfekciju, taču rādītāji savā starpā nebija atšķirīgi, t. i., nerasniedza statistisku ticamību. sCD14 bija augstāks ar HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem, bet arī šī atšķirība nerasniedza statistisku ticamību.

3.3. Aknu apoptozes un fibrozes rādītāji

Izvērtējot aknu apoptozes un fibrozes rādītājus, atšķirības starp grupām tika konstatētas hepatocītu apoptozes rādītājā (CK18-M30) (3.4. tabula).

CK18-M30 bija augstāks pacientiem ar HCV monoinfekciju (196 U/l, IQR [110; 380]) un HIV / HCV (138 U/l, IQR [95; 300]) koinfekciju nekā pacientiem ar HIV (95 U/l, IQR [69; 170]), savukārt starp HCV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem atšķirības CK18-M30 rādītājos nekonstatēja (3.5. attēls).

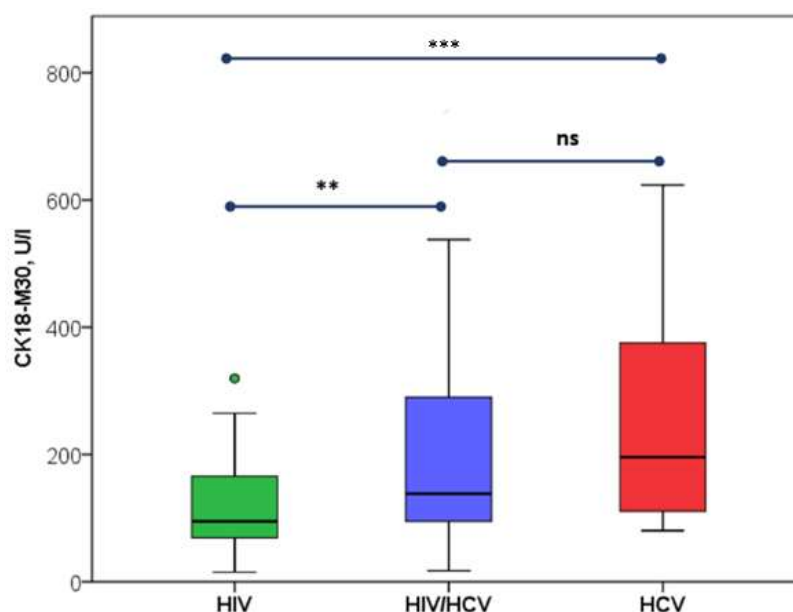
Atšķirības aknu apoptozes un fibrozes rādītājos pacientiem ar HIV monoinfekciju, HIV / HCV koinfekciju un HCV monoinfekciju

Parametri	Grupās			Kruskala-Valisa tests
	HIV (n = 28)	HIV / HCV (n = 29)	HCV (n = 24)	
	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	H
CK18-M30, U/l	95 ^a (69; 170)	138 ^b (95; 300)	196 ^b (110; 380)	14,05**
≥ 200 U/L, pacientu skaits, %	18 %	38 %	50 %	–
FIB-4	1,28 (0,85; 1,75)	1,91 (1,24; 3,06)	1,33 (0,78; 2,03)	5,77
≤ 1,45, pacientu skaits, %	57 %	35 %	58 %	–
1,46-3,24, pacientu skaits, %	39 %	44 %	21 %	–
≥ 3,25, pacientu skaits, %	4 %	21 %	21 %	–

CK18-M30 – citokeratīna 18 fragments M30, FIB-4 – aknu fibrozes indekss.

a, b – indeksi, kas norāda uz atšķirībām starp grupām.

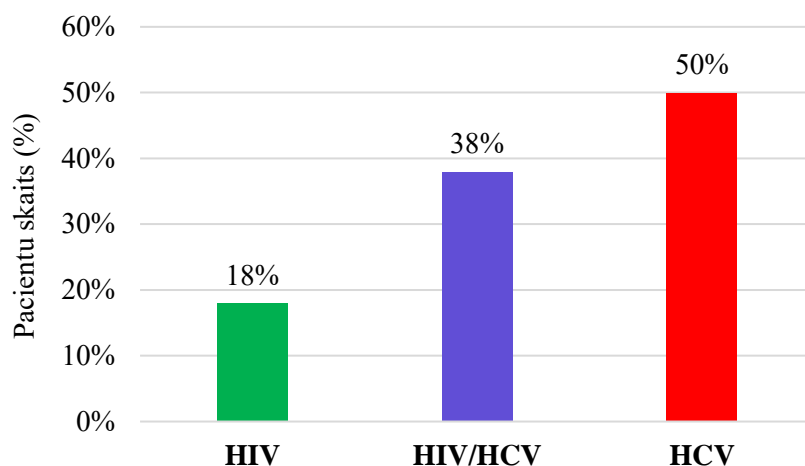
** – $p < 0,01$.



3.5. attēls. Atšķirības starp grupām CK18-M30 rādītājos

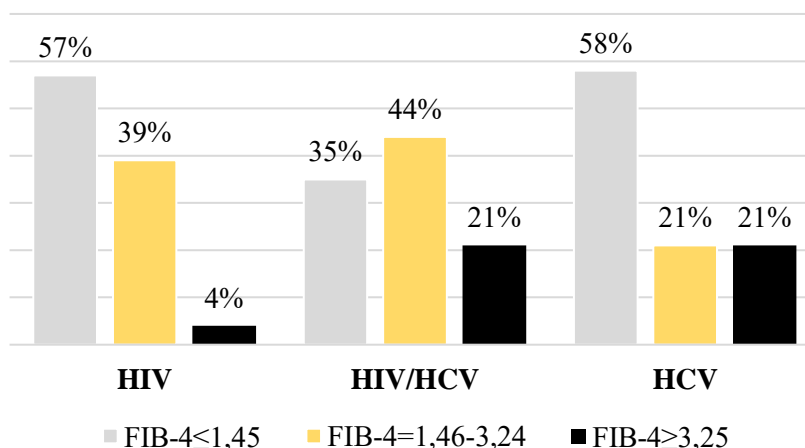
** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, ns – nav ticamas atšķirības.

Izmantojot CK18-M30 *cut-off* ≥ 200 U/l līmeni (atbilstoši ražotāja rekomendācijai), pastiprināta hepatocītu apoptoze tika novērota 18 % pacientu ar HIV monoinfekciju, 35 % pacientu ar HIV / HCV koinfekciju un 50 % pacientu ar HCV infekciju (3.6. attēls).



3.6. attēls. Pacientu skaits (%) ar paaugstinātu CK18-M30 līmeni (*cut-off* ≥ 200 U/l) serumā

FIB-4 indeksā atšķirības starp grupām netika konstatētas (3.4. tabula), tomēr HIV / HCV koinficētiem pacientiem FIB-4 indeksa mediānā vērtība bija augstāka nekā HIV un HCV monoinficētiem pacientiem. Izmantojot FIB-4 *cut-off* līmeņus (Sterling et al., 2006), tika novērtēta potenciālā aknu fibroze pacientu grupās (3.7. attēls).



3.7. attēls. Pacientu skaits (%) ar dažādiem FIB-4 līmeņiem

Izteikta aknu fibroze (FIB-4 $\geq 3,25$) varēja būt 4 % pacientu ar HIV monoinfekciju, 21 % pacientu ar HIV / HCV koinfekciju un 21 % pacientu ar HCV. Attiecīgi nozīmīga aknu fibroze (FIB-4 = 1,46–3,24) varēja būt 39 % pacientu ar HIV, 44 % pacientu ar HIV / HCV un 21 % pacientu ar HCV infekciju. FIB-4 $\leq 1,45$ ar lielāko varbūtību izslēdz aknu fibrozi 57 % pacientu ar HIV monoinfekciju, 35 % ar HIV / HCV koinfekciju un 58 % ar HCV monoinfekciju.

3.4. Rādītāju savstarpējās saistības

Lai sākotnēji novērtētu kopējās tendences parametru savstarpējās saistībās, tika noteikts Spīrmena korelācijas koeficients kopējā pacientu grupā (3.5. tabula). Korelācijas analīzes rezultāti apskatīti atsevišķās apakšsadaļās.

3.4.1. Vecuma, ķermeņa masas indeksa, HIV vīrusa slodzes un dažādu asins šūnu skaita saistības kopējā pacientu grupā

Vecums uzrādīja pozitīvu saistību ar aknu fibrozes indeksu, FIB-4 ($r_s = 0,25$, $p < 0,05$) un negatīvu saistību ar IgM antivielām pret endotoksīna serdes antigēnu (EndoCAb) ($r_s = -0,27$, $p < 0,05$). Ķermeņa masas indekss pozitīvi korelēja ar CD8⁺ T limfocītu skaitu ($r_s = 0,43$, $p < 0,001$), eritrocītu skaitu ($r_s = 0,23$, $p < 0,05$), hemoglobīnu ($r_s = 0,39$, $p < 0,001$) un Šenona indeksu ($r_s = 0,43$, $p < 0,001$) (3.5. tabula).

HIV vīrusa slodze uzrādīja tikai negatīvas korelācijas: ar CD4⁺ T limfocītu skaitu ($r_s = -0,56$, $p < 0,001$), CD8⁺ T limfocītu skaitu ($r_s = -0,37$, $p < 0,01$), leukocītu skaitu ($r_s = -0,34$, $p < 0,01$) un hemoglobīnu ($r_s = -0,42$, $p < 0,01$). CD4⁺ T limfocītu skaits bija pozitīvi saistīts ar CD8⁺ T limfocītu skaitu ($r_s = 0,62$, $p < 0,001$), leukocītu skaitu ($r_s = 0,58$, $p < 0,001$) un hemoglobīnu ($r_s = 0,28$, $p < 0,05$), bet negatīvi ar IgG antivielām pret endotoksīna serdes antigēnu ($r_s = -0,34$, $p < 0,05$). Līdzīgi CD4⁺ T limfocītu skaitam CD8⁺ T limfocītu skaits pozitīvi korelēja ar leukocītu skaitu ($r_s = 0,41$, $p < 0,05$) un hemoglobīnu ($r_s = 0,41$, $p < 0,05$), bet negatīvi ar IgG antivielām pret endotoksīna serdes antigēnu ($r_s = -0,26$, $p < 0,05$).

Leikocīti un eritrocīti uzrādīja līdzīgas korelācijas ar citiem pētījuma rādītājiem, jo tiem savā starpā tika konstatēta korelācija ($r_s = 0,36$, $p < 0,001$). Papildus iepriekš minētajām korelācijām leukocītu skaits un eritrocītu skaits pozitīvi korelēja ar hemoglobīnu (attiecīgi $r_s = 0,46$, $p < 0,001$ un $r_s = 0,76$, $p < 0,001$), ar ALT (attiecīgi $r_s = 0,49$, $p < 0,001$ un $r_s = 0,56$, $p < 0,001$), AST (attiecīgi $r_s = 0,28$, $p < 0,05$ un $r_s = 0,34$, $p < 0,01$) un CK18-M30 (attiecīgi $r_s = 0,24$, $p < 0,05$ un $r_s = 0,30$, $p < 0,01$), bet negatīvi ar sCD14 (attiecīgi $r_s = -0,36$, $p < 0,05$ un $r_s = -0,35$, $p < 0,01$). Savukārt leukocītu skaits bija pozitīvi saistīts ar trombocītu skaitu ($r_s = 0,37$, $p < 0,001$) un negatīvi ar FIB-4 ($r_s = -0,24$, $p < 0,05$), bet eritrocītu skaits pozitīvi bija saistīts ar Šenona indeksu ($r_s = 0,46$, $p < 0,001$). Līdzīgi eritrocītu skaitam hemoglobīns papildus iepriekš minētajām korelācijām pozitīvi saistījās ar ALT ($r_s = 0,58$, $p < 0,001$), AST ($r_s = 0,29$, $p < 0,01$) un Šenona indeksu ($r_s = 0,48$, $p < 0,001$), bet negatīvi ar LBP ($r_s = -0,28$, $p < 0,05$) un sCD14 ($r_s = -0,47$, $p < 0,001$). Trombocītu skaits papildus uzrādīja tikai vienu korelāciju ar FIB-4 ($r_s = -0,64$, $p < 0,001$).

3.4.2. Aknu fibrozes indeksa, mikrobu translokācijas, hepatocītu apoptozes un fēču mikrobiotas daudzveidības (Šenona indeksa) parametru savstarpējās saistības kopējā pacientu grupā

FIB-4 uzrādīja saistību ar IgM antivielām pret endotoksīna serdes antigēnu ($r_s = 0,26$, $p < 0,05$) un CK18-M30 ($r_s = 0,56$, $p < 0,001$). Hepatocītu apoptozes marķieris, CK18-M30, uzrādīja papildu pozitīvu saistību ar ALT ($r_s = 0,47$, $p < 0,001$), AST ($r_s = 0,56$, $p < 0,001$), IgM EndoCAb antivielām ($r_s = 0,30$, $p < 0,01$) un negatīvu saistību ar LBP ($r_s = -0,30$, $p < 0,01$). sCD14 pozitīvi korelēja ar LBP ($r_s = 0,30$, $p < 0,01$), bet negatīvi ar CK18-M30 un Šenona indeksu ($r_s = -0,31$, $p < 0,01$). Savukārt Šenona indeksam tika atklāta pozitīva saistība ar ALT ($r_s = 0,35$, $p < 0,01$) un CK18-M30 ($r_s = 0,24$, $p < 0,05$) un negatīva saistība ar endotoksēmijas marķieriem LBP un sCD14 (attiecīgi $r_s = -0,31$, $p < 0,01$ un $r_s = -0,37$, $p < 0,001$).

Spīrmena korelācijas starp parametriem kopējā pacientu grupā (n = 81)

Parametri	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.
1. Vecums	-																
2. KMI	0,18	-															
3. HIV RNS	-0,13	-0,12	-														
4. CD4+ T limfocīti	0,00	0,09	-0,56	-													
5. CD8+ T limfocīti	0,09	0,43	-0,37	0,62	-												
6. Leikocītu skaits	-0,01	0,06	-0,34	0,58	0,41	-											
7. Eritrocītu skaits	-0,11	0,23	-0,21	0,04	0,23	0,36	-										
8. Hemoglobīns	0,03	0,39	-0,41	0,28	0,42	0,49	0,76	-									
9. Trombocītu skaits	-0,07	-0,06	-0,12	0,31	0,05	0,37	0,04	0,00	-								
10. ALT	-0,08	0,20	-0,16	0,10	0,12	0,49	0,56	0,58	0,16	-							
11. AST	-0,12	0,04	-0,01	-0,01	-0,11	0,28	0,34	0,29	0,15	0,76	-						
12. FIB-4	0,25	0,01	0,16	-0,26	-0,13	-0,24	-0,07	-0,06	-0,64	0,02	0,37	-					
13. LBP	0,10	-0,13	0,14	0,06	0,01	0,04	-0,21	-0,28	0,10	0,11	-0,22	-0,15	-				
14. sCD14	-0,03	-0,18	0,19	-0,17	-0,25	-0,36	-0,35	-0,47	0,13	-0,24	-0,13	-0,07	0,30	-			
15. IgM EndoC	-0,27	0,19	0,01	0,03	0,10	-0,01	0,17	0,08	0,03	0,19	0,26	0,01	-0,18	0,06	-		
16. IgG EndoC	-0,16	-0,02	0,20	-0,34	-0,26	-0,19	-0,01	0,00	-0,16	-0,02	0,02	0,09	-0,08	0,14	0,51	-	
17. CK18-M30	-0,16	0,01	0,00	0,02	0,07	0,24	0,30	0,19	-0,08	0,47	0,56	0,29	-0,30	-0,14	0,30	0,13	-
18. Šenona ind.	0,01	0,43	-0,09	0,06	0,31	0,16	0,46	0,48	0,01	0,35	0,19	-0,04	-0,31	-0,37	0,01	-0,07	0,24

KMI – ķermeņa masas indekss, HIV RNS – HIV slodze, ALT – alanīnaminotransferāze, AST – aspartāminotransferāze, FIB-4 – aknu fibrozes indekss, LBP – lipopolisaharīdu saistošais proteīns, sCD14 – šķīstošais CD14 receptors, IgM EndoCab – IgM klases antivielas pret endotoksīnu, IgG EndoCab – IgG klases antivielas pret endotoksīnu, CK18-M30 – citokeratīna 18 fragments M30.

Pozitīva korelācija ar $p < 0,05$

Pozitīva korelācija ar $p < 0,01$

Pozitīva korelācija ar $p < 0,001$

Negatīva korelācija ar $p < 0,05$

Negatīva korelācija ar $p < 0,01$

Negatīva korelācija ar $p < 0,001$

3.4.3. Savstarpējas saistības starp parametriem HIV pacientu grupā

Pacientiem ar HIV monoinfekciju vīrusa slodze HIV RNS negatīvi korelēja ar CD4⁺ T limfocītu skaitu ($r_s = -0,43$, $p < 0,05$) un hemoglobīna līmeni ($r_s = -0,61$, $p < 0,01$) un pozitīvi ar sCD14 ($r_s = 0,45$, $p < 0,05$) un IgG antivielām pret endotoksīnu serdes antigēnu ($r_s = 0,55$, $p < 0,01$) (3.6. tabula).

3.6. tabula

Spīrmena korelācijas pacientiem ar HIV monoinfekciju (n = 28)

Parametri	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1. HIV RNS	–								
2. CD4 ⁺ T limfocīti	-0,43*	–							
3. Hb	-0,61**	0,30	–						
4. FIB-4	0,28	-0,35	-0,17	–					
5. LBP	0,18	-0,10	-0,27	-0,08	–				
6. sCD14	0,45*	-0,21	-0,47*	-0,01	0,33	–			
7. IgM EndoCAb	0,28	0,09	-0,07	-0,07	0,22	0,37	–		
8. IgG EndoCAb	0,55**	-0,35	-0,23	0,27	0,32	0,44*	0,51**	–	
9. CK18-M30	0,18	0,05	-0,08	0,36	-0,19	0,15	0,09	0,07	–
10. Šenona indekss	-0,29	0,07	0,46*	-0,30	-0,31	-0,31	-0,38*	-0,32	-0,04

HIV RNS – HIV slodze, Hb – hemoglobīns, FIB-4 – aknu fibrozes indekss, LBP – lipopolisaharīdu saistošais proteīns, sCD14 – šķīstošais CD14 receptors, IgM EndoCAb – IgM klases antivielas pret endotoksīnu, IgG EndoCAb – IgG klases antivielas pret endotoksīnu, CK18-M30 – citokeratīna 18 fragments M30.

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Hemoglobīna līmenis bija saistīts ar sCD14 ($r_s = -0,47$, $p < 0,05$) un Šenona indeksu ($r_s = 0,46$, $p < 0,05$). Savā starpā bija saistītas IgM un IgG antivielas pret endotoksīna serdi ($r_s = 0,51$, $p < 0,01$), savukārt IgM antivielas pret endotoksīna serdi uzrādīja saistību ar Šenona indeksu ($r_s = -0,38$, $p < 0,05$).

3.4.4. Savstarpējas saistības starp parametriem HIV / HCV koinficēto pacientu grupā

Šajā pacientu grupā bija atklātas tikai divas korelācijas: HIV RNS bija negatīvi saistīta ar CD4⁺ T limfocītu skaitu ($r_s = -0,60$, $p < 0,01$) un savstarpējā saistība starp IgM un IgG antivielām pret endotoksīna serdi ($r_s = 0,49$, $p < 0,01$) (3.7. tabula).

3.7. tabula

Spīrmena korelācijas pacientiem ar HIV / HCV koinfēciju (n = 29)

Parametri	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1. HIV RNS	–								
2. CD4 ⁺ T limfocīti	-0,60**	–							
3. Hb	-0,16	0,20	–						
4. FIB-4	0,32	-0,26	0,14	–					
5. LBP	0,15	0,21	0,04	-0,14	–				

Parametri	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
6. sCD14	-0,12	-0,07	-0,14	-0,12	0,19	–			
7. IgM EndoCAb	-0,24	-0,02	-0,07	-0,01	-0,27	0,11	–		
8. IgG EndoCAb	-0,04	-0,28	-0,14	0,06	-0,09	0,23	0,49**	–	
9. CK18-M30	0,04	-0,11	0,06	0,11	-0,18	-0,10	0,30	-0,00	–
10. Šenona indekss	0,15	0,03	-0,03	0,03	0,03	-0,28	-0,02	-0,21	0,19

HIV RNS – HIV slodze, Hb – hemoglobīns, FIB-4 – aknu fibrozes indekss, LBP – lipopolisaharīdu saistošais proteīns, sCD14 – šķīstošais CD14 receptors, IgM EndoCAb – IgM klases antivielas pret endotoksīnu, IgG EndoCAb – IgG klases antivielas pret endotoksīnu, CK18-M30 – citokeratīna 18 fragments M30.
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

3.4.5. Savstarpējas saistības starp parametriem HCV monoinficēto pacientu grupā

HCV pacientu grupā bija atklāta savstarpējā saistība starp IgM un IgG antivielām pret endotoksīna serdi ($r_s = 0,54$, $p < 0,01$), korelācija starp IgM EndoCAb un CK18-M30 ($r_s = 0,46$, $p < 0,01$) un korelācija starp CK18-M30 un sCD14 ($r_s = -0,47$, $p < 0,05$) (3.8. tabula).

3.8. tabula

Spīrmena korelācijas pacientiem ar HCV infekciju (n = 24)

Parametri	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
1. Hb	–						
2. FIB-4	-0,11	–					
3. LBP	-0,07	-0,30	–				
4. sCD14	-0,38	-0,14	0,19	–			
5. IgM EndoCAb	0,15	0,16	-0,29	-0,32	–		
6. IgG EndoCAb	0,30	-0,10	-0,29	-0,20	0,54**	–	
7. CK18-M30	0,26	0,29	-0,36	-0,47*	0,46*	0,30	–
8. Šenona indekss	0,24	0,30	-0,16	-0,26	0,10	0,07	0,30

Hb – hemoglobīns, FIB-4 – aknu fibrozes indekss, LBP – lipopolisaharīdu saistošais proteīns, sCD14 – šķīstošais CD14 receptors, IgM EndoCAb – IgM klases antivielas pret endotoksīnu, IgG EndoCAb – IgG klases antivielas pret endotoksīnu, CK18-M30 – citokeratīna 18 fragments M30.
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

3.4.6. Parciālās Spīrmena korelācijas kopējā pacientu grupā

Ņemot vērā atšķirības, kuras tika atklātas starp HIV, HIV / HCV un HCV grupām, un atšķirīgās savstarpējo saistību tendences katrā grupā, saistību analīzē tika veikta korekcija un tika izmantots parciālais Spīrmena korelācijas koeficients (3.9. tabula). Tas nozīmē, ka korelācijas tika aprēķinātas, izslēdzot grupu atšķirību efektus. Jāatzīmē, ka HIV RNS, CD4⁺ un CD8⁺ T limfocītu skaita rādītāji netika izmantoti korelācijas analīzē, jo šie rādītāji tika noteikti tikai divās grupās.

Parciālās Spīrmena korelācijas starp parametriem (n = 81)

Parametri	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
1. Vecums	-													
2. KMI	0,20	-												
3. Leikocīti	-0,01	0,03	-											
4. Eritrocīti	-0,12	0,12	0,36	-										
5. Hemoglobīns	0,03	0,26	0,51	0,72	-									
6. Trombocīti	-0,07	-0,10	0,36	0,02	-0,03	-								
7. ALT	-0,09	0,02	0,52	0,49	0,47	0,14	-							
8. AST	-0,13	-0,14	0,27	0,24	0,14	0,13	0,70	-						
9. FIB-4	0,25	-0,01	-0,25	-0,10	-0,10	-0,65	-0,01	0,38	-					
10. LBP	0,10	-0,01	0,07	-0,12	-0,17	0,12	0,04	-0,11	-0,14	-				
11. sCD14	-0,04	-0,10	-0,35	-0,30	-0,42	0,15	-0,14	-0,04	-0,06	0,25	-			
12. IgM EndoCab	-0,27	0,12	-0,02	0,11	-0,01	0,01	0,11	0,20	0,00	-0,13	0,11	-		
13. IgG EndoCab	-0,16	-0,08	-0,21	-0,06	-0,06	-0,17	-0,09	-0,03	0,08	-0,05	0,18	0,50	-	
14. CK18-M30	-0,17	-0,18	0,23	0,19	0,01	-0,12	0,34	0,47	0,29	-0,21	-0,04	0,25	0,08	-
15. Šenona ind.	0,02	0,28	0,14	0,35	0,32	-0,03	0,12	-0,05	-0,09	-0,19	-0,30	-0,13	-0,16	0,02

KMI – ķermeņa masas indekss, ALT – alanīnaminotransferāze, AST – aspartātaminotransferāze, FIB-4 – aknu fibrozes indekss, LBP – lipopolisaharīdu saistošais proteīns, sCD14 – šķīstošais CD14 receptors, IgM EndoCab – IgM klases antivielas pret endotoksīnu, IgG EndoCab – IgG klases antivielas pret endotoksīnu, CK18-M30 – citokeratīna 18 fragments M30.



Pozitīva korelācija ar $p < 0,05$

Pozitīva korelācija ar $p < 0,01$

Pozitīva korelācija ar $p < 0,001$

Negatīva korelācija ar $p < 0,05$

Negatīva korelācija ar $p < 0,01$

Negatīva korelācija ar $p < 0,001$

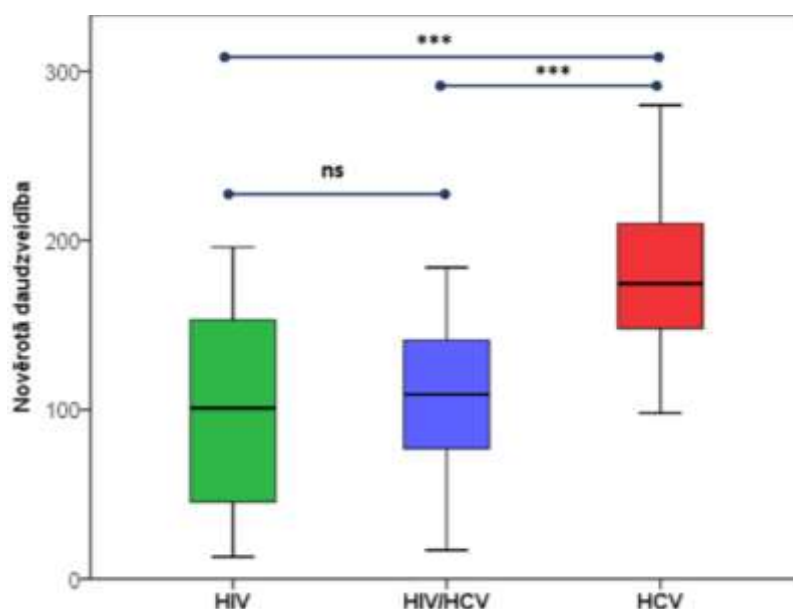
Ņemot vērā darba uzdevumu, kas paredz noteikt fēču mikrobiotas savstarpējo saikni ar mikrobu translokācijas marķieriem un aknu fibrozes rādītājiem, tika skatītas arī saistības starp Šenona indeksu un citiem rādītājiem. Baktēriju daudzums fēču paraugā (Šenona indekss) ir pozitīvi saistīts ar pacienta ĶMI ($r_s = 0,28$, $p < 0,05$), eritrocītu skaitu ($r_s = 0,35$, $p < 0,01$) un hemoglobīnu ($r_s = 0,32$, $p < 0,01$) un negatīvi saistīts ar mikrobu translokācijas marķieri sCD14 ($r_s = -0,30$, $p < 0,01$). Savukārt sCD14 ir pozitīvi saistīts ar LPB ($r_s = 0,25$, $p < 0,05$) un negatīvi ar asins parametriem: leikocītiem ($r_s = -0,35$, $p < 0,01$), eritrocītiem ($r_s = -0,30$, $p < 0,01$) un hemoglobīnu ($r_s = -0,42$, $p < 0,001$).

3.5. Fēču mikrobiotas analīze

3.5.1. Fēču mikrobiotas relatīvais daudzums un daudzveidība

Izvērtējot fēču mikrobiotu, vispirms tika salīdzināti daudzveidības rādītāji: fēču baktēriju kopējais taksonomisko vienību skaits jeb kopējā novērotā daudzveidība (angļu valodā – *observed richness*), Šenona (*Shannon*) indekss un apgrieztais Simpsona (*Simpson*) indekss.

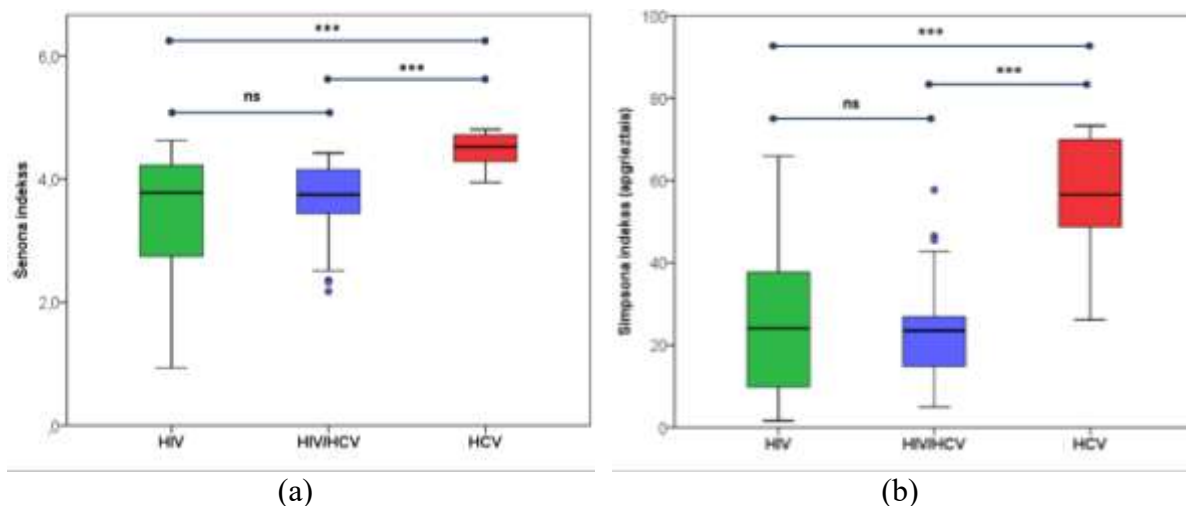
Šajos parametros tika konstatētas atšķirības starp pētījuma grupām. Pacienti ar HCV bija atklāta lielāka kopējā fēču baktēriju daudzveidība (3.8. attēls), salīdzinot ar HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinfēcētiem pacientiem, bet netika konstatētas atšķirības starp HIV monoinfēcētiem un HIV / HCV koinfēcētiem pacientiem.



3.8. attēls. Atšķirības starp grupām fēču baktēriju kopējā daudzveidībā

*** – $p < 0,001$, ns – nav ticamas atšķirības.

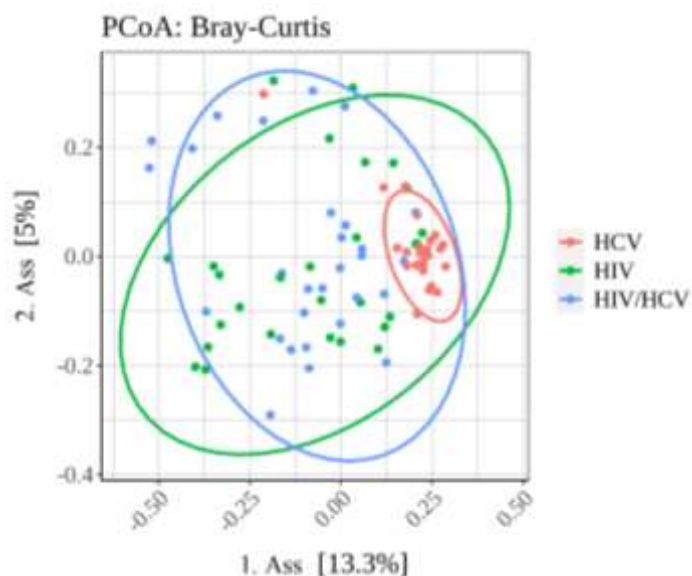
Līdzīgi rezultāti tika konstatēti Šenona indeksa (3.9.(a) attēls) un apgrieztā Simpsona indeksa (3.9.(b) attēls) lielumos. HCV monoinficētiem pacientiem tie bija augstāki nekā pacientiem ar HIV monoinfekciju un HIV / HCV koinfekciju, bet netika konstatētas atšķirības baktēriju gēnu daudzveidībā starp HIV monoinficētiem un koinficētiem ar HCV pacientiem.



3.9. attēls. Atšķirības starp grupām Šenona (a) un apgrieztā Simpsona (b) indeksā

*** – $p < 0,001$, ns – nav ticamas atšķirības.

Attiecībā uz baktēriju sastāva beta daudzveidību tika veikta galveno koordinātu analīze (*Principal Coordinate Analysis, PCoA*), pamatojoties uz Breja-Kurtisa (*Bray-Curtis*) atšķirīguma indeksu. Rezultāts parādīja, ka HCV monoinficētu pacientu zarnu mikrobiotas sastāvs veido atšķirīgu klasteri, ko apstiprināja permutācijas daudzfaktoru ANOVA ($p = 0,001$). HIV pacientiem neatkarīgi no HCV klātbūtnes nevēroja atsevišķu specifisku fēču mikrobiotas sastāva klasteru veidošanos (3.10. attēls).

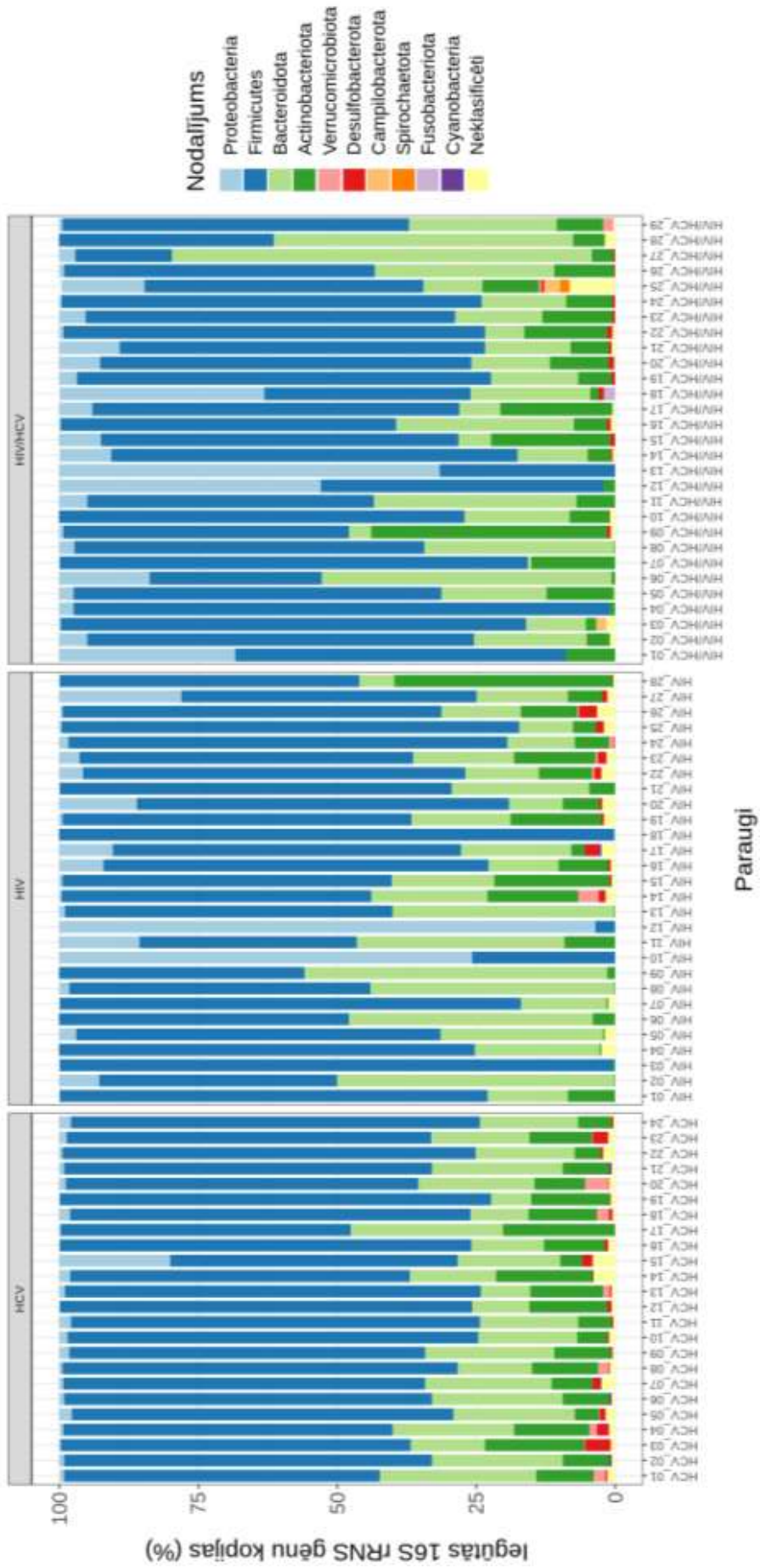


3.10. attēls. Atšķirības fēču mikrobiotas β daudzveidībā starp pacientu grupām

3.5.2. Fēču mikrobiotas sastāvs

Fēču paraugos kopā tika konstatēta 1651 taksonomiskā vienība, kuras piederēja 12 baktēriju nodalījumiem, 15 klasēm, 40 rindām un 71 baktēriju dzimtij. Vairāk nekā 98 % no visiem baktēriju nodalījumiem piederēja 10 baktēriju nodalījumiem: *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Proteobacteria*, *Desulfobacteriota*, *Fusobacteriodota*, *Verrucomicrobiota*, *Campilobacteriota*, *Spirochaetota*, *Cyanobacteriota* (3.11. attēls).

Lai izvērtētu baktēriju sastāva atšķirības, tika veikta taksonomisko vienību analīze pētījuma grupās, apskatot atšķirības baktēriju relatīvajā daudzumā nodalījumu, klašu, rindas un dzimtu līmenī (Cavalier-Smith, 1998). Biežāk atrasto un turpmāk darba gaitā analizēto baktēriju taksonomisko vienību piederība taksonomiskajām grupām apkopota tabulā (3.10. tabula).



3.1.1. attēls. Baktēriju nodalījumu kopējais pārskats visiem pacientiem

Katra kolonna atbilst vienam pacientam un rāda baktēriju nodalījumu relatīvo daudzumu % no kopējā baktēriju sekvenču daudzuma paraugā.

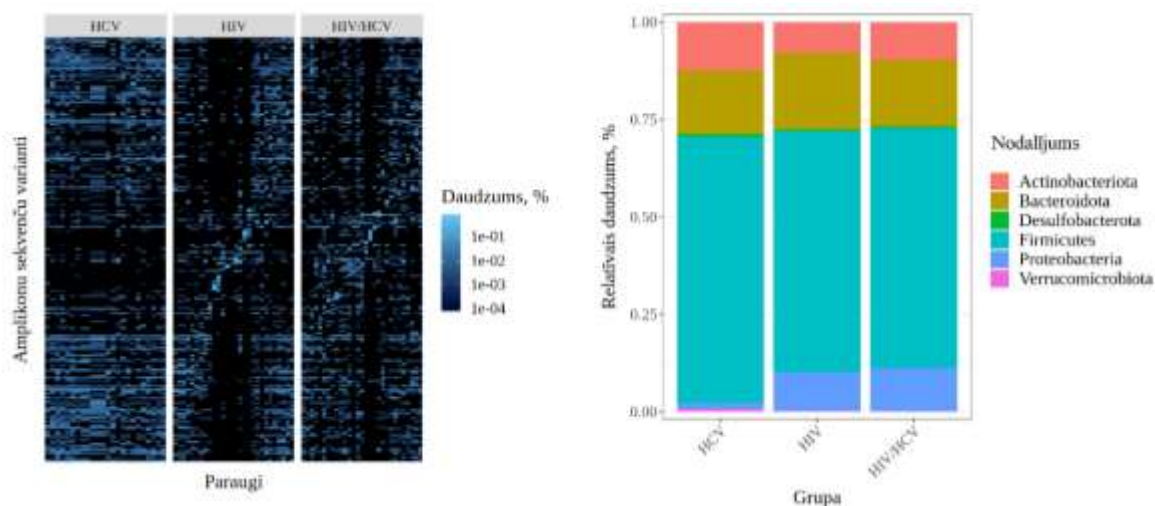
Biežāk atrasto baktēriju piederība taksonomiskajām grupām

Nodalījums	Klase	Rinda	Dzimta	Ģints	
Firmicutes	Clostridia	<i>Lachnospirales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Eubacterium halli</i>	
				<i>Anaerostipes</i>	
				<i>Eisenbergiella</i>	
		<i>Eubacteriales</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Romboutsia</i>	
		<i>Oscillospirales</i>	<i>Oscillospiraceae</i>	<i>Oscillibacter</i>	
			<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Faecalibacterium</i> <i>Subdoligranulum</i>	
	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>		
	Bacilli	<i>Lactobacillales</i>		<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>
				<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
				<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospira</i>
				<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
				<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Holdemanella</i>
					<i>Catenibacterium</i>
				<i>Erysipelatoclostridiaceae</i>	<i>Clostridium innocum</i>
<i>Erysipelatoclostridium</i>					
Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroides</i> <i>Parabacteroides</i>	
			<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	
			<i>Tannerellaceae</i>	<i>Tannerella</i>	
Actino- bacteriota	Actinobacteria	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	
		<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>	
		<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacteria</i>	
	Coriobacteria	<i>Coriobacteriales</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Collinsella</i>	
Proteo- bacteria	Gammaproteo- bacteria	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i>	
Desulfo- bacteriota	Desulfivibrionia	<i>Desulfivibrionales</i>	<i>Desulfivibrionaceae</i>	<i>Desulfivibrio</i>	

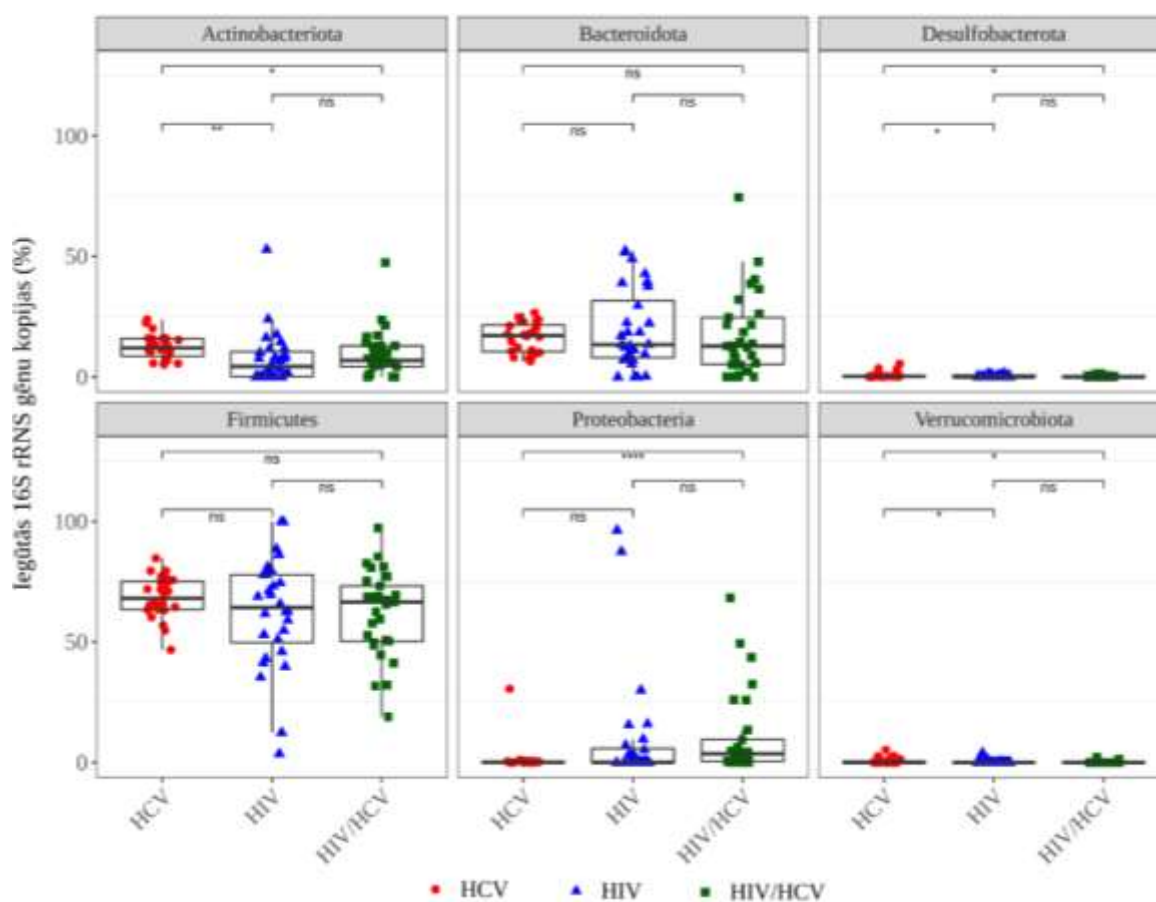
Nodalījumu līmenī visās pētījuma grupās dominēja baktēriju nodalījumi – *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota* un *Proteobacteria* –, turklāt *Firmicutes* relatīvie daudzumi aizņēma vairāk nekā 50 % no visām baktēriju sekvencēm, to mediānas un [IQR – starpkvartiļu amplitūda] HCV monoinficētiem bija 66,2 % [63,3–73,6 %], HIV monoinficētiem 62,8 % [53,6–71,6 %] un HIV / HCV koinficētiem 64,4 % [51,4–72,9 %] no kopējā baktēriju relatīvā daudzuma.

HCV monoinficētiem pacientiem tika atrastas *Bacteroidota* 17,9 % [13,4–22,9 %], *Actinobacteriota* 10,2 % [7,1–13,2 %] un *Proteobacteria* 0,8 % [0,57–1,8 %]. HIV monoinficētiem: *Bacteroidota* 17 % [11,5–25,9 %], *Actinobacteriota* 4,5 % [0,3–9,1 %], *Proteobacteria* 0,8 % [0,1–7,3 %], savukārt HIV / HCV koinficētiem pacientiem: *Bacteroidota* 15,4 % [7,1–26,6 %], *Actinobacteriota* 6,9 % [3,9–10,8 %] un *Proteobacteria* 3,1 % [0,7–9,3 %] (3.12. attēls).

Firmicutes-Bacteroidota attiecība statistiski nozīmīgi neatšķirās starp grupām.



3.12. attēls. Atšķirību pārskats starp grupām baktēriju nodalījumu relatīvajos daudzumos



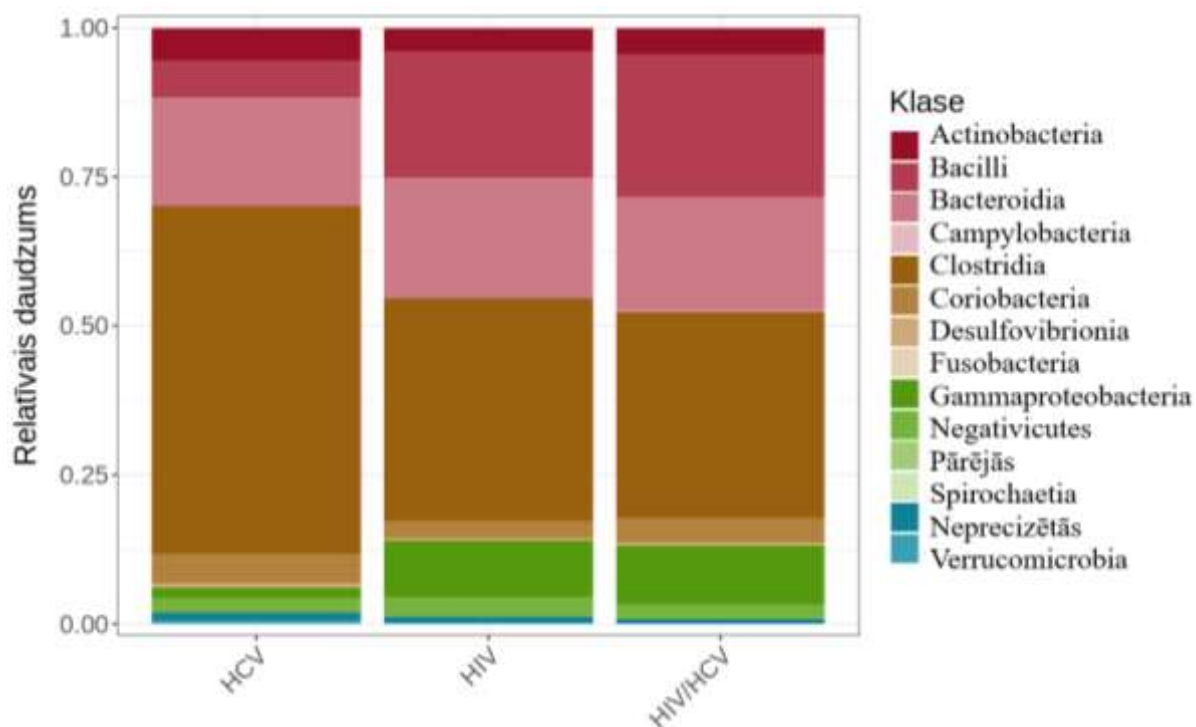
3.13. attēls. Atšķirības starp grupām baktēriju nodalījumu relatīvajos daudzumos

* -p < 0,05; ** -p < 0,01; **** -p < 0,0001; ns – nav statistiski ticamas atšķirības.

Dominējošo nodalījumu līmenī *Firmicutes* un *Bacteroidota* relatīvie daudzumi būtiski neatšķirās starp grupām, savukārt *Actinobacteria* relatīvie daudzumi bija lielāki HCV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HIV monoinficētiem ($p < 0,01$) un HIV / HCV

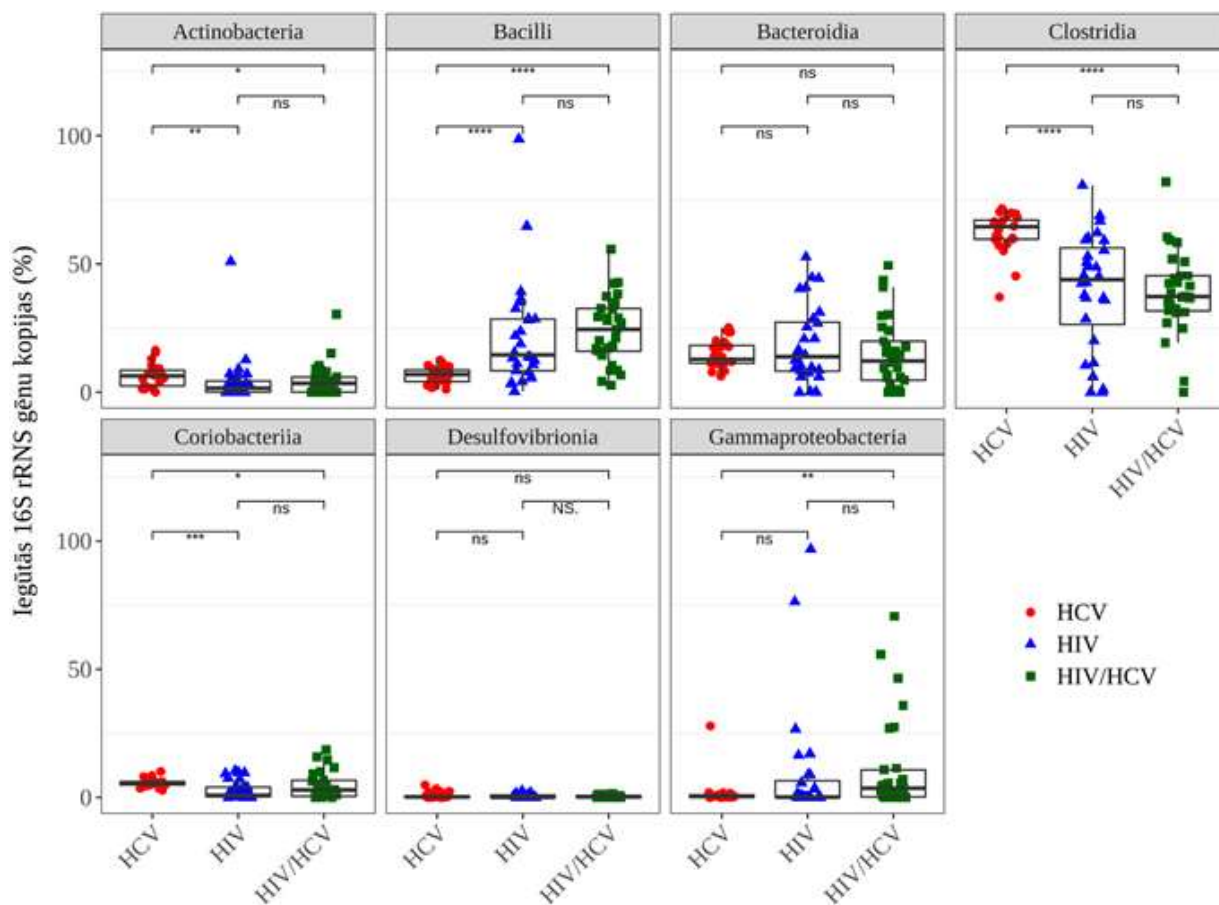
koinficētiem ($p < 0,05$), bet neatšķirās starp HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem. *Verrucomicrobiota* nodalījuma relatīvie daudzumi uzrādīja līdzīgus rezultātus – tie bija lielāki HCV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HIV monoinficētiem ($p < 0,05$) un HIV / HCV koinficētiem ($p < 0,05$), bet neatšķirās starp HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem. *Desulfobacteriota* relatīvais daudzums bija mazāks HCV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HIV monoinficētiem ($p < 0,05$) un ar HIV / HCV koinficētiem ($p < 0,05$), bet nenovēroja atšķirības starp HIV monoinficētiem un koinficētiem ar HCV pacientiem. Nozīmīgi lielākus relatīvos daudzumus HIV / HCV koinficēto grupā, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem, novēroja *Proteobacteria* ($p < 0,0001$) nodalījuma baktērijām (3.13. attēls).

Tālāk analizējot baktēriju atšķirības **klases** līmenī, tika konstatētas šādas biežākās baktēriju klases: visvairāk novērotā klase bija *Clostridia* baktēriju klase – HCV monoinficētajiem 60,2 % [57,0–64,2 %], HIV monoinficētajiem 52,6 % [25,5–52,7%], HIV / HCV koinficētajiem 35,6 % [27,5–44,1 %]. HCV monoinficētiem novēroja *Bacteroidia* klasi 18,2 % [13,5–23,4 %], *Actinobacteria* 5,1 % [2,5–7,7 %], *Bacilli* 6,1 % [4,7–8,4 %], *Coriobacteria* 4,7 % [3,9–5,7 %], *Desulfovibrionia* 0,3 % [0,1–0,7 %] un *Gammaproteobacteria* 0,8 % [0,6–1,8 %]. HIV monoinficētiem: *Bacteroidia* 18,2 % [13,5–23,4 %], *Actinobacteria* 1,4 % [0,0–4,6 %], *Bacilli* 15,3 % [14,9–33,5 %], *Coriobacteria* 1,7 % [0,2–4,1 %], *Desulfovibrionia* 0,0 % [0,0–0,6 %] un *Gammaproteobacteria* 0,8 % [0,1–7,4 %]. Savukārt HIV / HCV koinficētiem *Bacteroidia* klasi novēroja 15,5 % [7,1–26,7 %], *Actinobacteria* 3,6 % [1,1–5,8 %], *Bacilli* 22,2 % [14,9–33,5 %], *Coriobacteria* 3,7 % [0,6–5,8 %], *Desulfovibrionia* 0,2 % [0,0–0,5 %] un *Gammaproteobacteria* 3,1 % [0,7–9,3 %] (3.14.(a) attēls).



3.14.(a) attēls. Atšķirības starp grupām baktēriju klašu relatīvajos daudzumos

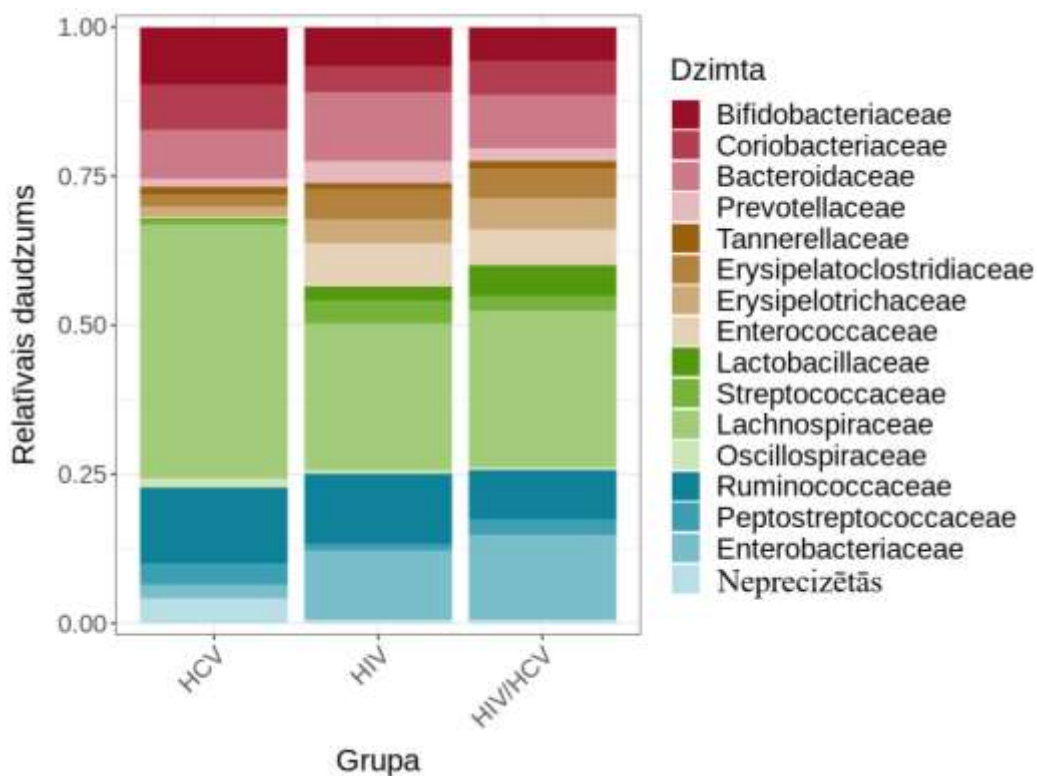
Atšķirības starp klasēm relatīvajos daudzumos netika konstatētas *Bacteroidia* klasē (3.14.(b) attēls). Nozīmīgas atšķirības konstatēja *Bacilli* klasei, kur HCV monoinficētiem pacientiem bija mazāks relatīvais daudzums nekā HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,001$). Savukārt *Clostridia* klasē novēroja pretēju tendenci – HCV grupā bija lielāks to daudzums, salīdzinot ar HIV inficēto grupām ($p < 0,001$). *Actinobacteria* bija lielāka HCV monoinficētiem, salīdzinot ar HIV monoinficētiem ($p < 0,01$), bet neatšķirās starp pārējām grupām. Savukārt *Gammaproteobacteria* bija mazāka HCV monoinficētiem, salīdzinot ar HIV / HCV koinficētiem ($p < 0,05$), bet *Desulfovibrionia* atšķirās starp HCV un HIV un HCV un HIV / HCV inficētiem pacientiem ($p < 0,05$).



3.14.(b) attēls. Atšķirības starp grupām baktēriju klašu relatīvajos daudzumos

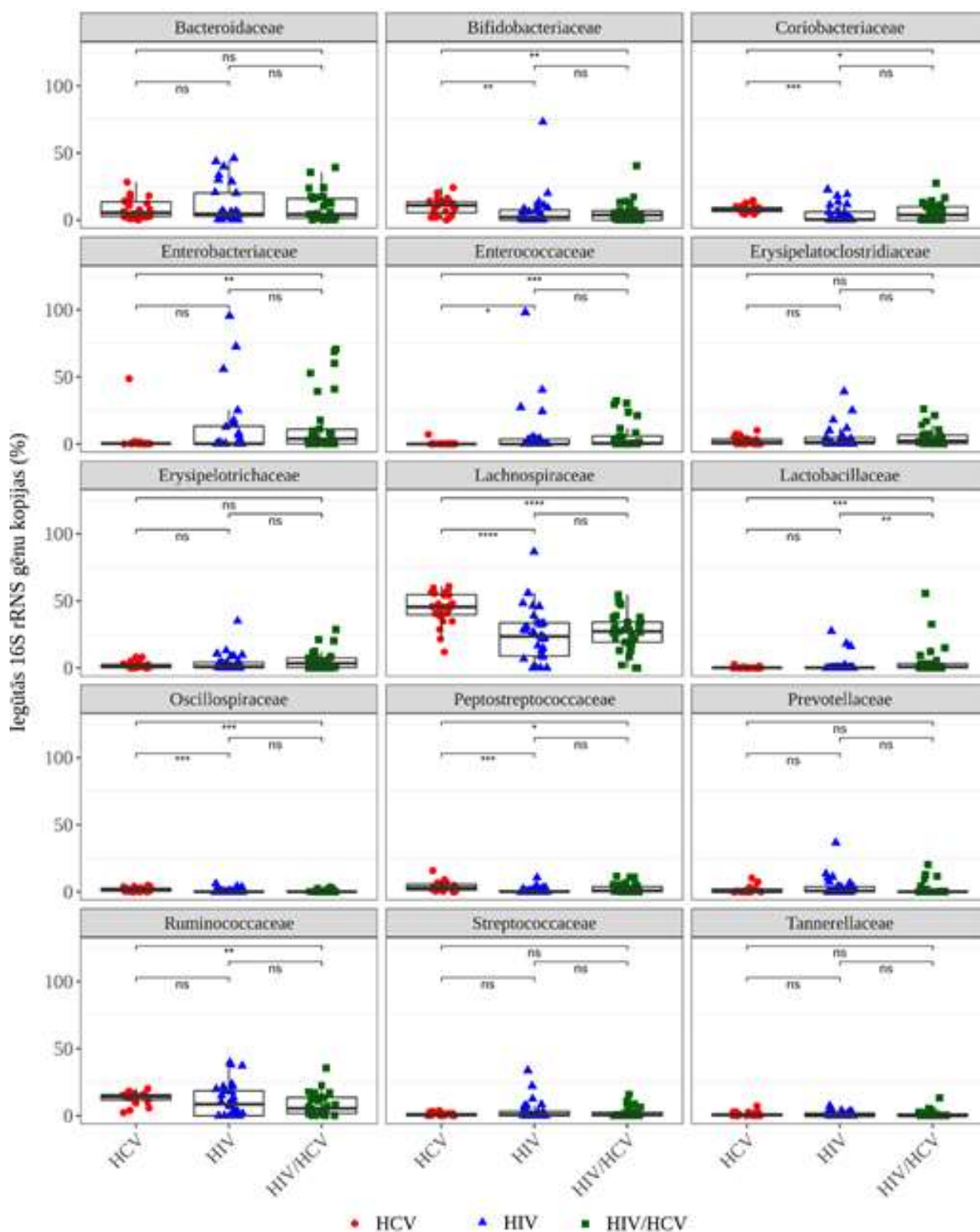
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$; ns – nav statistiski ticamas atšķirības.

Baktēriju **dzimtas** līmenī tika konstatētas šādas biežākās baktēriju dzimtas: HCV monoinficētiem tika atrastas *Lachnospiraceae* 45,5 % [39,6–54,5 %], *Ruminococcaceae* 14,2 % [11,9–15,8 %], *Bifidobacteriaceae* 10,9 % [5,6–13,7 %], *Bacteroidaceae* 5,8 % [2,7–13,4 %], *Coriobacteriaceae* 7,5 % [6,4–9,3 %], *Prevotellaceae* 0,0 % [0,0–2,0 %], *Enterobacteriaceae* 0,24 % [0,0–0,4 %]. HCV pacientiem *Enterococcaceae* nosakāmā daudzumā nekonstatēja. HIV monoinficētiem: *Lachnospiraceae* 23,4 % [8,8–33,5 %], *Ruminococcaceae* 8,5 % [0,0–18,6 %], *Bacteroidaceae* 4,6 % [2,8–20,1 %], *Coriobacteriaceae* 0,3 % [0,0–6,1 %], *Bifidobacteriaceae* 2,2 % [0,0–7,5 %], *Prevotellaceae* 0,5 % [0,0–3,8 %] un *Enterobacteriaceae* 0,2 % [0,0–13,2 %], *Enterococcaceae* 0,0 % [0,0–3,5 %], savukārt HIV / HCV koinficētiem pacientiem: *Lachnospiraceae* 27,2 % [19,1–34,1 %], *Ruminococcaceae* 5,34 % [1,7–13,5 %], *Bacteroidaceae* 4,2 % [1,5–15,9 %], *Coriobacteriaceae* 3,8 % [0,0–9,9 %], *Bifidobacteriaceae* 3,8 % [0,0–6,8 %], *Prevotellaceae* 0,0 % [0,0–0,4 %], *Enterobacteriaceae* 3,8 % [0,1–10,9 %] un *Enterococcaceae* 0,6 % [0,0–5,9 %] (3.15.(a) attēls).



3.15.(a) attēls. Atšķirības starp grupām baktēriju dzimtu relatīvajos daudzumos

Atšķirības starp grupām relatīvajos daudzumos nenovēroja *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Streptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae* un *Tannerellaceae* dzimtām (3.15.(b) attēls). Būtiski mazāks *Lachnospiraceae* un *Bifidobacteriaceae* dzimšu relatīvais daudzums bija HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem (attiecīgi $p < 0,0001$; $p < 0,01$), bet tas neatšķīrās starp HIV mono un koinficēto grupām. Vairākas baktēriju dzimtas parādīja līdzīgus rezultātus – to daudzumi bija mazāki HIV / HCV koinficētiem un HIV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem, attiecīgi: *Oscillospiraceae* ($p < 0,001$), *Ruminococcaceae* ($p < 0,01$), *Peptostreptococcaceae* (attiecīgi $p < 0,05$; $p < 0,001$) un *Coriobacteriaceae* (attiecīgi $p < 0,05$; $p < 0,001$). Pretēji rezultāti tika atrasti *Enterobacteriaceae* dzimtas un *Enterococcaceae* dzimtas relatīvajos daudzumos – vismazāk tie bija pārstāvēti HCV monoinficēto grupā, salīdzinot ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem (attiecīgi $p < 0,01$; $p < 0,001$). *Lactobacillaceae* dzimtas relatīvais daudzums vislielākais bija HIV / HCV koinficēto grupā, salīdzinot ar HIV monoinficētiem ($p < 0,01$) un HCV monoinficētiem pacientiem ($p < 0,001$), bet tas neatšķīrās starp HIV un HCV monoinficēto pacientu grupām.



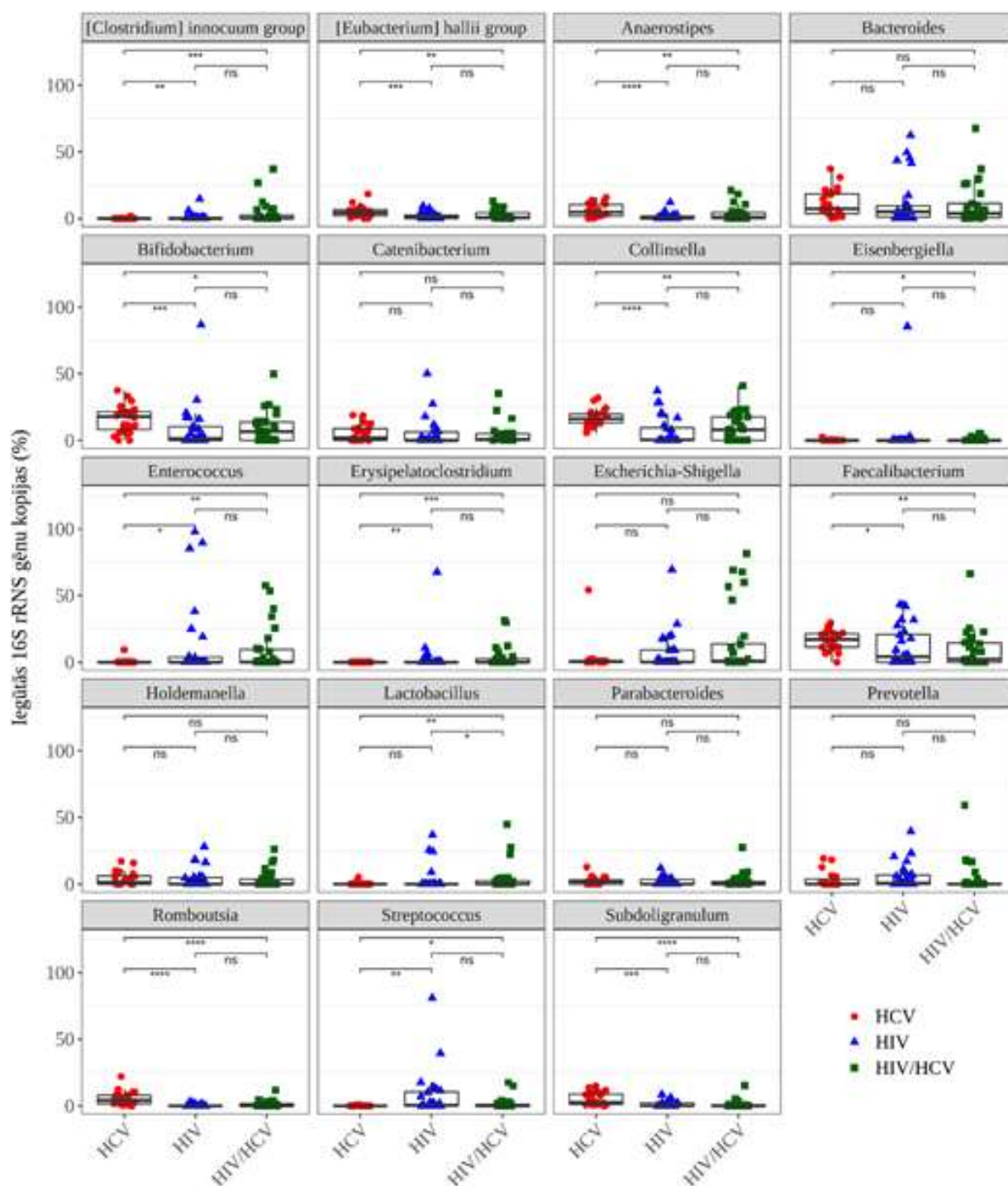
3.15.(b) attēls. Atšķirības starp grupām baktēriju dzimšu relatīvajos daudzumos

* $-p < 0,05$; ** $-p < 0,01$; *** $-p < 0,001$; **** $-p < 0,0001$; ns – nav statistiski ticamas atšķirības.

Baktēriju ģinšu līmenī novēroja atšķirības starp grupām (3.16. attēls). HCV monoinficēto grupā mazāki šādu ģinšu baktēriju relatīvie daudzumi, salīdzinot ar HIV / HCV koinficētiem un HIV monoinficētiem pacientiem: *Clostridium innocuum* – ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,001$) un HIV monoinficētiem ($p < 0,01$), *Enterococcus* – ar

HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,01$) un HIV monoinficētiem ($p < 0,05$), *Erysipeloclostridium* – HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,001$) un HIV monoinficētiem ($p < 0,01$), *Streptococcus* – ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,05$), HIV monoinficētiem ($p < 0,01$), savukārt *Lactobacillus* ģints relatīvie daudzumi neatšķirās starp HCV un HIV monoinficētiem, bet novēroja atšķirības starp HIV / HCV koinficētiem un HCV monoinficētiem pacientiem ($p < 0,01$) un HIV / HCV koinficētiem un HIV monoinficētiem pacientiem ($p < 0,05$).

Savukārt pretēja tendence, kad HCV monoinficētiem ir lielāki kādas ģints relatīvie daudzumi, salīdzinot ar HIV inficētiem, novēroja: *Bifidobacterium* – ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,05$), HIV monoinficētiem ($p < 0,001$), *Collinsella* – ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,01$), HIV monoinficētiem ($p < 0,0001$), *Anaerostipes* – ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,01$), HIV monoinficētiem ($p < 0,0001$), *Eubacterium halli* – ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,01$), HIV monoinficētiem ($p < 0,001$), *Faecalibacterium* – ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,01$), HIV monoinficētiem ($p < 0,05$), *Romboutsia* – ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem ($p < 0,0001$), HIV monoinficētiem ($p < 0,0001$), *Subdoligranalum* – ar HIV / HCV koinficētiem ($p < 0,0001$) un HIV monoinficētiem pacientiem ($p < 0,001$).



3.16. attēls. Atšķirības starp grupām baktēriju ģinšu relatīvajos daudzumos

* -p < 0,05; ** -p < 0,01; *** -p < 0,001; **** -p < 0,0001; ns – nav statistiski ticamas atšķirības.

3.6. Fēču mikrobiotas daudzveidības un bioķīmisko marķieru asociācija

Lai novērtētu atsevišķu baktēriju klašu savstarpējās saistības ar mikrobu translokācijas un aknu fibrozes parametriem, tika veikta korelāciju analīze pētījuma grupās. CD4⁺, CD 8⁺ T limfocītu un HIV RNS korelācijas tika skatītas tikai HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem (3.17. attēls). Analīzei tika izvēlēts klašu līmenis, lai labāk varētu

izvērtēt iespējamās korelācijas un lai mazinātos datu sadrumstalotība. Tika izmantots Spīrmena korelāciju tests.

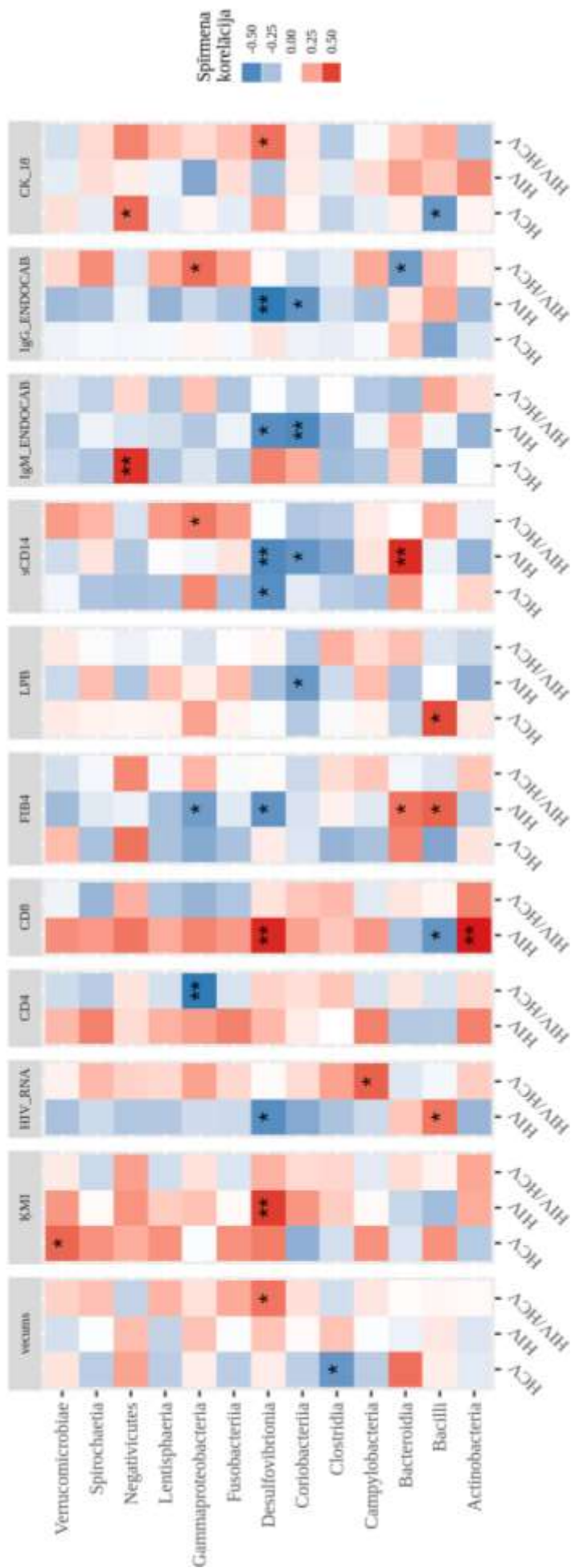
***Actinobacteriota* nodalījuma baktēriju klasēs** konstatēja šādas korelācijas: *Actinobacteria* klase pozitīvi korelēja ar CD8⁺ T limfocītu skaitu HIV pacientiem ($r_s = 0,560$, $p < 0,01$), savukārt *Coriobacteriia* klase HIV pacientiem uzrādīja negatīvas korelācijas ar LBP ($r_s = -0,426$, $p < 0,05$), sCD14 ($r_s = -0,02$, $p < 0,05$), EndoCAB IgM ($r_s = -0,501$, $p < 0,01$) un EndoCAB IgG antivielām ($r_s = -0,456$, $p < 0,05$).

***Firmicutes* nodalījumā:** HIV monoinficētiem pacientiem *Bacilli* klase negatīvi korelēja ar CD8⁺ T limfocītiem ($r_s = -0,444$, $p < 0,05$), bet pozitīvi ar HIV RNS ($r_s = 0,378$, $p < 0,05$), LBP ($r_s = 0,48$, $p < 0,05$) un FIB-4 ($r_s = 0,424$, $p < 0,05$), savukārt HCV pacientiem negatīvi korelēja ar CK18-M30 ($r_s = -0,433$, $p < 0,05$). *Negativicutes* klase pozitīvi korelēja HCV monoinficētiem pacientiem ar EndoCAB IgM ($r_s = 0,526$, $p < 0,01$) un CK18-M30 ($r_s = 0,409$, $p < 0,05$). *Clostridia* klase, kas ir viena no visvairāk pārstāvētajām baktēriju klasēm zarnu mikrobiotā, negatīvi korelēja ar vecumu ($r_s = -0,436$, $p < 0,05$) tikai HCV monoinficēto grupā.

***Bacteriodota* nodalījuma *Bacteroidia* klases** relatīvie daudzumi HIV monoinficētiem pacientiem pozitīvi korelēja ar sCD14 ($r_s = 0,535$, $p < 0,05$) un FIB-4 indeksu ($r_s = 0,379$, $p < 0,05$), bet HIV / HCV koinficēto grupā novēroja negatīvu korelāciju ar EndoCAB IgG antivielām ($r_s = -0,417$, $p < 0,05$).

***Proteobacteria* nodalījuma *Gammaproteobacteriia* klasē** novēroja šādas korelācijas: HIV monoinficēto pacientu grupā negatīvu korelāciju ar FIB-4 ($r_s = -0,408$, $p < 0,05$), bet HIV / HCV koinficēto grupā negatīvu korelāciju ar CD4⁺ T limfocītiem ($r_s = -0,554$, $p < 0,01$), bet pozitīvu ar EndoCAB IgG antivielām ($r_s = 0,40$, $p < 0,05$) un sCD14 ($r_s = 0,369$, $p < 0,05$).

Savukārt *Desulfovibrionia* klase, kas ir viena no vismazāk pārstāvētajām klasēm un pieder ***Desulfobacteriota* nodalījumam**, HIV pacientiem korelēja pozitīvi ar CD8⁺ T limfocītu skaitu ($r_s = 0,544$, $p < 0,01$), bet negatīvi ar FIB-4 indeksu ($r_s = -0,455$, $p < 0,05$), HIV RNS ($r_s = -0,476$, $p < 0,05$), EndoCAB IgM ($r_s = -0,474$, $p < 0,05$), EndoCAB IgG antivielām ($r_s = -0,554$, $p < 0,01$) un sCD14 ($r_s = -0,495$, $p < 0,01$). Savukārt HIV / HCV koinficēto grupā novēroja pozitīvu vidēju korelāciju ar ĶMI ($r_s = 0,377$, $p < 0,01$) un CK18-M30 ($r_s = 0,386$, $p < 0,01$), bet HCV monoinficētiem pacientiem pozitīvu korelāciju ar sCD14 ($r_s = 0,471$, $p < 0,01$).



3.17. attēls. Baktēriju klašu, HIV infekcijas raksturojošo lielumu, mikrobu translokācijas un aknu fibrozes parametru Spīrmena korelācijas pētījuma grupās

HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss, HCV – C hepatīta vīruss, KMI – ķermeņa masas indekss, CK18 – citokeratīna 18 neopītops M30, FIB-4 – aknu fibrozes indekss,

HIV RNS – HIV vīrusa ribonukleīnskābe, EndoCab IgG – IgG antivielas pret endotoksīna serdi, IgM EndoCab – IgM antivielas pret endotoksīna serdi,

LBP – lipopolisaharīdu saistošais olbaltums, sCD14 – šķīstošais CD14 receptors. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; sarkana krāsa apzīmē pozitīvu korelāciju; zila krāsa apzīmē negatīvu korelāciju.

4. Diskusija

Promocijas darbs veltīts zarnu mikrobiotas sastāva un daudzveidības izpētei HIV un HCV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, mikrobu translokācijas rādītāju atšķirībām šajās pacientu grupās, kā arī iespējamai mikrobiotu raksturojošo parametru un mikrobu translokācijas marķieru savstarpējai saistībai.

Jau iepriekš pētījumos ir pierādīta mikrobu translokācijas loma HIV infekcijas imūnās aktivācijas uzturēšanā. HIV infekcijai, bojājot kuņģa-zarnu traktu, rodas strukturāls epiteliālās barjeras bojājums un tiek sagrauta zarnu homeostāze, tāpēc HIV infekcijas izraisītām zarnu mikrobiotas izmaiņām, tās mijiedarbības mehānismam ar gļotādas imūnās sistēmas šūnām un ietekmei uz mikrobu translokāciju tiek pievērsta arvien lielāka uzmanība (Mingjun et al., 2022). Atsevišķi pētījumi parādījuši arī HCV negatīvo ietekmi uz mikrobu translokāciju un mikrobiotas sastāvu (Caradonna et al., 2002; Medrano et al., 2021). Tomēr ir ļoti maz pētījumu, kuros salīdzināti HIV / HCV koinficēti pacienti ar HIV un HCV monoinficētiem pacientiem, turklāt, lai arī atsevišķos pētījumos ir aprakstīta mikrobu translokācijas palielināšanās HIV pacientiem, tomēr nav īsti skaidrs, vai un kāda mijiedarbība piemīt mikrobu translokācijai ar izmaiņām zarnu mikrobiotas sastāvā.

Mikrobu translokācijas marķieri

Mūsu pētījumā tika iekļauti HIV inficēti, bet ART nesaņēmuši pacienti, kā arī DAA nesaņēmuši HCV pacienti. Ar endotoksīniem saistītie mikrobu translokācijas bioķīmiskie marķieri pētījumā tika izvēlēti LBP, sCD14 un EndoCAb antivielas, kas ir arī visvairāk pētītie un nozīmīgākie mikrobu translokācijas marķieri, t. sk. ar HIV un HCV inficētiem pacientiem (Lien et al., 1998; Lopez-Cortez et al., 2018; Ouyang et al., 2020). Citos pētījumos mikrobu translokācijas noteikšanai ir izmantots arī LPS jeb endotoksīnu daudzums perifērajās asinīs, tomēr daļa pētnieku atzīst, ka nevis pats endotoksēmijas līmenis, bet gan organisma atbildes reakcijas uz mikrobu translokāciju, kā sCD14, EndoCAb antivielas un LBP, precīzāk ataino mikrobu translokāciju un tās radītās sekas (Douek et al., 2006; Sandler et al., 2011), turklāt LPS korelē ar LBP līmeni asinīs, tomēr LBP ir uzticamāks marķieris tehniski vienkāršākas noteikšanas metodoloģijas dēļ, kā arī LBP ir garāks pussabrukšanas laiks (Abad- Fernandez et al., 2013; Marquez et al., 2015).

Mūsu pētījumā mikrobu translokācijas marķieri **LBP** un **sCD14** bija augstāki pacientiem ar HIV infekciju, tomēr **LBP** līmenis statistiski ticami atšķīrās tikai starp HIV un HCV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem un HCV pacientiem. Būtiska savstarpēja atšķirība starp HIV monoinficētiem un koinficētiem pacientiem netika konstatēta.

Lai arī starp grupām netika konstatētas statistiski ticamas atšķirības **sCD14** rādītājos, tomēr to mediānas bija lielākas abās HIV inficēto pacientu grupās. Tas skaidrojams ar dažādu imunoloģisko procesu ietekmi uz sCD14 lielumiem (Lien et al., 1998), kā rezultātā tā rādītāji var pilnībā neatspoguļot patieso situāciju. Kā viens no iemesliem minams HIV infekcijas ilgums. Lai arī mūsu pētījumā iekļautie HIV pacienti iepriekš nesaņēma ART, tomēr tie bija dažādās HIV infekcijas klīniskajās stadijās un to slimības ilgums nebija zināms. Iespējams, tas variēja plašās robežās – līdz pat 10 gadiem. Ar HCV inficētiem pacientiem sCD14 rādītājus var ietekmēt arī HCV genotips (Meiler et al., 2005), kas mūsu pētījumā netika apskatīts. Šie faktori var radīt relatīvi nozīmīgas variācijas slimību raksturojošos parametros, t. sk. mikrobu translokācijas rādītājos.

Tomēr kopumā mūsu rezultāti sakrīt ar vairāku citu pētnieku datiem. Vairumā pētījumu HIV pacientiem konstatēti paaugstināti mikrobu translokācijas marķieri, salīdzinot ar HIV neinficētiem cilvēkiem, norādot uz lielāku mikrobu translokāciju un sekojoši arī uz izteiktāku imūno aktivāciju (Lien et al., 1998; Balagopal et al., 2008; Villanueva-Millan et al., 2017; Lopez-Cortez et al., 2018; Ouyang et al., 2020). Līdzīgus rezultātus ar mūsu pētījumu aprakstīja *Balagopal* ar kolēģiem savā pētījumā, kurā tika iekļauti gan HIV monoinficēti, gan HIV / HCV koinficēti pacienti, turklāt HIV inficēto grupā daļai pacientu bija pieejami asins paraugi pirms inficēšanās ar HIV, ko izmantoja kā kontroles grupu. HIV inficētiem pacientiem novēroja augstākus LBP un LPS rādītājus, bet zemākus EndoCAb IgM antivielu titrus, salīdzinot ar neinficētiem cilvēkiem. Interesanti, ka līdzīgi mūsu pētījumam HIV grupā novēroja augstāku sCD14 rādītāju, bet bez statistiski nozīmīgas atšķirības. Turklāt atšķirības sCD14, LPS un antivielu daudzumos palielinājās, salīdzinot ar neinficētiem cilvēkiem, ja $CD4^+$ T šūnu skaits bija < 350 šūnām/ μ l (Balagopal et al., 2008). *Villanueva-Millan* ar kolēģiem salīdzināja HIV inficētus pacientus, kuri izmantoja vai neizmantoja antivirālo terapiju, ar veseliem cilvēkiem un konstatēja, ka sCD14 ir lielāks ar HIV inficēto pacientu grupā, savukārt 50 % ārstēto HIV pacientu tas bija veselu cilvēku līmenī. Arī LBP līmenis bija būtiski lielāks ar HIV inficēto pacientu grupā, bet tas neatšķīrās starp pacientiem, kas saņēma vai nesaņēma ART. Interesanti, ka daļai pacientu (51,1 %), kas saņēma ART, tika konstatēta koinfekcija ar HCV. Šiem pacientiem, salīdzinot ar terapiju saņēmušajiem HIV monoinficētajiem pacientiem un ar veseliem cilvēkiem, novēroja augstākus LBP rādītājus (Villanueva-Millan et al., 2017). Mūsu pētījumā netika iekļauti pacienti, kas bija saņēmuši ART, bet citu pētnieku darbos ir konstatēts, ka mikrobu translokācijas marķieri HIV pacientiem, kas saņem ART, var saglabāties paaugstināti arī pēc veiksmīgas antivirālās terapijas (Sandler et al., 2011; Villanueva-Millan et al., 2017). Tas var liecināt par pastāvīgu imūno aktivāciju, neņemot vērā saņemto ārstēšanu.

EndoCAb antivielas veidojas kā atbildes reakcija uz palielinātu endotoksīnu daudzumu asinīs. Mūsu pētījumā netika konstatētas atšķirības EndoCAb antivielu līmeņos starp grupām, tomēr vidējiem rādītājiem gan IgM, gan IgG EndoCAb antivielām bija tendence būt zemākiem HIV monoinficēto pacientu grupā. Šos rezultātus var skaidrot ar citu pētnieku aprakstīto – augstāki endotoksīna līmeņi var rezultēties ar mazāku antivielu klātbūtni, jo antivielas, saistoties ar cirkulējošiem LPS, izvada tos no organisma (Balagopal et al., 2008; Vassallo et al., 2012). Arī *Sandler* un kolēģu pētījumā ar HIV inficēto pacientu grupā, salīdzinot ar veselīem cilvēkiem, novēroja mazāku EndoCAb antivielu līmeni, bet citi mikrobu translokācijas marķieri, kā LBP un sCD14, ar HIV inficētiem pacientiem bija augstāki (Sandler et al., 2011).

Mūsu pētījumā statistiski nozīmīgas atšķirības tika konstatētas tikai starp HIV inficētiem (gan monoinficētiem, gan koinficētiem) un HCV inficētiem pacientiem. Ar HIV inficētiem pacientiem neatkarīgi no HCV klātbūtnes kopumā novēroja izteiktāku mikrobu translokāciju, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem, ko raksturo palielināti LBP, bet mazāks EndoCAb antivielu skaits nekā HCV monoinficētiem izskaidrojams ar pastiprinātu antivielu izlietojumu endotoksīnu saistīšanai un eliminācijai ar HIV inficētiem pacientiem. Konstatētais ļauj izteikt viedokli, ka mūsu izlasē HCV infekcija neizraisa nozīmīgu mikrobu translokācijas pieaugumu, salīdzinot ar HIV inficētiem pacientiem. Pretēji izvērztajai hipotēzei HIV / HCV koinficētiem pacientiem netika konstatēta izteiktāka mikrobu translokācija, salīdzinot ar HIV monoinficētiem pacientiem. Šādi rezultāti tika konstatēti arī citu pētnieku darbos, kur mikrobu translokācijas marķieri bija augstāki HIV pacientiem, salīdzinot ar veselīem cilvēkiem, bet HIV / HCV koinficētiem neatšķīrās no HIV monoinficētiem pacientiem (Marquez et al., 2015; Villanueva-Millan et al., 2017). Ņemot vērā konstatētās mikrobu translokācijas marķieru atšķirības, var teikt, ka HIV pacientiem neatkarīgi no koinfekcijas ar HCV, novēroja izteiktāku mikrobu translokāciju, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem.

HIV infekcija ir saistīta ar hronisku iekaisuma stāvokli organismā, ko var raksturot ar tādiem parametriem kā IL-6 un T šūnu aktivācijas marķieriem (CD38 un HLA-DR ekspresiju), kā arī ar pastāvīgu imūno aktivāciju, kas ir būtiski faktori CD4⁺ T šūnu samazinājumam un imūnās sistēmas funkcionālam zudumam, kas pakāpeniski pacientu var novest līdz AIDS stadijai (Lopez-Cortez et al., 2018). Attiecībā uz **hroniska C hepatīta** ietekmi uz imūnās sistēmas aktivāciju un iekaisumu HIV / HCV koinficētiem pacientiem ir atrasti pierādījumi paaugstinātam CD4⁺ un CD8⁺ T šūnu imūnās aktivācijas līmenim (Lopez-Cortez et al., 2018). Tomēr dažos pētījumos nav atrastas atšķirības imūnās aktivācijas rādītājos starp HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem (Shmagel et al., 2014). Neskatoties uz

līdzīgiem imūnās aktivācijas rādītājiem, mikrobu translokācijas marķieri vairumā pētījumu ir konstatēti augstāki koinficēto pacientu grupā (Nystrom et al., 2015; Shmagel et al., 2016; Lopez-Cortez et al., 2018). Minēto rādītāju klīniskā nozīmība pētīta arī saistībā ar HIV un HCV infekciju iznākumu, pat ārstētu pacientu grupās. Tā *Sandler* ar kolēģiem pierādīja, ka sCD14 korelē ar tādiem ar HIV infekcijas mirstību saistītiem rādītājiem kā KMI , lipīdu profils un insulīna rezistence (Sandler et al., 2011), bet HCV eradikācija HIV / HCV koinficētiem pacientiem rezultējas ar mazāku mikrobu translokāciju un imūno aktivāciju (Lopez-Cortez et al., 2018).

Lai labāk varētu izprast dažādu faktoru savstarpējo mijiedarbību, tika aprēķinātas **parametru Spīrmena korelācijas**. Tās tika apskatītas gan kopējā izlasē, gan atsevišķi pētījuma pacientu grupās.

Kopējā mūsu pētījuma izlasē nekonstatēja korelāciju starp HIV RNS un mikrobu translokācijas un aknu fibrozes rādītājiem. Taču, sadalot pacientus pētāmajās grupās, HIV monoinficēto pacientu grupā HIV RNS pozitīvi korelēja ar sCD14 un EndoCAb IgG antivielu daudzumu. Interesanti, ka šādas korelācijas netika atrastas HIV / HCV koinficēto grupā. Savukārt CD4^+ T limfocītu skaits kopējā HIV pacientu izlasē negatīvi korelēja ar EndoCAb IgG antivielām, bet šī korelācija izzuda, sadalot pacientus pētījuma grupās. Savstarpēju pozitīvu korelāciju novēroja starp sCD14 un LBP rādītājiem kopējā izlasē, bet šī korelācija izzuda, analizējot grupu rezultātus. Iespējams, palielinot pacientu skaitu un mazinot to atšķirības HIV un HCV infekciju klīniskajā spektrā, varētu iegūt nozīmīgākas un statistiski ticamākas asociācijas starp dažādiem parametriem.

Šī atrade nav pretrunā ar citu autoru datiem un apstiprina faktu, ka, palielinoties HIV RNS daudzumam asinīs un mazinoties CD4^+ T šūnu skaitam, pieaug mikrobu translokācijas apmērs (Balagopal et al., 2008; Marchetti et al., 2011). Piemēram, *Marchetti* ar kolēģiem, analizējot 379 HIV pacientu datus, konstatēja, ka HIV RNS asinīs pozitīvi korelē ar sCD14, bet sCD14 negatīvi korelē ar CD4^+ T šūnu skaitu perifērajās asinīs, turklāt sCD14 negatīvi korelē arī ar IL-6 un TNF- α , tādējādi apstiprinot, ka, pieaugot imūnsupresijas dziļumam un palielinoties HIV RNS daudzumam asinīs, palielinās mikrobu translokācija un attiecīgi arī imūnā aktivācija. Turklāt, vērojot šos pacientus dinamikā, konstatēja, ka HIV pacientiem ar augstākiem sCD14 rādītājiem risks slimības progresijai pieauga par 35 % (Marchetti et al., 2011).

Tas ļauj izteikt pieņēmumu, ka, progresējot HIV infekcijai un palielinoties HIV RNS slodzei asinīs, pieaug mikrobu translokācijas izteiktība, kas savukārt uztur imūno aktivāciju un hronisku iekaisuma stāvokli ar HIV inficētiem pacientiem. Tādēļ agrīna HIV infekcijas

ārstēšanas uzsākšana, mazinot HIV slodzi asinīs, var būtiski mazināt mikrobu translokāciju un imūno aktivāciju, bet C hepatīta vīruss mūsu pētījuma izlasē nav saistāms ar papildu faktoru izteiktākai mikrobu translokācijai.

Aknu fibrozes rādītāji

Aknu slimības kā nozīmīgs nāves cēlonis ar HIV inficētiem pacientiem ir pārspējis HIV asociētas indikatorslimības (Bica et al., 2001), tādēļ aknu stāvokļa izvērtējums ir ļoti būtisks šajā populācijā. Tomēr pacientiem ar HIV / AIDS ne vienmēr ir iespējams veikt aknu biopsiju, kā arī ar HIV inficētiem pacientiem bez pierādītas vīrusu hepatītu klātbūtnes rutīnā biopsijas netiek veiktas, pat ja ir konstatēti paaugstināti aknu enzīmu rādītāji, jo tas neietekmē HIV terapijas izvēli. Tomēr ir zināms, ka HIV vīruss arī spēj ietekmēt aknu šūnas gan tieši, gan netieši, turklāt HIV RNS ir atrasts ar HIV inficētu pacientu aknu biopsijas materiālos (Blackard, 2011).

Papildus mikrobu translokācijas marķieriem mūsu pētījumā tika noteikti aknu fibrozes netiešie rādītāji **FIB-4 indekss** un **CK18-M30**. Mūsu pētījumā nekonstatēja atšķirības FIB-4 indeksā starp grupām, bet, izmantojot FIB-4 *cut-off* līmeņus (Sterling et al., 2006), tika novērots lielāks pacientu skaits ar potenciālu aknu fibrozi HIV / HCV koinficētiem un HCV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HIV monoinficētiem pacientiem.

2006. gadā *Sterling* un kolēģi pirmo reizi aprakstīja FIB-4 indeksu HIV / HCV koinficētiem pacientiem, tāpat FIB-4 indekss ir validēts ar HCV inficētiem pacientiem (Sterling et al., 2006). FIB-4 aprēķinā tiek izmantoti ALT, AST, trombocītu skaits un pacienta vecums. Arī mūsu pētījumā, analizējot savstarpējās marķieru **korelācijas**, konstatēja, ka kopējā izlasē FIB-4 pozitīvi korelē ar pacientu vecumu un AST rādītāju, bet negatīvi korelē ar trombocītu skaitu. Šo parametru nozīmi apstiprina fakts, ka gan HIV, gan HCV infekcijas izolēti var ietekmēt šos parametrus, kā, piemēram, samazināts trombocītu skaits pati par sevi ir raksturīga pazīme HIV infekcijai, turklāt pētījumos ir aprakstīta trombocītu skaita negatīva korelācija ar HIV RNS līmeni asinīs (Blackard et al., 2011). Arī hroniskas HCV infekcijas izvērstai stadijai ir raksturīgs trombocītu skaita samazinājums un ALT un AST pieaugums.

Citu pētnieku darbos arī ir aprakstīti pretrunīgi rezultāti par FIB-4 indeksu. Tā, piemēram, pētot aknu fibrozes izteiktību, *Rohrbach* ar kolēģiem nekonstatēja būtiskas atšķirības FIB-4 indeksa lielumā starp HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem (Rohrbach et al., 2014), kas ir līdzīgi mūsu pētījuma rezultātiem, kur statistiskas atšķirības FIB-4 indeksā nekonstatēja. Savukārt *Blackard* un kolēģi, analizējot 1227 pacientu aknu fibrozi, konstatēja augstāku FIB-4 indeksu HIV / HCV grupā, salīdzinot ar HIV vai HCV

monoinficētiem pacientiem (Blackard et al., 2011). Tomēr būtiska ir pozitīva korelācija starp FIB-4 indeksu un CK18-M30, kura apliecina iepriekš aprakstītu saistību starp apoptozes un fibrozes procesiem aknās (Parfieniuk-Kowerda et al., 2014). Turklāt šī saistība ir aprēķināta, izmantojot parciālo korelācijas koeficientu, kas norāda uz saistības esamību visās trijās pacientu grupās.

Mūsu pētījumā **CK18-M30** rādītāji atšķīrās starp grupām – viszemākie tika konstatēti HIV monoinficētiem pacientiem, visaugstākie – HCV monoinficētiem pacientiem. Līdzīga tendence grupu atšķirībās bija novērojama arī ALT un AST rādītājiem, kas ļauj domāt, ka pētījuma izlasē iekļautajiem HCV pacientiem hroniska HCV norise bija aktīvāka nekā pacientiem ar HIV. Arī procentuālais pacientu skaits, kuriem CK18-M30 bija virs 200 U/l (atbilstoši noteiktajām CK18-M30 testa ražotāja rekomendācijām), t. i., sasniedzot līmeni, kas atbilst pastiprinātai hepatocītu bojāejai, vislielākais bija HCV monoinficēto pacientu grupā, bet mazākais – HIV monoinficēto pacientu grupā. Būtiski, ka, aprēķinot parciālo Spīrmena korelācijas koeficientu, tika konstatēta pozitīva saistība starp CK18-M30, ALT, AST un FIB-4 indeksu neatkarīgi no pacientu piederības grupai, kas apliecina hepatocelulāro bojājumu visās trijās pacientu grupās.

Līdzīgus rezultātus aprakstīja *Rohrbach* ar kolēģiem pētījumā, kurā HIV / HCV koinficētiem pacientiem CK18-M30 bija augstāks nekā HIV monoinficētiem pacientiem, kā arī paaugstinātie CK18-M30 rādītāji korelēja ar AST lielumu, bet ne ALT vērtībām (Rohrbach et al., 2014). Tas var tikt skaidrots ar ALT un AST atšķirīgo lokalizāciju hepatocītos, un, tā kā apoptoze ir saistīta ar mitohondriju membrānas destrukciju, tad apoptozi vairāk raksturojošais CK18-M30 var nozīmīgāk korelēt ar AST rādītājiem.

Mūsu pētījumā iekļautajiem pacientiem ALT un AST līmeņi bija augstāki HCV monoinficētiem pacientiem, un, lai arī nerasniedza statistisku ticamību, trombocītu skaits zemāks bija HIV / HCV koinficēto pacientu grupā. Tā kā pētījumā kā izslēgšanas kritēriji bija citas aknu un metabolās slimības, var izteikt apgalvojumu, ka mūsu pētījumā iekļautajiem pacientiem aknu stāvokli nozīmīgāk noteica HCV klātbūtne un mazākā mērā HIV ietekme uz aknu šūnām, tomēr kā papildu faktoru, kas netika apskatīts pētījumā, varētu minēt, piemēram, alkohola lietošanas paradumus ārpus iepriekš apstiprinātam hroniskam alkoholismam.

Interesantu savstarpēju saistību starp CK18-M30 un mikrobu translokācijas marķieriem konstatēja mūsu pētījuma kopējā izlasē – CK18-M30 pozitīvi korelēja ar IgM EndoCAb antivielām, bet negatīvi ar LBP rādītāju. Savukārt, analizējot rezultātus atsevišķās pacientu grupās, statistiski nozīmīgas korelācijas saglabājās tikai HCV monoinficētiem pacientiem, kur konstatēja CK18-M30 pozitīvu korelāciju ar IgM EndoCAb antivielām, bet negatīvu ar sCD14.

Tā kā CK18-M30 ir šūnu bojāejas jeb apoptozes marķieris un tikai netieši var tikt izmantots kā aknu fibrozes marķieris, šie rezultāti ļauj izteikt pieņēmumu, ka, palielinoties šūnu apoptozei atsevišķās pacientu grupās, var mazināties mikrobu translokācija. To var balstīt arī uz saistību starp CK18-M30 un IgM EndoCAb, izmantojot parciālās korelācijas koeficientu. Savukārt šo korelāciju esamība tikai HCV monoinficēto grupā daļēji var izskaidrot mazāk izteikto mikrobu translokāciju, salīdzinot ar HIV inficētiem pacientiem. Tomēr šādu apgalvojumu būtu pārāgri izteikt, balstoties tikai uz šiem rezultātiem. Lai varētu labāk spriest par šo parametru savstarpējās saistības iespējamo nozīmi, būtu nepieciešams veikt papildu pētījumus.

Mikrobiotas analīze

Mikrobiotas analīzei šobrīd vairumā pētījumu izmanto 16S rRNS gēna noteikšanu, kas ļauj iegūt priekšstatu par mikrobiotas daudzveidību un sastāvu, bet atšķirībā no metagenoma noteikšanas metodēm nesniedz informāciju par mikrobioma funkcijām. Mūsu pētījumā fēču mikrobiotas noteikšanai tika izmantota 16S rRNS metodoloģija, kas ļāva noteikt mikrobiotas sastāvu līdz dzimtas vai pat līdz ģints līmenim vairumam baktēriju un ļāva salīdzināt fēču mikrobiotas sastāva atšķirības starp pētījuma grupām. Atšķirību izvērtēšanai tika izmantots kopējais gēnu daudzums, daudzveidības indeksi, kā arī atšķirības konkrētu baktēriju taksonomisko vienību daudzumā un piesātinājumā.

Mikrobiotas daudzveidība

Mūsu pētījumā tika savstarpēji salīdzināti HIV monoinficēti, HCV monoinficēti un HIV / HCV koinficēti pacienti. Šāds grupu salīdzinājums attiecībā uz mikrobiotu līdz šim nav bijis pētīts. Sākotnēji tika skatītas atšķirības starp grupām α daudzveidību raksturojošos parametros – kopējā gēnu daudzveidībā, kā arī Šenona un apgrieztā Simpsona indeksā. α daudzveidību izmanto, lai raksturotu vidējo sugu daudzveidību viena parauga ietvaros. Visi trīs α daudzveidību raksturojošie parametri uzrādīja līdzīgus rezultātus atšķirībā starp grupām. Veicot kopējo mikrobiotas analīzi, tika konstatēts, ka α daudzveidība ar HCV inficētiem pacientiem bija lielāka nekā HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, bet nenovēroja atšķirības starp HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem. Mūsu pētījuma rezultāti, kas raksturo HIV un HCV monoinfekciju atšķirības, sakrīt ar vairums pētnieku datiem, bet par koinficētiem pacientiem salīdzinošo datu, kā jau iepriekš minēts, praktiski nav, kas neļauj veikt atbilstošu salīdzinošu novērtējumu.

Ar HIV inficētiem pacientiem ir konstatēts mazāks kopējais baktēriju gēnu skaits, salīdzinot HIV inficētu pacientu fēču mikrobiotu ar veseliem cilvēkiem (Li et al., 2016; Guillen et al., 2018; Mingjun et al., 2022). Arī α daudzveidības indeksi ar HIV inficētiem pacientiem bija zemāki, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem (Li et al., 2016; Guillen et al., 2018; Ellis et al., 2021; Mingjun et al., 2022). Pētījumos, kuros tika salīdzināti HCV monoinficēti pacienti ar veseliem cilvēkiem, arī tiek aprakstīta mazāka α daudzveidība (Aly et al., 2016; Inoue et al., 2018; Heidrich et al., 2018). Tomēr atsevišķu pētnieku darbos konstatētas pretējas izmaiņas α daudzveidībā gan HIV inficētiem (Taylor et al., 2020), gan HCV inficētiem pacientiem (Sultan et al., 2021), salīdzinot ar veseliem cilvēkiem. Lai arī vairums pētījumu konstatēta mazāka α daudzveidība gan HIV, gan HCV monoinficētiem pacientiem, tomēr kopumā pētījumu secinājumi šobrīd ir konfliktējoši.

Par HIV / HCV koinficētiem pacientiem ir tikai atsevišķas publikācijas, kurās ir aprakstītas izmaiņas HIV / HCV koinficētiem pacientiem attiecībā uz mikrobiotas izmaiņām, turklāt HIV / HCV koinficētie pacienti ir salīdzināti tikai ar HCV monoinficētiem (Chuaypen et al., 2020) vai HIV monoinficētiem pacientiem (Taylor et al., 2020). Interesanti, ka *Chuaypen* un kolēģi nekonstatēja atšķirības α daudzveidībā starp HCV un HIV / HCV inficēto grupām (Chuaypen et al., 2020), bet *Taylor* ar kolēģiem konstatēja zemāku α daudzveidību koinficēto pacientu grupā, salīdzinot ar HIV monoinficētiem pacientiem un veseliem cilvēkiem, bet nekonstatēja atšķirības starp HIV monoinficētiem pacientiem un veseliem cilvēkiem (Taylor et al., 2020). Jāatzīmē, ka *Chuaypen* un kolēģu pētījums veikts Taizemē, kur mikrobiotas daudzveidību un sastāvu nozīmīgi var ietekmēt gan atšķirīgā rase, gan diētas īpatnības. Turklāt šajā pētījumā iekļautie HIV pacienti bija saņēmuši arī ART, kas var ietekmēt mikrobiotas daudzveidību, tomēr, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, α daudzveidība bija mazāka gan HCV, gan HIV / HCV grupās (Chuaypen et al., 2020). Savukārt *Taylor* un kolēģu pētījums tika veikts ASV, kur tikai puse no dalībniekiem bija eiropēidās rases, turklāt pētījumā nav datu par pacientu KMI, kā arī daļa no HIV pacientiem bija saņēmuši ART (Taylor et al., 2020). Šie faktori kopā ar diētas paradumiem ASV populācijā var būtiski ietekmēt α daudzveidību, jo arī adipoziem cilvēkiem tā var būt samazināta (Tavakoli et al., 2021).

Zināms, ka cilvēka mikrobiotu ietekmē vairāki faktori, t. sk. vecums, rase, KMI, ģeogrāfiskā lokalizācija, diēta, medikamentu lietošana, dažādas slimības, kā rezultātā veidojas katram cilvēkam unikāls mikrobioms (Lazupone et al., 2013; Hou et al., 2022). Arvien vairāk pasaulē tiek pētīta mikrobioma ietekme uz dažādiem procesiem organismā, tā nozīme veselības uzturēšanā un dažādu slimību attīstībā (Ursell et al., 2012; Hou et al., 2022). Arī α daudzveidības samazināšanās tiek saistīta ar vairāku slimību, t. sk. iekaisīgu zarnu slimību

(Tavakoli et al., 2021), metabolo slimību (Ursell et al., 2021), kā arī HIV infekcijas smagāku attīstības gaitu. Latvijā pētniecība par mikrobiotu, tās sastāvu un nozīmību tika uzsākta salīdzinoši nesen, datu par Latvijas iedzīvotāju mikrobiotu, jo īpaši atsevišķu diagnožu vai veselības stāvokļu kontekstā, ir relatīvi maz, tādēļ šobrīd nav iespējams veikt salīdzinājumu Latvijā dzīvojošiem ar HIV inficētiem pacientiem.

Tālāk pētījumā tika noteiktas atšķirības mikrobiotas **β daudzveidībā**, kas raksturo atšķirības starp vairākiem paraugiem. Mūsu pētījumā HCV monoinficēto pacientu mikrobiotas sastāvs visvairāk veidoja atšķirīgu klasteri, savukārt HIV pacientiem neatkarīgi no HCV klātbūtnes nevēroja atsevišķu specifisku klasteru veidošanos. *Chuaypen* un kolēģu pētījumā konstatēja atšķirīgu klasteru veidošanos starp inficētiem pacientiem un veseliem cilvēkiem, tādējādi apstiprinot, ka abu infekciju gadījumā notiek izmaiņas zarnu trakta mikrobiotas daudzveidībā, bet nekonstatēja atšķirības starp HCV monoinficētiem un HIV/HCV koinficētiem pacientiem (*Chuaypen et al., 2020*). Savukārt *Taylor* un kolēģi konstatēja atšķirības β daudzveidībā gan starp HIV monoinficētiem un HIV/HCV koinficētiem pacientiem, gan arī starp veseliem cilvēkiem (*Taylor et al., 2020*). Abos šajos pētījumos novēroja atšķirības starp veseliem cilvēkiem un inficētiem, kas parāda nozīmīgu HIV un HCV vīrusu ietekmi uz mikrobiotas daudzveidību.

Mūsu pētījuma atrade ļauj domāt, ka pētījuma izlasē iekļautajiem pacientiem HIV piemīt būtiskāka negatīvā ietekme uz zarnu mikrobiotas daudzveidību nekā HCV un HCV pievienošanās HIV infekcijai tālāk būtiski nepasliktina zarnu mikrobiotas kopējos daudzveidības rādītājus.

Mikrobiotas sastāva izmaiņas

Lai tālāk analizētu mikrobiotas sastāvu un tā atšķirības grupās, tika veikta analīze atbilstoši taksonomiskajām grupām – baktēriju nodalījumos, klasēs, dzimtās un ģintīs. Sugu līmenī izmantotā 16S rRNS pieeja bija neinformatīva, jo vairums baktēriju nevarēja diferencēt sugu līmenī. Arī citu pētnieku darbos tiek salīdzinātas baktēriju relatīvā daudzuma izmaiņas dažādos baktēriju taksonomisko grupu līmeņos.

Pirmais pētījums par fēču mikrobiotas sastāva izmaiņām HIV pacientiem tika publicēts 2008. gadā (*Gori et al., 2008*). Pakāpeniski attīstoties tehnoloģijām, izdodas iegūt aizvien vairāk informācijas gan par mikrobiotas sastāvu, gan arī par tā saistību ar mikrobu translokāciju un citiem parametriem. Kopēja iezīme HIV pacientiem, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, ir gramnegatīvo baktēriju relatīvā daudzuma pieaugums un atsevišķu grampozitīvo baktēriju sugu relatīvā daudzuma samazinājums (*Ellis et al., 2011; Lazupone et al., 2013; Mutlu et al., 2014;*

Dinh et al., 2015). Dažos pētījumos ir konstatēts *Campylobacter* un *Desulfovibrio* sugu pieaugums, salīdzinot ar HIV neinficētiem cilvēkiem (Lazupone et al., 2013; Mutlu et al., 2014; Lazupone et al., 2014).

Baktēriju sastāvā **nodalījumu** līmenī mūsu pētījumā tika konstatēti trīs dominējošie baktēriju nodalījumi: HIV inficētiem pacientiem – *Firmicutes*, *Bacteroidota* un *Proteobacteria*, tāpat kā citu pētnieku darbos (Dillon et al., 2014), bet HCV monoinficētiem pacientiem pārsvarā dominēja *Firmicutes*, *Bacteroidota* un *Actinobacteriota* nodalījumu baktērijas. Analizējot atšķirības starp grupām, novēroja atšķirības *Proteobacteria* nodalījumā starp HCV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, bet nebija atšķirības starp HIV un HCV monoinficētiem un HIV mono un koinficētiem pacientiem. *Desulfovibrio* nodalījuma relatīvie daudzumi bija lielāki HCV monoinficētiem, salīdzinot ar HIV un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, bet nebija atšķirības starp HIV mono un koinficētiem pacientiem. *Actinobacteriota* nodalījuma relatīvie daudzumi bija lielāki HCV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HIV monoinficētiem, bet ne ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem. Savukārt *Bacteroidota* neatšķīrās starp grupām, un arī tālāk, analizējot klases un dzimtas līmeņos, atšķirības starp grupām nekonstatēja. Interesanti, ka arī *Firmicutes* nodalījuma relatīvie daudzumi neatšķīrās starp grupām, lai gan to vidējie daudzumi bija mazāki HIV inficētiem pacientiem (gan mono, gan koinficētiem), salīdzinot ar HCV monoinficētiem. Šo atradi apstiprina arī fakts, ka, tālāk analizējot *Firmicutes* nodalījumā esošās baktēriju klases un dzimtas, tika konstatēts būtisks atsevišķu dzimšu samazinājums HIV inficēto grupās, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem.

Mūsu pētījumā *Firmicutes* nodalījumā dominējošā bija ***Clostridia* klase**, kur novēroja būtiskas atšķirības – lielāku šīs klases baktēriju relatīvo daudzumu HCV monoinficētiem, salīdzinot ar HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, bet nebija atšķirības starp abām HIV inficēto pacientu grupām. Tālāk analizējot **dzimtas** līmenī, līdzīga atrade tika konstatēta *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Peptospteptococcaceae* un *Ruminococcaceae* dzimtās. Šīs pašas tendences saglabājās arī baktēriju ģints līmenī, kur HCV monoinficētiem pacientiem konstatēja lielākus *Anaerostipes*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Romboutsia*, *Subdoligranulum* ģinšu baktēriju relatīvos daudzumus.

Dillon un kolēģu veiktajā pētījumā salīdzināja HIV inficētu ART nesaņēmušu pacientu fēču mikrobiotu, izmantojot V4 reģionu 16S rRNS gēnu noteikšanā, ar veseliem cilvēkiem, tāpat kā tika darīts mūsu pētījumā, un konstatēja, ka ar HIV inficētiem pacientiem ir lielāks *Proteobacteria*, bet mazāks *Firmicutes* daudzums, bet *Bacteroidota* relatīvie daudzumi neatšķīrās starp grupām, turklāt līdzīgi mūsu pētījumam *Firmicutes* nodalījumā bija samazināti

Lachnospiraceae un *Ruminococcaceae* dzimšu baktēriju relatīvie daudzumi (Dillon et al., 2014). Līdzīgus datus aprakstīja arī Vujkovic-Cvijin ar kolēģiem, kuru pētījumā ar HIV inficētiem pacientiem konstatēja *Lachnospiraceae* un *Ruminococcaceae* samazinājumu, bet lielāku *Gammaproteobacteria*, t. sk. *Enterobacteriaceae*, daudzumu (Vujkovic-Cvijin et al., 2013). *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Eubacteria* dzimšu baktērijām, kuru daudzumi ar HIV inficētiem pacientiem samazinās, ir aprakstīta loma kopējā zarnu veselības uzturēšanā, kā arī tās piedalās butirātu un citu īso ķēžu taukskābju producēšanā, kā rezultātā pozitīvi ietekmē iekaisuma procesus zarnās un mazina zarnu sienīgas caurlaidību (McHardy et al., 2013; Mutlu et al., 2014).

Mazāk pārstāvētā klase *Firmicutes* nodalījumā mūsu pētījumā bija **Bacilli**, kur novēroja lielākus daudzumus HCV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HIV inficētiem. Tālāk analizējot **dzimtas** līmenī, konstatēja lielākus *Lactobacillaceae* un *Enterococcaceae* dzimšu relatīvos daudzumus HIV / HCV koinficētiem un HIV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem. Līdzīgas atšķirības starp grupām saglabājās arī ģints līmenī – tika konstatēts lielāks baktēriju relatīvais daudzums HIV / HCV un HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem, un tas ietvēra šādas ģintis: *Enterococcus*, *Erysipelatoclostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* un *Clostridium innocuum*. Vairākos pētījumos aprakstīts arī *Lactobacillaceae* un *Enterococcaceae* dzimšu baktēriju skaita pieaugums ar HIV inficētiem pacientiem (Lazupone et al., 2014; Dinh et al., 2015).

Proteobacteria nodalījuma relatīvais daudzums mūsu pētījumā bija lielāks HIV / HCV inficētiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem, bet neatšķirās starp HIV mono un koinficētiem pacientiem. Tālāk analizējot **klases** (*Gammaproteobacteria*) un **dzimtas** (*Enterobacteriaceae*) līmenī, saglabājās tādas pašas atšķirības. Ar HIV inficētiem pacientiem arī citu pētnieku darbos novēro gramnegatīvo baktēriju skaita pieaugumu, kam var būt nozīme mikrobu translokācijas palielinājumā un imūnās sistēmas aktivācijā. Tāpat kā mūsu pētījumā, ar HIV inficētiem pacientiem ir konstatēts *Enterobacteriaceae* pieaugums, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem (Gori et al., 2008; Ellis et al., 2011; Dillon et al., 2014; Dihn et al., 2015; Chuaypen et al., 2020). Interesanti, ka *Chuaypen* ar kolēģiem, kuri salīdzināja HIV / HCV koinficētus, HCV monoinficētus un veselus cilvēkus, *Proteobacteria* nodalījums bija lielāks HIV / HCV grupā, salīdzinot ar HCV monoinficētiem vai veseliem cilvēkiem, bet *Enterobacteriaceae* dzimtas pieaugumu novēroja tikai, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, bet ne starp inficēto grupām (Chuaypen et al., 2020).

Bacteriodota nodalījuma baktēriju relatīvie daudzumi mūsu pētījumā neatšķīrās starp grupām, lai gan vairāku pētnieku darbos ir aprakstīta šī nodalījuma atsevišķu dzimšu, piemēram, *Prevotellaceae* un *Bacteroidaceae*, iespējamā nozīme HIV infekcijas progresēšanas prognozēšanā (Dillon et al., 2014; Noguera-Julian et al., 2016). HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, ir konstatēts *Prevotella* ģints pieaugums un *Bacteroides* samazinājums, kā arī īpaši tiek vērtētas *Bacteroides: Prevotella* attiecības izmaiņas, kur HIV pacientiem novēro šīs attiecības samazināšanos (Lazupone et al., 2013; Dillon et al., 2014), lai gan tiek aprakstīta arī šīs attiecības samazināšanās homoseksuāliem vīriešiem neatkarīgi no HIV statusa (Noguera-Julian et al., 2016; Kelley et al., 2017). Mūsu pētījumā inficēti pacienti tika salīdzināti savstarpēji, nevis ar veseliem cilvēkiem, kas var vismaz daļēji izskaidrot atšķirību trūkumu starp grupām, jo arī HCV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar veseliem, var novērot līdzīgas tendences – *Bacteroides: Prevotella* attiecības samazināšanos (Sultan et al., 2021).

Actinobacteriota nodalījuma relatīvais daudzums, kā jau iepriekš minēts, mūsu pētījumā bija lielāks HCV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HIV monoinficētiem, bet ne ar HIV / HCV koinficētiem pacientiem. Tālāk, analizējot **klases** (*Actinobacteria* un *Coriobacteria*) un arī **dzimtas** līmenī, konstatēja nozīmīgas atšķirības starp grupām – *Bifidobacteriaceae* un *Coriobacteriaceae* dzimšu baktēriju relatīvie daudzumi bija lielāki HCV monoinficēto grupā, salīdzinot ar HIV mono un koinficētiem pacientiem, bet tie neatšķīrās starp HIV inficēto pacientu grupām. Mazāku *Bifidobacteriaceae* daudzumu HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, iepriekš ir aprakstījuši arī citi autori (Gori et al., 2008). Šie konstatējumi norāda uz potenciāli labvēlīgo baktēriju skaita, t. sk. *Clostridia* un *Actinobacteria* klašu, samazinājumu ar HIV inficētiem pacientiem. *Clostridia* un *Actinobacteria* klašu baktērijām ir novērota pretiekaisuma darbība, to skaita samazinājums palīdz uzturēt hronisku iekaisumu HIV pacientiem, ko iepriekš ir aprakstījis Rocafort ar kolēģiem, kura pētījumā Eiropas populācijā tiek raksturots arī šo baktēriju relatīvā daudzuma samazinājums, kam var būt nozīme HIV pacientu hroniska iekaisuma procesa uzturēšanā (Rocafort et al., 2019).

Arī ***Desulfobacteriota* nodalījumā** un ***Desulfovibrionia* klasē** tika konstatētas atšķirības – lielāks šo baktēriju daudzums HCV monoinficētiem, salīdzinot ar HIV mono un koinficētiem pacientiem, bet nebija atšķirības ar HIV inficēto pacientu grupās, lai arī šīs baktērijas veido nelielu daļu no kopējās pacientu mikrobiotas. Literatūrā ir ļoti maz informācijas par šī nodalījuma baktēriju lomu ar HIV un HCV inficētu pacientu mikrobiotā. Piemēram, Lazupone ar kolēģiem konstatēja lielāku šo baktēriju daudzumu ar HIV inficētiem

pacienti, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem (Lazupone et al., 2014), bet *Chuaypen* ar kolēģiem aprakstīja šo baktēriju klātbūtni gan HCV mono, gan HIV / HCV koinficētiem pacientiem (Chuaypen et al., 2020). Interesanti, ka *Villanueva-Millan* ar kolēģiem konstatēja gan *Desulfobacteriaceae* dzimtas pieaugumu, gan arī vienas *Desulfovibrio* sugas samazinājumu ar HIV inficētiem, ART saņēmušiem pacientiem (Villanueva-Millan et al., 2017). *Desulfovibrio* baktērijas ir zināmas kā sērūdeņradi ražojošas baktērijas. Sērūdeņradis ir toksisks epitēlijšūnām un, domājams, veicina mikrobioma spēju izraisīt zarnu epitēlija bojājumus un samazināt zarnu gļotādas integritāti. Tādējādi HIV infekcijas kontekstā šī zarnu mikrobu radītā sērūdeņraža palielināšanās var veicināt epitēlija un gļotādas integritātes zudumu, mikrobu translokāciju un imūnās sistēmas aktivāciju (Vujkovic-Cvijin et al., 2013; Villanueva-Millan et al., 2017). Tomēr sērūdeņradis nelielās koncentrācijās zarnu traktā var radīt arī pozitīvus efektus – tam piemīt citoprotektīvs efekts un tas ļauj saglabāt gļotādas integritāti, kā arī inhibē mikrobiotas biofilmu patoloģisku fragmentēšanos (Buret et al., 2022).

HCV pacientiem iepriekš arī aprakstītas izmaiņas zarnu mikrobiotā, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, un tās iekļāva palielinātu *Bacteroidota* un *Firmicutes* nodalījumu baktēriju relatīvo daudzumu, ģints līmenī palielinātus *Prevotellaceae*, *Faecalibacterium* un *Veilonella* relatīvos daudzumus un samazinātus *Ruminococcus*, *Clostridium* un *Bifidobacterium* daudzumus (Aly et al., 2016; Sultan et al., 2021). Pārsvārā visos iepriekš publicētajos pētījumos ir salīdzināti HCV pacienti ar veseliem cilvēkiem, tādēļ atbilstošu salīdzinājumu ar šiem pētījumiem veikt nav iespējams.

Mūsu pētījumā dzimtas līmenī novēroja trīs dzimšu **lielāku** relatīvo daudzumu ar HIV inficētiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem, un tās bija *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* un *Lactobacillaceae*. Lai arī *Prevotellaceae* un *Erysipelotrichaceae* dzimtas vidējie relatīvie daudzumi bija lielāki ar HIV inficēto grupās, tomēr statistisku ticamību tie nesasniedza. Savukārt **mazākus** relatīvos daudzumus ar HIV inficētiem pacientiem konstatēja *Clostridia* klasē ietilpstošajās baktēriju dzimtās *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Peptostreptococcaceae* un *Ruminococcaceae*. Kopumā mūsu pētījuma rezultāti ļauj izteikt pieņēmumu, ka vairums atražu ar HIV inficēto pacientu grupā būtiski neatšķiras no citu pētnieku datiem, tomēr jāņem vērā, ka pārsvārā pētnieku darbos HIV vai HCV inficēto pacientu mikrobiota ir salīdzināta ar veseliem cilvēkiem. Interesanti, ka, salīdzinot citu autoru darbus, iezīmējas atsevišķi baktēriju nodalījumi un dzimtas, kuru relatīvo daudzumu izmaiņu virziens ir līdzīgs, bet atsevišķu dzimšu pārmaiņas ir mainīgas starp pētījumiem. Lai arī pārsvārā mikrobiotas pētījumos tiek izmantota vienāda metodoloģija, nosakot mikrobiotu ar 16S rRNS

metodi, atsevišķās nesakritības var tikt skaidrotas ar dažādiem faktoriem, kā, piemēram, pacientu rasi, ģeogrāfisko lokalizāciju, diētu, vecumu un blakusslimību klātbūtni.

Mūsu pētījumā vairums atšķirību starp baktēriju kārtām, dzimtām un ģintīm tika konstatētas starp HIV inficētiem pacientiem un HCV monoinficētiem, bet ne starp HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem. To vēl vairāk apstiprina β daudzveidības rādītāji, kur tika konstatēta atsevišķa klastera veidošanās tikai HCV monoinficētiem pacientiem, bet abu HIV inficēto pacientu grupu mikrobiotas būtiski neatšķīrās un pārklājās. Tas ļauj izteikt apgalvojumu, ka šī pētījuma izlasē varēja novērot mikrobiotas sastāva atšķirības starp HCV inficētiem un HIV inficētiem pacientiem, bet HIV pacientu mikrobiota būtiski neizmainījās koinfekcijas ar HCV gadījumā. Tātad būtiskākās izmaiņas mikrobiotā šajā izlasē noteica HIV infekcija. Lai precīzāk saprastu HCV lomu un tā radītās iespējamās izmaiņas mikrobiotā, būtu nepieciešams veikt salīdzinājumu ar pilnīgi veseliem cilvēkiem, kas ļautu izdarīt secinājumus, vai veselu cilvēku mikrobiota būtiski atšķiras no iespējamām HCV infekcijas radītām pārmaiņām.

Mikrobiotas un mikrobu translokācijas marķieru saistības

Lai varētu spriest par iespējamo zarnu mikrobiotas saistību ar mikrobu translokāciju, tika aprēķinātas šo rādītāju korelācijas. Šenona indekss, kas ir viens no α daudzveidību raksturojošiem lielumiem, negatīvi korelēja ar LBP un sCD14 kopējā pētījuma izlasē, šīs korelācijas izzuda atsevišķās pētījuma grupās, bet HIV monoinficēto grupā novēroja α daudzveidības negatīvu korelāciju ar EndoCAb IgM antivielām. Savukārt α daudzveidība bija nozīmīgi mazāka HIV inficēto grupās, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem. Šie konstatējumi kopā norāda uz zarnu mikrobiotas daudzveidības saistību ar mikrobu translokāciju – samazinoties mikrobiotas daudzveidībai, pieaug mikrobu translokācija no zarnu trakta uz perifēro asinsriti, mūsu izlasē jo īpaši ar HIV inficētiem pacientiem.

Mikrobiotas korelāciju analīzei tika izvēlēts taksonomiskās klasifikācijas klases līmenis. Mūsu pētījumā atklājās atsevišķas interesantas **korelācijas**, turklāt visvairāk HIV monoinficēto pacientu grupā. **Bacilli** klases baktēriju relatīvais daudzums pozitīvi korelēja ar LBP un HIV RNS lielāku daudzumu asinīs, kā arī attiecīgi ar mazāku CD8⁺ T šūnu skaitu. Tā kā ar HIV inficēto grupā konstatēja lielākus atsevišķu šīs klases baktēriju dzimšu relatīvos daudzumus, var izteikt apgalvojumu, ka HIV infekcijas gadījumā pieaug **Bacilli** klases baktēriju daudzums zarnu traktā, kā arī, palielinoties HIV RNS daudzumam asinīs, palielinās **Bacilli** klases baktēriju relatīvais daudzums zarnās un attiecīgi pieaug arī mikrobu translokācija. Savukārt **Coriobacteriia** samazinājums bija saistīts ar visu noteikto mikrobu translokācijas

marķieru pieaugumu, ieskaitot LBP, sCD14, EndoCAb IgM un IgG antivielas. Arī *Desulfovibriobacteria* klase HIV pacientiem nozīmīgāk ietekmēja mikrobu translokācijas marķierus – tika iegūta negatīva korelācija ar sCD14, EndoCAb IgM un IgG klases antivielām, turklāt šajā grupā novēroja arī negatīvu korelāciju ar HIV RNS slodzi, bet pozitīvu ar KMI.

Šis atklājums apstiprina atsevišķu baktēriju sugu nozīmīgāku iesaisti mikrobu translokācijā un imūnās aktivācijas uzturēšanā HIV pacientiem, jo īpaši tas varētu attiekties uz vairāk pārstāvētajām baktēriju klasēm mikrobiotā, piemēram, *Coriobacteriia* un *Bacilli*. *Desulfovibrionia* klases baktērijas dēvē arī par sulfātus mazinošām baktērijām, lai arī iepriekš tās tika uzskatītas par komensālām, pēdējā laikā parādās pētījumi, kuros apstiprinās šīs klases baktēriju saikne ar iekaisīgām zarnu slimībām (Rowan et al., 2010). *Lazupone* ar kolēģiem ar HIV inficētiem pacientiem atklāja lielāku daudzumu *Desulfovibrio* baktēriju, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem (Lazupone et al., 2013; Lazupone et al., 2014). Mūsu pētījumā, lai arī šī nodalījuma baktēriju relatīvie daudzumi bija mazi un tie bija pat nedaudz mazāki HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem, tomēr šīs klases relatīvie daudzumi negatīvi korelēja gan ar HIV RNS daudzumu asinīs, gan ar mikrobu translokācijas marķieriem un tikai HIV monoinficētiem pacientiem. Šāda saikne netika novērota HCV monoinficētiem pacientiem. Līdz ar to var secināt, ka *Desulfovibriota* nodalījuma baktērijām piemīt nozīmīga loma mikrobu translokācijā, īpaši HIV infekcijas gadījumā, ko nenovēro HCV monoinficētiem pacientiem. Neskatoties uz šo baktēriju nelielo daudzumu zarnu traktā, ar HIV inficētiem pacientiem palielinās arī mikrobu translokācija. Tātad, iespējams, pastāv apstākļi, kuros *Desulfovibrionia* klases baktērijas potencē mikrobu translokāciju. Kā viens no tiem minams HIV RNS daudzums asinīs, kas, kombinējoties ar lielāku ķermeņa masas indeksu un vecumu, var negatīvi ietekmēt mikrobu nokļūšanu no zarnām asinsritē. Protams, ņemot vērā *Desulfovibrionia* klases nelielo relatīvo daudzumu zarnu mikrobiotā, par tās patieso ietekmi var diskutēt, un, lai izdarītu galējus secinājumus, būtu nepieciešams veikt lielāka mēroga pētījumus.

Interesanti, ka HIV / HCV koinficēto pacientu grupā vienīgā baktēriju klase, kas parādīja ticamu saistību ar mikrobu translokācijas marķieriem (sCD14, EndoCAb IgG), bija *Gammaproteobacteriia* klase, kuras nozīmīgākie pārstāvji dzimtas līmenī ir *Enterobacteriaceae* baktērijas. Turklāt koinficēto grupā, salīdzinot ar HIV un HCV monoinficētiem pacientiem, novēroja lielākus šo baktēriju relatīvos daudzumus. Bez tam šī baktēriju klase negatīvi korelēja ar CD4⁺ šūnu skaitu, ko nenovēroja HIV monoinficēto pacientu grupā. Šis konstatējums ļauj secināt, ka HIV / HCV koinficētiem pacientiem, īpaši,

progresējot HIV infekcijai un mazinoties CD4⁺ T limfocītu skaitam, būtiski palielinoties *Gammaproteobacteria* daudzumam zarnu traktā, nozīmīgi pieaug arī mikrobu translokācija.

Arī citu pētnieku darbos, salīdzinot HIV inficētus pacientus ar veseliem cilvēkiem, ir atklātas korelācijas atsevišķu baktēriju dzimšu un sugu līmenī. Piemēram, *Mingjun* ar kolēģiem aprakstīja lielākus *Bacilli* un *Gammaproteobacteria* relatīvos daudzumus pacientiem ar zemāku CD4⁺ T šūnu skaitu, savukārt *Clostridia* klases baktēriju daudzumi bija lielāki pacientiem ar augstāku CD4⁺ T šūnu skaitu (Mingjun et al., 2022). Mūsu pētījumā netika noteikts CD4⁺ T šūnu skaits HCV monoinficētiem pacientiem, bet, pieņemot, ka pacientiem bez nopietnas imūnsupresijas tie varētu būt augstāki vai normāli, salīdzinot ar HIV inficētiem cilvēkiem, var teikt, ka šie konstatējumi ir līdzīgi. Tāpat kā mūsu pētījumā, *Dihn* ar kolēģiem konstatēja mikrobu translokācijas marķieru (sCD14) un atsevišķu iekaisuma citokīnu (IL-1β, IFN-γ) pozitīvu korelāciju ar *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijām, kas apstiprina atsevišķu baktēriju lielāku nozīmi mikrobu translokācijas un imūnās aktivācijas uzturēšanā (Dihn et al., 2015). Tomēr pagaidām publikāciju daudzums, kuros tiek apskatīta mikrobiotas tieša saistība ar mikrobu translokācijas marķieriem, ir neliels, turklāt arī citu pētnieku darbi ir balstīti visai nelielās dalībnieku izlasēs, kā arī tie ir veikti pacientiem dažādās ģeogrāfiskās lokalizācijās.

Mūsu atklājumi kopumā apstiprina zarnu mikrobiotas atšķirības starp HIV inficētiem un HCV inficētiem cilvēkiem. Izmaiņas kopējā mikrobiotas sastāva daudzveidībā un arī atsevišķu baktēriju dzimšu relatīvajos daudzumos nozīmīgi ietekmē mikrobu translokāciju, kas var ietekmēt imūno aktivāciju un uzturēt hronisku iekaisuma procesu ar HIV inficētiem pacientiem. Savukārt mikrobu translokācija ir izteiktāka ar HIV inficētiem pacientiem, un HCV klātbūtne HIV infekcijas gadījumā to būtiski nepalielina.

Zarnu mikrobiotas izmaiņas hroniskas HIV infekcijas gadījumā liecina, ka zarnu iekaisuma mazināšana un zarnu barjeras funkcijas uzlabošana var būt efektīvs līdzeklis HIV inficēto pacientu prognozes uzlabošanai. Cilvēki, kas ir HIV un / vai HCV inficēti, ir pakļauti arī dažādu medikamentu ilgstošai lietošanai savu slimību ārstēšanā. Izpratne par saikni starp zarnu mikrobiotu un hronisku imūno aktivāciju pacientiem ar šīm slimībām var pavērt ceļu uz mikrobiomā balstītām intervencēm (piemēram, probiotiķu vai prebiotiķu lietošanu, fēču transplantāciju vai uztura intervencēm). Līdzīgas intervences ir ierosinātas arī iekaisīgu zarnu slimību gadījumā, jāatzīst gan, ka pētījumu rezultāti ir neviennozīmīgi. Tomēr arī šī pētījuma novērojumi var būt noderīgi, lai labāk izprastu un izstrādātu jaunus uz mikrobiomu balstītus HIV infekcijas terapijas papildu līdzekļus.

Pētījuma limitējošie faktori

Šim pētījumam bija arī vairāki limitējošie faktori, kas varēja iespaidot pētījuma rezultātus. Kā viens no faktoriem minama paraugu savākšanas metodoloģija. HCV monoinficēto pacientu fēču paraugi tika iegūti pašsavākšanas ceļā un nogādāti laboratorijā, tādēļ pilnībā nevar izslēgt, ka fēču paraugi neapstrādātā veidā tika uzglabāti ilgāk par vienu stundu, kas var ietekmēt atsevišķu sugu pāraugšanu, arī kopējo bakteriālo DNS daudzumu (Tang et al., 2020). Tāpat mikrobiotu var ietekmēt dažādi citi faktori, piemēram, atsevišķas diētas īpatnības (Hou et al., 2022) vai alkohola lietošana (Bajaj et al., 2016), kas pētījumā netika analizēti.

Nelielais kopējais pētījumā iekļauto pacientu skaits ne vienmēr ļāva pilnībā izvērtēt atšķirības starp grupām, iegūstot statistisku ticamību. Palielinot pacientu skaitu grupās, varētu iegūt statistiski nozīmīgākus rezultātus, jo īpaši mikrobiotas pētījuma daļā, kur ir lielas individuālās atšķirības un liels nosakāmo mikroorganismu daudzums.

HCV pacientiem gan Latvijā, gan pasaulē ilgstoši nebija pieejama adekvāta efektīva un labi izturama terapija. Tiešie antivirālie preparāti tika ieviesti klīniskajā praksē no 2015. gada, līdz ar to pētījumā iekļautie pacienti, iespējams, bija ar jau relatīvi izvērstāku slimības stadiju un lielāku aknu bojājumu. HCV grupas pacientiem kopumā bija lielāks KMI, salīdzinot ar HIV pozitīvajiem pacientiem. Palielināts KMI var papildus veicināt nealkohola steatohepatīta attīstību, kas attiecīgi var ietekmēt dažādus bioķīmiskos parametrus, kā arī fēču mikrobiotas stāvokli (Mauzaki et al., 2013; Ramana et al., 2013; Hansen et al., 2015).

Secinājumi

1. Mikrobu translokācija ir lielāka HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem. Savukārt atšķirības parametros netika konstatētas starp HIV mono un HIV / HCV koinficēto pacientu grupām, kas liecina par HIV infekcijas nozīmīgāku ietekmi uz mikrobu translokāciju, salīdzinot ar HCV infekciju.
2. Aknu fibrozes netiešie rādītāji (CK18-M30) HIV monoinficētiem ir mazāki, salīdzinot ar HCV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, norādot uz HCV infekcijas nozīmīgāku lomu aknu fibrozes attīstībā.
3. Fēču mikrobiotas daudzveidība un kopējais noteikto baktēriju ģēnu daudzums HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem ir mazāks nekā HCV inficētiem pacientiem, bet tie neatšķiras starp HIV pacientu grupām. Tas norāda uz HIV infekcijas būtiskāku negatīvo ietekmi uz zarnu mikrobiotu, un HCV infekcijas pievienošanās ar HIV inficētiem pacientiem nepasliktina kopējo zarnu mikrobiotas daudzveidību.
4. HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem zarnu mikrobiotas sastāvs atšķirās no HCV monoinficētiem pacientiem, ko raksturo atsevišķu baktēriju taksonomisko vienību relatīvā daudzuma izmaiņas. HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem, novēroja lielākus potenciāli nelabvēlīgo dzimšu *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* un *Lactobacillaceae* relatīvos daudzumus, bet mazākus potenciāli labvēlīgo *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae*, *Peptostreptococcaceae* un *Ruminococcaceae* dzimšu relatīvos daudzumus.
5. Atsevišķu baktēriju klašu relatīvā daudzuma izmaiņas ir saistāmas ar lielāku mikrobu translokāciju HIV monoinficētiem pacientiem. Savukārt atsevišķu baktēriju klašu relatīvo daudzumu saistība ar HIV infekciju raksturojošiem parametriem liecina, ka, progresējot HIV infekcijai, palielinās potenciāli nelabvēlīgo baktēriju daudzums zarnās.

Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu

Zinātniskie raksti:

1. **Madelāne, M.**, Krūmiņa, A., Sīmanis, R., Šķenders, Ģ., Ivanovs, A., Stūre, G., Vīksna, L. 2019. Difference in markers of microbial translocation and cell apoptosis in HIV monoinfected and HIV / HCV coinfecting patients. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.* 73 (4), 304–311.
2. Vīksna, L., Ekšteina I., **Madelāne, M.**, Zeltiņa, I., Krūmiņa, A., Koļesovs, A., Sīmanis, R. 2019. Markers of liver fibrosis and apoptosis in patients with HIV mono-infection and HIV / HCV co-infection. *HIV & AIDS Review.* 18 (1), 33–39.
3. Koļesova, O., Eglīte, J., Koļesovs, A., Krūmiņa, A., Ekšteina, I., **Madelāne, M.**, Vīksna, L. 2019. Association of non-invasive markers of liver fibrosis with HCV coinfection and antiretroviral therapy in patients with HIV. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.* 73 (4), 400–402.
4. Koļesova, O., **Madelāne, M.**, Ekšteina, I., Koļesovs, A., Krūmiņa, A., Vīksna, L. 2020. The level of cytokeratin 18 in patients with HIV and viral hepatitis C co-infection in Latvia. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.* 74 (2), 94–99.

Tēzes un prezentācijas starptautiskajās konferencēs:

1. **Madelāne, M.**, Koļesova, O., Koļesovs, A., Rudzīte, D., Šķenders, Ģ., Vangravs, R., Vīksna, L. 2023. Differences in faecal microbiota diversity and liver related markers in patients with HCV, HIV and HIV / HCV infections. In: *Rīgas Stradiņa universitātes 2023. gada zinātniskā konference*, Rīga, Latvija, 2023. (Mutisks referāts).
2. **Madelāne, M.**, Šķenders, Ģ., Rudzīte, D., Ivanovs, A., Vīksna, L. 2019. Microbial translocation markers in HIV and HCV patients. In: *Rīgas Stradiņa universitātes 2019. gada zinātniskā konference*, Rīga, Latvija, 2019, tēžu grāmata: 221. (Mutisks referāts).
3. **Madelāne, M.**, Stūre, G., Ekšteina, I., Ivanovs, A., Vīksna, L. 2018. Plasma levels of bacteria; LPS and endotoxin antibodies in HIV monoinfected and coinfecting with HCV patients. In: *ISHEID congress 2018*, Marseļa, Francija, tēžu grāma: P 19. (Stenda referāts).
4. **Madelāne, M.**, Stūre, G., Ekšteina, I., Ivanovs, A., Vīksna, L. 2018. Plasma levels of bacteria; LPS and endotoxin antibodies in HIV monoinfected and coinfecting with HCV patients. *Journal of Virus Eradication. Abstracts of the 2018 International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases (ISHEID).* 4 (1), 25, P19.
5. Ekšteina, I., **Madelāne, M.**, Koļesovs, A., Vīksna, L. 2018. The levels of hyaluronic acid in different HIV infected patient groups. In: *ISHEID congress 2018*, Marseļa, Francija, tēžu grāmata: P18. (Stenda referāts).
6. Ekšteina, I., **Madelāne, M.**, Koļesovs, A., Vīksna, L. 2018. The levels of hyaluronic acid in different HIV infected patient groups. *Journal of Virus Eradication. Abstracts of the 2018 International Symposium on HIV and Emerging Infectious Diseases (ISHEID).* 4 (1), 25, P18.
7. **Madelāne, M.**, Stūre, G., Ivanovs, A., Vīksna, L. 2018. Serum markers of apoptosis and liver fibrosis in HIV and HCV coinfecting patients. 2018. In: *ECCMID congress 2018*, Madride, Spānija, Elektroniskais stenda referāts E0203.
8. **Madelāne, M.**, Šķenders, Ģ., Rudzīte, D., Ivanovs, A., Vīksna, L. 2018. Bacterial translocation markers in HCV and HIV patients. In: *NSCMID congress 2018*, Reikjavīka, Īslande, tēžu grāmata: 86, P-42. (Stenda referāts).

Tēzes un prezentācijas vietēja mēroga konferencē Latvijā:

1. **Madelāne, M.**, Vīksna, L., Stūre, G., Ivanovs, A. 2017. Cirkulējošās matricas metaloproteināzes-1, to audu inhibitoru un hialuronskābes līmeņu izmaiņas pacientiem ar HIV monoinfēciju un koinfēciju ar VHC. In: *Rīgas Stradiņa universitātes 2017. gada zinātniskā konference*, Rīga, Latvija, 2017, tēžu grāmata: 22. (Mutisks referāts).

Izmantotās literatūras saraksts

1. Aagaard, K., Luna, R. A., Versalovic, J. 2020. The human microbiome of local body sites and their unique biology in *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2, 12–21.e3.
2. Abad-Fernandez, M., Vallejo, A., Hernandez-Novoa, B., Diaz, L. et al. 2013. Correlation between different methods to measure microbial translocation and its association with immune activation in long-term suppressed HIV-1 infected individuals. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 64, 149–153.
3. Abutaleb, A., Sherman, K. E. 2018. A changing paradigm: management and treatment of the HCV/HIV co-infected patient. *Hepatology International*. 12, 500–509.
4. Aida, Y., Abe, H., Tomita, Y., Nagano, T. et al. 2014. Serum cytokeratin 18 fragment level as a noninvasive biomarker for non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 7 (11), 4191–4198.
5. Albillos, A., de Gottardi, A., Rescigno, M. 2020. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *Journal of Hepatology*. 72 (3), 558–577. doi: 10.1016/j.jhep.2019.10.003.
6. Aly, A. M., Adel, A., El-Gendy, A. O., Essam, T. M. et al. 2016. Gut microbiome alterations in patients with stage 4 hepatitis C. *Gut Pathogens*. 8 (42). Iegūts no: doi.org/10.1186/s13099-016-0124-2 [skatīts 20.07.2022.].
7. Anand, G., Zarrinpar, A., Loomba, R. 2016. Targeting Dysbiosis for the Treatment of Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*. 36 (1); 37–47. doi: 10.1055/s-0035-1571276.
8. Anderson, K. V. 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current Opinion in Immunology*. 12, 13–19.
9. Apprill, A., McNelly, S., Parsons, R., Weber L. 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic microbial ecology*. 75, 129–137.
10. Arends, J. E., Lieveld, F. I., Boeijen, L. L., de Kanter, C. T. M. M. et al. 2015. Natural history and treatment of HCV/HIV coinfection: Is it time to change paradigms? *Journal of Hepatology*. 63, 1254–1262.
11. Bajaj, J. S., Sterling, R. K., Betrapally, N. S., Nixon, D. E. et al. 2016. HCV eradication does not impact gut dysbiosis or systemic inflammation in cirrhotic patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 44 (6), 638–643.
12. Balagopal, A., Philp, F. H., Astemborski, J., Block, T. M. et al. Human immunodeficiency virus related microbial translocation and progression of hepatitis C. 2008. *Gastroenterology*. 135 (1), 226–233.
13. Bani-Sadr, F., Lapidus, N., Bedoss, P., de Boever, C. M. et al. 2008. Progression of Fibrosis in HIV and Hepatitis C Virus-Coinfected Patients Treated with Interferon plus Ribavirin-Based Therapy: Analysis of Risk Factors. *Clinical Infectious Diseases*. 46 (5), 768–774.
14. Bantel, H., Lügering, A., Heidemann, J., Volkmann, X. et al. 2004. Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology*. 40 (5), 1078–1087.
15. Baroncelli, S., Galluzzo, C. M., Pirillo, M. F., Mancini, M. G. 2009. Microbial translocation is associated with residual viral replication in HAART-treated HIV+ subjects with <50copies/ml HIV-1 RNA. *Journal of Clinical Virology*. 46, 367–370.
16. Bassler, B. L. 2012. Microbes as menaces, mates and marvels. *Daedalus*. 141 (3), 67–76.
17. Bataller, R., Brenner, D. A. 2005. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 115 (2), 209–218.

18. Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T. et al. 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 8 (103), 1–22.
19. Benhamou, Y., Bochet, M., di Martino, V., Charlotte, F. et al. 1999. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multivirc Group. *Hepatology*. 30 (4), 1054–1058.
20. Benmassaoud, A., Ghali, P., Cox, J., Wong, P. 2018. Screening for nonalcoholic steatohepatitis by using cytokeratin 18 and transient elastography in HIV mono-infection. *PLoS One*. 13 (1), e0191985. Iegūts no: doi: 10.1371/journal.pone.0191985 [skatīts 27.07.2022.].
21. Beutler, B. 2000. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current Opinion in Immunology*. 12, 20–26.
22. Bica, I., McGovern, B., Dhar, R., Stone, D. et al. 2001. Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases*. 32 (3), 492–497.
23. Bivén, K., Erdal, H., Hagg, M., Ueno, T. et al. 2003. A novel assay for discovery and characterization of pro-apoptotic drugs and for monitoring apoptosis in patient sera. *Apoptosis*. 8, 263–268.
24. Blackard, J. T., Welge, J. A., Taylor, L. E., Mayer, K. H. et al. 2011. HIV monoinfection is associated with FIB-4 – a noninvasive index of liver fibrosis-in women. *Clinical Infectious Diseases*. 52, 674–680.
25. Borgognone, A., Noguera-Julian, M., Oriol, B., Noel-Romas, L. et al. 2022. Gut microbiome signatures linked to HIV-1 reservoir size and viremia control. *Microbiome*. 10 (59). Iegūts no: doi: 10.1186/s40168-022-01247-6. [skatīts 27.06.2022.].
26. Brau, N., Salvatore, M., Rios-Bedoya, C. F., Fernandez-Carbia, A. et al. 2005. Slower fibrosis progression in HIV / HCVcoinfecting patients with successful HIV suppression using antiretroviral therapy. *Journal of Hepatology*. 44 (1), 47–55.
27. Brenchley, J. M., Price, D. A., Douek, D. C. 2006. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature Immunology*. 7, 235–239.
28. Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E. et al. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine*. 12, 1365–1371.
29. Bukh, A. R., Melchjorsen, J., Offersen, R., Jensen, J. M. et al. 2011. Endotoxemia is associated with altered innate and adaptive immune responses in untreated HIV-1 infected individuals. *PLoS One*. 6 (6), e21275. Iegūts no: doi: 10.1371/journal.pone.0021275 [skatīts 09.09.2022.].
30. Buret, A. G., Allain, T., Motta, J. P., Wallace, J. L. 2022. Effects of Hydrogen Sulfide on the Microbiome: From Toxicity to Therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*. 36 (4–6), 211–219. doi: 10.1089/ars.2021.0004.
31. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*. 13 (7), 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869.
32. Canbay, A., Friedman, S., Gores, G. J. 2004. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*. 39 (2), 273–278.
33. Cao, J., Park, J. W., Cooper, A., Sodroski, J. 1996. Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type I. *Journal of Virology*. 70, 1340–1354.
34. Caradonna, L., Amati, L., Magrone, T., Pellegrino, N. M. et al. 2000. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *Journal of Endotoxin Research*. 6, 205–214.
35. Caradonna, L., Mastronardi, M. L., Magrone, T., Cozzolongo, R. et al. 2002. Biological and clinical significance of endotoxemia in the course of Hepatitis C infection. *Current Pharmaceutical Design*. 8, 995–1005.

36. Cassol, E., Malfeld, S., Mahasha, P., van der Merwe, S. et al. 2010. Persistent microbial translocation and immune activation in HIV-1-infected South Africans receiving combination antiretroviral therapy. *The Journal of Infectious Diseases*. 202, 723–733.
37. Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews*. 73 (3), 203–266.
38. Cecchinato, V., Trindade, C. J., Laurence, A., Heraud, J. M. et al. 2008. Altered balance between Th17 and Th1 cells at mucosal sites predicts AIDS progression in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Mucosal Immunology*. 1, 279–288.
39. Chamroonkul, N., Bansal, M. B. 2019. HIV and the liver. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 16 (1-2). Iegūts no: doi: 10.1038/s41575-018-0085-7 [skatīts 27.07.2022.].
40. Chang, E. B., Kashyap, P. 2021. The enteric microbiota in Sleisenger and Fordtran`s. *Gastrointestinal and Liver Diseases*. 11. edition. 3, 24–33.
41. Chang, J. Y., Antonopoulos, D. A., Kalra, A., Tonelli, A. et al. 2008. Decreased diversity of the fecal microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *The Journal of Infectious Diseases*. 197, 435–438.
42. Chen, Y., Yang, F., Lu, H., Wang, B. et al. 2011. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology*. 54 (2), 562–572.
43. Chuaypen, N., Chittmittrapap, S., Avihingsanon, A., Tangkijvanich, P. et al. 2020. Gut microbiota composition is difference between HCV monoinfection and HCV/HIV co-infection. Poster presentation abstract. *Journal of Hepatology*. 73, S239.
44. Chuaypen, N., Jinato, T., Avihingsanon, A., Chirapongsathorn, S. et al. 2021. Improvement of Gut Diversity and Composition After Direct-Acting Antivirals in Hepatitis C Virus-Infected Patients with or without Human Immunodeficiency Virus Coinfection. *The Journal of Infectious Diseases*. 28 (8), 1410–1421. doi: 10.1093/infdis/jiab094.
45. Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E. et al. 2012. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. 488, 178–184.
46. Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N. et al. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 326, 1694–1697.
47. Csak, T., Ganz, M., Pespisa, J., Kodys, K. et al. 2011. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*. 54 (1); 133–144. doi: 10.1002/hep.24341.
48. Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., Relman, D. A. 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *Plos Biology*. 6, 2383–2400.
49. Dethlefsen, L. and Relman, D. A. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (1), 4554–4561.
50. Deeks, S. G., Kitchen, C. M., Liu, L., Guo, H. et al. 2004. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*. 104, 942–947.
51. Dillon, S. M., Lee, E. J., Kotter, C. V., Austin, G. L. et al. 2014. An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia. *Mucosal Immunology*. 7 (4), 983–994.
52. Dinh, D. M., Volpe, G. E., Duffalo, C., Bhalchandra, S. et al. 2015. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 211, 19–27.
53. Dubourg, G., Surenaud, M., Levy, Y., Hue, S. et al. 2017. Microbiome in HIV-infected people. *Microbial Pathogenesis*. 106, 85–93.

54. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E. et al. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308 (5728), 1635–1638.
55. Ellis, C. L., Ma, Z. M., Mann, S. K., Li, C. S. et al. 2011. Molecular characterization of stool microbiota in HIV-infected subjects by panbacterial and order-level 16S ribosomal DNA (rDNA) quantification and correlations with immune activation. *Journal of Acquired Immune Deficite Syndrome*. 57, 363–370.
56. Ellis, R. J., Iudicello, J. E., Heaton, R. K., Isnard, S. et al. 2021. Markers of Gut Barrier Function and Microbial Translocation Associate with Lower Gut Microbial Diversity in People with HIV. *Viruses*. 13, 1891, doi.org/10.3390/v13101891.
57. Epeldegui, M., Magpantay, L., Guo, Y., Halec, G. et al. 2018. A prospective study of serum microbial translocation biomarkers and risk of AIDS- related non- Hodgkin lymphoma. *AIDS*. 32(7), 945–954.
58. Epple, H-J., Schneider, T., Troeger, H., Kunkel, D. et al. 2009. Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV- infected patients. *Gut*. 58, 220–227.
59. Estes, J. D., Harris, L. D., Klatt, N. R., Tabb, B. et al. 2010. Damaged Intestinal Integrity linked to microbial translocation in pathogenic Simian Immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathogens*. 6 (8), e1001052. Iegūts no: doi: 10.1371/journal.ppat.1001052 [skatīts 27.06.2022.].
60. Estes, J. D., Gordon, S. N., Zeng, M., Chahroudi, A. M. et al. 2008. Early resolution of acute immune activation and induction of PD-1 in SIV-infected sooty mangabeys distinguishes nonpathogenic from pathogenic infection in rhesus macaques. *Journal of Immunology*. 180, 6798–6807.
61. Francini, M., Rosetti, G., Tagliaferri, A., Capra, F. et al. 2001. The natural history of chronic hepatitis C in a cohort of HIV-negative Italian patients with hereditary bleeding disorders. *Blood*. 15 (98), 1836–1841.
62. French, A. L., Evans, C. T., Agniel, D. M., Cohen, M. H. et al. 2013. Microbial translocation and liver disease progression in women coinfectd with HIV and hepatitis C virus. *The Journal of Infectious Diseases*. 208, 679–689.
63. Fricker, A. M., Podlesny, D., Fricke, W. F. 2019. What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *Journal of advanced research*. 19, 105–112.
64. Gacesa, R., Kurilshikov, A., Vich Vila, A., Sinha, T. et al. 2022. Environmental factors shaping the gut microbiome in a Dutch population. *Nature*. 604, 732–739.
65. Ganesan, M., Poluektova, L. Y., Enweluzo, C., Kharbanda, K. K. et al. 2018. Hepatitis C Virus-Infected Apoptotic Hepatocytes Program Macrophages and Hepatic Stellate Cells for Liver Inflammation and Fibrosis Development: Role of Ethanol as a Second Hit. *Biomolecules*. 8 (4), 113. Iegūts no: doi: 10.3390/biom8040113 [skatīts 28.07.2022.].
66. Ghannoum, M. 2016. The Mycobiome. *The Scientist*. 2. Iegūts no: <https://www.the-scientist.com> [skatīts 20.07.2022.].
67. Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B. et al. 2006. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*. 2006. 312 (5778), 1355–1359.
68. Giorgi, J. V., Hultin, L. E., McKeating, J. A., Johnson, T. D. et al. 1999. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *The Journal of Infectious Diseases*. 179, 859–870.
69. Gomez-Rial, J., Curras-Tuala, M. J., Rivero-Calle, I., Gomez-Carballea, A. et al. 2020. Increased serum levels of sCD14 and sCD163 indicate a preponderant role for monocytes in COVID-19 immunopathology. *Frontiers in Immunology*. 11. Iegūts no: doi.org/10.3389/fimmu.2020.560381 [skatīts 27.06.2022.].

70. Gordon, S. N., Klatt, N. R., Bosinger, S. E., Brenchley, J. M. et al. 2007. Severe depletion of mucosal CD4⁺ T cells in AIDS-free simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *Journal of Immunology*. 179, 3026–3034.
71. Gori, A., Tincati, C., Rizzardini, G., Torti, C. et al. 2008. Early impairment of gut function and gut flora supporting a role for alteration of gastrointestinal mucosa in human immunodeficiency virus pathogenesis. *Journal of Clinical Microbiology*. 46, 757–758.
72. Gotschlich, E. C., Colbert, R. A., Gill, T. 2019. Methods in microbiome research: Past, present, and future. *Best Practice & Research: Clinical Rheumatology*. 33 (6), 101498. Iegūts no: doi: 10.1016/j.berh.2020.101498 [skatīts 27.07.2022.].
73. Graham, C. S., Baden, L. R., Yu, E., Mrus, J. M. et al. 2001. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 33 (4), 562–569.
74. Guicciardi, M. E., Gores, G. J. 2005. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 54 (7), 1024–1033.
75. Guillen, Y., Noguera-Julian, M., Rivera, J., Casadella, M. et al. 2018. Low nadir CD4⁺ T-cell counts predict gut dysbiosis in HIV-1 infection. *Mucosal Immunology*. 12, 232–246.
76. Häcker, G., Kirschnek, S., Fischer, S. F. 2006. Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus. *Medical Microbiology and Immunology*. 195 (1), 11–19.
77. Hansen, T. H., Gobel, R. J., Hansen, T., Pedersen, O. 2015. The gut microbiome in cardio-metabolic health. *Genome Medicine*. 7, 33. Iegūts no: doi.org/10.1186/s13073-015-0157-z [skatīts 25.07.2022.].
78. Hartstra, A. V., Bouter, K. E., Bäckhed, F., Nieuwdorp, M. 2015. Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 38 (1), 159–165.
79. Hayes, C. N., Zhang, P., Zhang, Y., Chayama, K. 2018. Molecular Mechanisms of Hepatocarcinogenesis Following Sustained Virological Response in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Viruses*. 10 (531). Iegūts no: doi: 10.3390/v10100531 [skatīts 01.07.2022.].
80. Heidrich, B., Steinmann, E., Plumeier, I., Kirschner, J. et al. 2016. Frequent detection of HCV RNA and HCV core Ag in stool of patients with chronic hepatitis C. *Journal of Clinical Virology*. 80. Iegūts no: doi.org/10.1016/j.jcv.2016.04.006 [skatīts 02.07.2022.].
81. Heidrich, B., Vital, M., Plumeier, I., Döscher, N. et al. 2018. Intestinal microbiota in patients with chronic hepatitis C with and without cirrhosis compared with healthy controls. *Liver International*. 38 (1), 50–58. doi: 10.1111/liv.13485.
82. Herbein, G., Khan, K. A. 2008. Is HIV infection a TNF receptor signalling-driven disease? *Trends in Immunology*. 29 (2), 61–67.
83. Hernandez, M. D., Sherman, K. E. 2011. HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 6, 478–482.
84. Honda, T., Ishigami, M., Yamamoto, K., Takeyama, T. et al. 2021. Changes in the gut microbiota after hepatitis C virus eradication. *Scientific Reports*. 7 (1), 23568. Iegūts no: doi: 10.1038/s41598-021-03009-0 [skatīts 02.07.2022.].
85. Hong, P.-Y., Croix, J. A., Greenberg, E., Gaskins, H. R. et al. 2011. Pyrosequencing-based analysis of the mucosal microbiota in healthy individuals reveals ubiquitous bacterial groups and micro-heterogeneity. *PLoS ONE*. 6(9), 1–10, e25042. Iegūts no: doi.org/10.1371/journal.pone.0025042 [skatīts 03.07.2022.].
86. Hou, K., Wu, Z. X., Chen, X. Y., Wang, J. Q. et al. 2022. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 7 (135), 1–28.

87. Hughes, C. A., Robinson, L., Tseng, A., MacArthur, R. D. 2009. New antiretroviral drugs: a review of the efficacy, safety, pharmacokinetics, and resistance profile of tipranavir, darunavir, etravirine, rilpivirine, maraviroc, and raltegravir. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*. 10 (15), 2445–2466.
88. Hunt, P. W., Martin, J. N., Sinclair, E., Brecht, B. et al. 2003. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus– infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *The Journal of Infectious Diseases*. 187 (10), 1534–1543.
89. Hunt, P. W., Sinclair, E., Rodriguez, B. Shive, C. et al. 2014. Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 210, 1228– 1238.
90. Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y. K., Peng, L. et al. 2006. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (10), 3920–3925. doi: 10.1073/pnas.0509592103.
91. Ianello, A., Debbeche, O., Samarani, S., Ahmad, A. 2008. Antiviral NK cell responses in HIV infection: II. viral strategies for evasion and lessons for immunotherapy and vaccination. *Journal of Leukocyte Biology*. 84 (1), 27–49.
92. Ingiliz, P., Rockstroh, J. K. 2015. Natural history of liver disease and effect of hepatitis C virus on HIV disease progression. *Current Opinion in HIV & AIDS*. 10 (5), 303–308. doi: 10.1097/COH.0000000000000187.
93. Inoue, T., Nakayama, J., Moriya, K., Kawaratani, H. et al. 2018. Gut Dysbiosis associated with Hepatitis C Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 67 (6), 869–877. doi: 10.1093/cid/ciy205.
94. Ioannou, G. N., Feld, J. J. 2019. What Are the Benefits of a Sustained Virologic Response to Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection? *Gastroenterology*. 2019 156 (2), 446–460. doi: 10.1053/j.gastro.2018.10.033.
95. Isayama, F., Hines, I. N., Kremer, M., Milton, R. J. et al. 2006. LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 290 (6), 1318–1328. doi: 10.1152/ajpgi.00405.2005.
96. Ishizaka, A., Koga, M., Mizutani, T., Parbie, P. K. et al. 2021. Unique gut microbiome in HIV patients on antiretroviral therapy (ART) suggests association with chronic inflammation. *Microbiology Spectrum*. 9 (1), e00708-21. Iegüts no: doi.org/10.1128/Spectrum.00708-21 [skatīts 20.07.2022.].
97. Jiang, W., Lederman, M. M., Hunt, P., Sieg, S. F. et al. 2009. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral- treated HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 199 (8), 1177–1185.
98. Jin, X., Zimmers, T. A., Perez, E. A., Pierce, R. H. et al. 2006. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology*. 43 (3), 474–484.
99. Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M. et al. 2019. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*. 10, 5029. Iegüts no: doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1 [skatīts 27.07.2022.].
100. Kelleher, T. B., Mehta, S. H., Bhaskar, R., Sulkowski, M. et al. 2005. Prediction of hepatic fibrosis in HIV / HCVco-infected patients using serum fibrosis markers: the SHASTA index. *Journal of Hepatology*. 43 (1), 78–84.
101. Kelley, C. F., Kraft, C. S., de Man, T. J. B., Duphare, C. et al. 2017. The rectal mucosa and condomless receptive anal intercourse in HIV-negative MSM: implications for HIV transmission and prevention. *Mucosal Immunology*. 10, 996–1007.
102. Kestens, L., Vanham, G., Vereecken, C., Vandenbruaene, M. et al. 1993. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clinical and Experimental Immunology*. 95, 436–441.

103. Kim, H. N., Nance, R., van Rompaey, S., Delaney, J. C. et al. 2016. Poorly Controlled HIV Infection: An Independent Risk Factor for Liver Fibrosis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 72 (4), 437–443.
104. Klatt, N. R., Estes, J. D., Sun, X., Ortiz, A. M. et al. 2012. Loss of mucosal CD103+ DCs and IL-17+ and IL-22+ lymphocytes is associated with mucosal damage in SIV infection. *Mucosal Immunology*. 5 (6), 646–657.
105. Klein, R. D., Su, G. L., Aminlari, A., Alarcon, W. H. et al. 1998. Pulmonary LPS-Binding Protein (LBP) Upregulation Following LPS-Mediated Injury. *Journal of Surgical Research*. 78, 42–47.
106. Kliemann, D. A., Wolff, F. H., Tovo, C. V., Alencastro, P. R. et al. 2016. Biochemical non-invasive assessment of liver fibrosis cannot replace biopsy in HIV-HCV coinfecting patients. *Annals of Hepatology*. 2016, 15(1), 27–32.
107. Kobayashi, N., Kumada, T., Toyoda, H., Tada, T. et al. 2017. Ability of Cytokeratin-18 Fragments and FIB-4 Index to Diagnose Overall and Mild Fibrosis Nonalcoholic Steatohepatitis in Japanese Nonalcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Digestive Diseases*. 35 (6), 521–530.
108. Konerman, M. A., Mehta, S. H., Sutcliffe, C. G., Vu, T. et al. 2014. Fibrosis progression in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting adults: prospective analysis of 435 liver biopsy pairs. *Hepatology*. 59 (3), 767–775.
109. Koppel, N., Maini Rekdal, V., Balskus, E. P. 2017. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science*. 356 (1246), eaag2770. Iegūts no: doi: 10.1126/science.aag2770 [skatīts 20.07.2022.].
110. Lackner, A. A., Mohan, M., Veazey, R. S. 2009. The gastrointestinal tract and AIDS pathogenesis. *Gastroenterology*. 136 (6), 1965–1978.
111. Landmann, R., Knopf, H. P., Link, S., Sansano, S. et al. 1996. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*. 64 (5), 1762–1769.
112. Larrousse, M., Laguno, M., Segarra, M., de Lazzari, E. et al. 2007. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis in HIV/HCV-coinfecting patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 46 (3), 304–311.
113. Lattanzi, B., Baroncelli, S., de Santis, A., Galluzzo, C. M. et al. 2018. Microbial translocation and T cell activation are modified by direct-acting antiviral therapy in HCV-infected patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 48 (10), 1146–1155.
114. Lazupone, C. A., Li, M., Campbell, T. B., Flores, S. C. et al. 2013. Alterations in the gut microbiota associated with HIV-1 infection. *Cell Host Microbe*. 14, 329–39.
115. Lazupone, C. A., Rhodes, M. E., Neff, C. P., Fontenot, A. P. et al. 2014. HIV- induced alterations in gut microbiota. *Gut Microbes*. 5 (4), 562–570.
116. Lederman, M. M., Calabrese, L., Funderburg, N. T., Clagett, B. et al. 2011. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. *The Journal of Infectious Diseases*. 204 (8), 1217–1226.
117. Lee, M. H., Yang, H. I., Yuan, Y., L'Italien, G. et al. 2014. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*. 20 (28), 9270–9280. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9270.
118. Lenardo, M. J., Angleman, S. B., Baunkeua, V., Dimas, J. et al. 2002. Cytopathic killing of peripheral blood CD4(+) T Lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 appears necrotic rather than apoptotic and does not require env. *Journal of Virology*. 76, 5082–5093.
119. Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A. et al. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102 (31), 11070–11075.
120. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., Gordon, J. I. 2006. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 444 (7122), 1022–1023.

121. Li, S. X., Armstrong, A. J. S., Neff, C. P., Shaffer, M. et al. 2016. Complexities of gut microbiome dysbiosis in the context of HIV infection and antiretroviral therapy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 99 (6), 600–611.
122. Lien, E., Aukrust, P., Sundan, A., Muller, F. et al. 1998. Elevated levels of serum soluble CD14 in Human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: correlation to disease progression and clinical events. *Blood*. 92 (6), 2084–2092.
123. Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnava, G., Crabtree, J. et al. 2017. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*. 550, 61–66.
124. López-Cortés, L. F., Trujillo-Rodríguez, M., Báez-Palomo, A., Benmarzouk-Hidalgo, O. J. et al. 2018. Eradication of Hepatitis C Virus (HCV) Reduces Immune Activation, Microbial Translocation, and the HIV DNA Level in HIV/HCV-Coinfected Patients. *Journal of Infectious Diseases*. 13 (4), 624–632. doi: 10.1093/infdis/jiy136. PMID: 29986086.
125. Lo Re, V. 3rd, Kallan, M. J., Tate, J. P., Localio, A. R. et al. 2014. Hepatic decompensation in antiretroviral-treated patients co-infected with HIV and hepatitis C virus compared with hepatitis C virus-monoinfected patients: a cohort study. *Annals of Internal Medicine*. 160 (6), 369–379. doi: 10.7326/M13-1829.
126. Lu, L., Wang, J., Yang, Q., Xie, X. et al. 2021. The role of CD38 in HIV infection. *AIDS Research and Therapy*. 18 (1). Iegūts no: doi: 10.1186/s12981-021-00330-6 [skatīts 02.07.2022.].
127. MacDonald, T. T., Monteleone, I., Fantini, M. C., Monteleone, G. 2011. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology*. 140 (6), 1768–1775.
128. Macias, J., Berenguer, J., Japon, M. A., Giron, J. A. et al. 2009. Fast Fibrosis Progression Between Repeated Liver Biopsies in Patients Coinfected with Human Immunodeficiency Virus/Hepatitis C Virus. *Hepatology*. 50 (4), 1056–1063.
129. Macpherson, J., Slack, E. 2007. The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. *Current Opinion in Gastroenterology*. 23 (6), 673–678. doi: 10.1097/MOG.0b013e3282f0d012.
130. Maida, I., Nunez, M., Rios, M. J., Martin-Carbonero, M. et al. 2006. Severe liver disease associated with prolonged exposure to antiretroviral drugs. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 42 (2), 177–182.
131. Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G. et al. 2018. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature*. 555, 623–628.
132. Marchetti, G., Bellistri, G. M., Borghi, E., Tincati, C. et al. 2008. Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4+ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 22, 2035–2038.
133. Marchetti, G., Cozzi-Lepri, A., Merlini, E., Bellistri, G. M. et al. 2011. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naive patients with high CD4+ cell count. *AIDS*. 25, 1385–1394.
134. Marchetti, J., Nasta, P., Bai, F., Gatti, F. et al. 2012. Circulating sCD14 Is Associated with Virological Response to Pegylated-Interferon-Alpha/Ribavirin Treatment in HIV / HCV Co-Infected Patients. *Plos One*. 7 (2), e32028. Iegūts no: doi.org/10.1371/journal.pone.0032028 [skatīts 02.07.2022.].
135. Marchetti, G., Tincati, C., Silvestri, G. 2013. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clinical Microbiology Reviews*. 26, 2–18.
136. Marchetti, G., Cozzi-Lepri, A., Tincati, C., Calcagno, A. et al. 2014. Immune activation and microbial translocation in liver disease progression in HIV/hepatitis co-infected patients: results from Icona Foundation study. *BMC Infectious Diseases*. 12 (79). Iegūts no: doi: 10.1186/1471-2334-14-79 [skatīts 02.07.2022.].

137. Marcus, J. L., Chao, C. R., Leyden, W. A., Xu, L. et al. 2016. Narrowing the gap in life expectancy between HIV-infected and HIV-uninfected individuals with access to care. *Journal of Acquired Immune Deficite Syndrome*. 73 (1), 39–46.
138. Markle, J. G., Frank, D. N., Mortin-Toth, S., Robertson, C. E. et al. 2013. Sex differences in the gut microbiome drive hormone- dependent regulation of autoimmunity. *Science*. 339 (6123), 1084–1110.
139. Marks, M. A., Rabkin, C. S., Engels, E. A., Busch, E. et al. 2013. Markers of microbial translocation and risk of AIDS- related lymphoma. *AIDS*. 27, 469–474.
140. Marquez, M., Fernandez Gutierrez del Alamo, C., Giron-Gonzalez, J. A. 2016. Gut epithelial barrier dysfunction in human immunodeficiency virus-hepatitis C virus coinfectd patients: influence on innate and acquired immunity. *World Journal of Gastroenterology*. 22 (4), 1433–1448.
141. Martinez-Guryn, K., Hubert, N., Frazier, K., Urlass, S. et al. 2018. Small Intestine Microbiota Regulate Host Digestive and Absorptive Adaptive Responses to Dietary Lipids. *Cell Host & Microbe*. 23 (4), 458–469.e5. doi: 10.1016/j.chom.2018.03.011.
142. McHardy, I. H., Li, X., Tong, M., Ruegger, P. et al. 2013. HIV Infection is associated with compositional and functional shifts in the rectal mucosal microbiota. *Microbiome*. 1 (1), 26. Iegūts no: doi: 10.1186/2049-2618-1-26 [skatīts 30.07.2022.].
143. Medrano, L. M., Garcia-Broncano, P., Berenguer, J., Gonzalez-Garcia, J. et al. 2018. Elevated liver stiffness is linked to increased biomarkers of inflammation and immune activation in HIV/hepatitis C virus-coinfectd patients. *AIDS*. 32 (9), 1095–1105.
144. Medrano, L. M., Berenguer, J., Salguero, S., Gonzalez-Garcia, J. et al. 2021. Successful HCV therapy reduces liver disease severity and inflammation biomarkers in HIV / HCVcoinfectd patients with advanced cirrhosis: a cohort study. *Frontiers in Medicine*. 8. Iegūts no: doi.org/10.3389/fmed.2021.615342 [skatīts 02.07.2022.].
145. Meiler, C., Muhlbauer, M., Johann, M., Hartmann, A. et al. 2005. Different effects of a CD14 gene polymorphism on disease outcome in patients with alcoholic liver disease and chronic hepatitis C infection. *World Journal of Gastroenterology*. 11 (38), 6031–6037.
146. Merlini, E., Bai, F., Bellistri, G. M., Tincati, C. et al. 2011. Evidence for polymicrobial flora translocating in peripheral blood of HIV-infected patients with poor immune response to antiretroviral therapy. *PLoS One*. 6 (4), e18580. Iegūts no: doi:10.1371/ journal.pone.0018580 [skatīts 03.07.2022.].
147. Merlini, E., Cozzi-Iepri, A., Castagna, A., Costantini, A. et al. 2021. Inflammation and microbial translocation measured prior to combination antiretroviral therapy (cART) and long-term probability of clinical progression in people living with HIV. *BMC Infectious Diseases*. 21, 557. Iegūts no: doi.org/10.1186/s12879-021-06260-y [skatīts 03.07.2022.].
148. Mingjun, Z., Fei, M., Zhousong, X., Wei, X. et al. 2022. 16S rDNA sequencing analyzes differences in intestinal flora of human immunodeficiency virus (HIV) patients and association with immune activation. *Bioengineered*. 13 (2), 4085–4099.
149. Mizutani, T., Ishizaka, A., Koga, M., Tsutsumi, T. et al. 2022. Role of Microbiota in Viral Infections and Pathological Progression. *Viruses*. 14 (950). Iegūts no: doi: 10.3390/v14050950 [skatīts 03.07.2022.].
150. Morlat, P., Roussillon, C., Henard, S., Salmon, D. et al. 2014. Causes of death among HIV-infected patients in France in 2010 (national survey): trends since 2000. *AIDS*. 15 (8), 1181–1191.
151. Mouzaki, M., Comelli, E. M., Arendt, B. M., Bonengel, J. et al. 2013. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 58 (1), 120–127.
152. Murali, A., Bhargava, A., Wright, E. S. 2018. IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome*. 6 (140). Iegūts no: doi.org/10.1186/s40168-018-0521-5 [skatīts 27.07.2022.].

153. Mutlu, E. A., Keshavazian, A., Losurdo, J., Swanson, G. et al. 2014. A compositional look at the human gastrointestinal microbiome and immune activation parameters in HIV infected subjects. *PLoS Pathogens*. 10 (2), e1003829. Iegūts no: doi:10.1371/journal.ppat.1003829 [skatīts 03.07.2022.].
154. Nanji, A. A., Khettry, U., Sadrzdeh, S. M. H., Yamanaka, T. 1993. Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. *American Journal of Pathology*. 142 (2), 367–373.
155. Neff, C. P., Krueger, O., Xiong, K., Arif, S. et al. 2018. Fecal Microbiota Composition Drives Immune Activation in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine*. 30, 192–202. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.024.
156. Nganou-Makamdop, K., Talla, A., Sharma, A. A., Darko, S. et al. 2021. Translocated microbiome composition determines immunological outcome in treated HIV infection. *Cell*. 184, 3899–3914.
157. Noguera-Julian, M., Rocafort, M., Guillen, Y., Rivera, J. et al. 2016. Gut microbiota linked to sexual preference and HIV infection. *EBioMedicine*. 5, 135–146.
158. Nystrom, J., Stenkvist, J., Haggblom, A., Weiland, O. et al. 2015. Low Levels of Microbial Translocation Marker LBP Are Associated with Sustained Viral Response after Anti-HCV Treatment in HIV-1/HCV Co-Infected Patients. *PLoS One*. 10 (3), e0118643. Iegūts no: doi: 10.1371/journal.pone.0118643 [skatīts 05.07.2022.].
159. Ouyang, J., Isnard, S., Lin, J., Fombuena, B. et al. 2020. Daily variations of gut microbial translocation markers in ART-treated HIV-infected people. *AIDS Research and Therapy*. 17 (15). Iegūts no: doi: 10.1186/s12981-020-00273-4 [skatīts 05.07.2022.].
160. Paiardini, M., Frank, I., Pandrea, I., Apetrei, C. et al. 2008. Mucosal immune dysfunction in AIDS pathogenesis. *AIDS Review*. 10, 36–46.
161. Paiardini, M., Müller-Trutwin, M. 2013. HIV-associated chronic immune activation. *Immunological Reviews*. 254 (1), 78–101. Iegūts no: doi: 10.1111/imr.12079 [skatīts 20.07.2022.].
162. Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. et al. 2007. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLoS Biology*. 5 (7), 1556–1573.
163. Parada, A. E., Needham, D. M., Fuhrman, J. A. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*. 18 (5), 1403–1414.
164. Parfieniuk-Kowerda, A., Lapinski, T. W., Rogalska-Plonska, M., Swiderska, M. et al. 2014. Serum cytochrome c and m30-neoepitope of cytokeratin-18 in chronic hepatitis C. *Liver International*. 34, 544–550.
165. Parséus, A., Sommer, N., Sommer, F., Caesar, R. et al. 2017. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut*. 66 (3), 429–437. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310283.
166. Pasquereau, S., Kumar, A., Herbein, G. 2017. Targeting TNF and TNF Receptor Pathway in HIV-1 Infection: from Immune Activation to Viral Reservoirs. *Viruses*. 9 (64), doi.org/10.3390/v9040064.
167. Peters, L., Neuhaus, J., Duprez, D., Neaton, J. D. et al. 2014. Biomarkers of inflammation, coagulation and microbial translocation in HIV / HCV co-infected patients in the SMART study. *Journal of Clinical Virology*. 60, 295–300.
168. Pflughoeft, K. J., Versalovic, J. 2012. Human microbiome in health and disease. *Annual Review of Pathology*. 7, 99–122.
169. Philips, C. A., Pande, A., Shasthry, S. M., Jamwal, K. D. et al. 2017. Healthy Donor Fecal Microbiota Transplantation in Steroid-Ineligible Severe Alcoholic Hepatitis: A Pilot Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 15 (4), 600–602. doi: 10.1016/j.cgh.2016.10.029.
170. Ponziani, F. R., Putignani, L., Paroni Sterbini, F., Petito, V. et al. 2018. Influence of hepatitis C eradication with direct-acting antivirals on the gut microbiota in patients with cirrhosis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 48 (11), 1301–1311.

171. Porras, A. M., Shi, Q., Zhou, H., Callahan, R. et al. 2021. Geographic differences in gut microbiota composition impact susceptibility to enteric infection. *Cell Reports*. 36 (4), 109457. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109457.
172. Poynard, T., Bedossa, P., Opolon, P. 1997. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *The Lancet*. 349 (9055), 825–832.
173. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M. et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464, 59–67.
174. Raman, M., Ahmed, I., Gillevet, P. M., Probert, C. S. et al. 2013. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 11 (7), 868–875.
175. Redd, A. D., Dabir, D., Bream, J. H., Charvat, B. et al. 2009. Microbial translocation, the innate cytokine response, and HIV-1 disease progression in Africa. *PNAS*. 106 (16), 6718–6723.
176. Reiner, A. P., Lange, E. M., Jenny, N. S., Chaves, P. H. M. et al. 2013. Soluble CD14: genome wide association analysis and relationship to cardiovascular risk and mortality in the older adults. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 33 (1). Iegūts no: doi:10.1161/ATVBAHA.112.300421 [skatīts 20.07.2022.].
177. Rocafort, M., Noguera-Julian, M., Rivera, J., Pastor, L. et al. 2019. Evolution of the gut microbiome following acute HIV-1 infection. *Microbiome*. 7 (73). Iegūts no: doi: 10.1186/s40168-019-0687-5 [skatīts 05.07.2022.].
178. Rockstroh, J. K., Spengler, U., Sudhop, T., Ewig, S. et al. 1996. Immunosuppression may lead to progression of hepatitis C virus-associated liver disease in hemophiliacs coinfecting with HIV. *American Journal of Gastroenterology*. 91 (12), 2563–2568.
179. Rohrbach, J., Stickel, F., Schmid, P., Thormann, W. et al. 2014. Changes in biomarkers of liver disease during successful combination antiretroviral therapy in HIV-HCV-coinfecting individuals. *Antiviral Therapy*. 19 (2), 149–159.
180. Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A. et al. 2018. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*. 555, 210–215.
181. Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G. et al. 2011. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*. 332 (6032), 974–977. doi: 10.1126/science.1206095.
182. Rowan, F., Docherty, N. G., Murphy, M., Murphy, B. et al. 2010. Desulfovibrio Bacterial Species Are Increased in Ulcerative Colitis. *Diseases of the Colon & Rectum*. 53 (11), 1530–1536.
183. Sacchi, P., Cima, S., Corbella, M., Comolli, G. et al. 2015. Liver fibrosis, microbial translocation and immune activation markers in HIV and HCV infections and HIV / HCV co-infection. *Digestive and Liver Disease*. 47 (3), 218–225.
184. Sajadi, M. M., Shakeri, N., Talwani, R., Redfield, R. R. 2010. Hepatitis C infection in HIV-1 natural viral suppressors. *AIDS*. 24 (11), 1689–1695.
185. Sandler, N. G., Wand, H., Roque, A., Law, M. et al. 2011. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 203, 780–790.
186. Sandler, N. G., Douek, D. C. 2012. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature Reviews Microbiology*. 10, 655–666.
187. Sartor, R. B. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 134 (2), 577–594.
188. Schietroma, M., Carlei, F., Cappelli, S., Amicucci, G. 2006. Intestinal permeability and systemic endotoxemia after laparotomic or laparoscopic cholecystectomy. *Annals of Surgery*. 243, 359–363.

189. Schmid, P., Bregenzner, A., Huber, M., Rauch, A. et al. 2015. Progression of Liver Fibrosis in HIV / HCV Co-Infection: A Comparison between Non-Invasive Assessment Methods and Liver Biopsy. *PLoS One*. 10 (9), e0138838. Iegūts no: doi: 10.1371/journal.pone.0138838 [skatīts 27.07.2022.].
190. Schwabe, R. F., Jobin, C. 2013. The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 13 (11); 800–812. doi: 10.1038/nrc3610.
191. Seki, E., Schnabl, B. 2012. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *The Journal of Physiology*. 590 (3); 447–458. doi: 10.1113/jphysiol.2011.219691.
192. Shmagel, K. V., Saidakova, E. V., Korolevskaya, L. B., Shmagel, N. G. et al. 2014. Influence of hepatitis C virus coinfection on CD4⁺ T cells of HIV-infected patients receiving HAART. *AIDS*. 28 (16), 2381–2388.
193. Shmagel, K. V., Saidakova, E. V., Shmagel, N. G., Korolevskaya, L. B. et al. 2016. Systemic inflammation and liver damage in HIV/hepatitis C virus coinfection. *HIV Medicine*. 17, 581–589.
194. Shreiner, A. B., Kao, J. Y., Young, V. B. 2015. The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 31 (1), 69–75.
195. Slimību profilakses un kontroles centrs (SPKC). Iegūts no: <https://www.spkc.gov.lv/lv/> [skatīts 05.08.2022.].
196. Sodora, D. L., Silvestri, G. 2008. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS*. 22, 439–446.
197. Sterling, R. K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R. et al. 2006. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV / HCV coinfection. *Hepatology*. 43 (6), 13171325. doi: 10.1002/hep.21178.
198. Sulkowski, M. S. 2007. Hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *Current Infectious Disease Reports*. 3, 469–476.
199. Sultan, S., El-Mowafy, M., Elgaml, A., El-Mesery, M. et al. 2021. Alterations of the Treatment-Naive Gut Microbiome in Newly Diagnosed Hepatitis C Virus Infection. *ACS Infectious Diseases*. 14 (5), 1059–1068. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00432.
200. Talwar, S., Munson, P. J., Barb, J., Fiuza, C. et al. 2006. Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans. *Physiological Genomics*. 25 (2), 203–215.
201. Tang, Q., Jin, G., Wang, G., Liu, T. et al. 2020. Current sampling methods for gut microbiota: a call for more precise devices. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 04. Iegūts no: doi.org/10.3389/fcimb.2020.00151 [skatīts 20.07.2022.].
202. Taylor, B. C., Weldon, K. C., Ellis, R. J., Franklin, D. et al. 2020. Depression in Individuals Coinfected with HIV and HCV Is Associated with Systematic Differences in the Gut Microbiome and Metabolome. *mSystems*. 5 (5), e00465-20. Iegūts no: doi: 10.1128/mSystems.00465-20 [skatīts 05.07.2022.].
203. Tavakoli, P., Vollmer-Conna, U., Hadzi-Pavlovic, D., Grimm, M. C. 2021. A review of inflammatory Bowel disease: a model of microbial, immune and neuropsychological integration. *Public Health Reviews*. 42. Iegūts no: doi.org/10.3389/phrs.2021.1603990. [skatīts 20.07.2022.].
204. Teeraananchai, S., Kerr, S. J., Amin, J., Ruxrungtham, K., Law, M. G. 2017. Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: a meta-analysis. *HIV Medicine*. 18 (4), 256–266.
205. The Human Microbiome Project Consortium. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 486, 207–214.
206. The IeDEA and COHERE Cohort Collaborations. 2018. Global trends in CD4 cell count at the start of antiretroviral therapy: collaborative study of treatment programs. *Clinical Infectious Diseases*. 66 (6), 893–903.

207. Thrift, A. P., El-Serag, H. B., Kanwal, F. 2017. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 14 (2), 122–132. doi: 10.1038/nrgastro.2016.176.
208. Tilg, H., Cani, P. D., Mayer, E. A. 2016. Gut microbiome and liver diseases. *Gut*. 65 (12), 2035–2044. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312729.
209. Tincati, C., Douek, D. C., Marchetti, G. 2016. Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *AIDS Research and Therapy*. 13 (19). Iegūts no: doi.org/10.1186/s12981-016-0103-1 [skatīts 27.07.2022.].
210. Tøn, H., Brandsnes Dale, S., Holtlund, J., Skuibina, E. et al. 2000. Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta*. 292, 41–54.
211. Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D. A., Karin, M. et al. 2018. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 15 (7), 397–411. doi: 10.1038/s41575-018-0011-z.
212. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M. et al. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature*. 449, 804–810.
213. Tuyama, A. C., Hong, F., Saiman, Y., Wang, C. et al. 2010. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus induced liver fibrosis. *Hepatology*. 52 (2), 612–622.
214. UNAIDS. Iegūts no: <https://www.unaids.org/en> [skatīts 05.08.2022.].
215. Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Wegner Parfrey, L., Knight, R. 2012. Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*. 70 (1), S38–S44.
216. Valva, P., Rios, D. A., de Matteo, E., Preciado, M. V. 2016. Chronic hepatitis C virus infection: serum biomarkers in predicting liver damage. *World Journal of Gastroenterology*. 22 (4), 1367–1381.
217. Van den Bogert, B., de Vos, W. M., Zoetendal, E. G., Kleerebezem, M. 2011. Microarray analysis and barcoded pyrosequencing provide consistent microbial profiles depending on the source of human intestinal samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 77, 2071–2080.
218. Van der Helm, J., Geskus, R., Sabin, C., Meyer, L. et al. 2013. Effect of HCV infection on cause-specific mortality after HIV seroconversion, before and after 1997. *Gastroenterology*. 144 (4), 751–760.
219. Vassallo, M., Mercie, P., Cottalorda, J., Ticchioni, M. et al. 2012. The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review. *Journal of Virology*. 9 (174), 1–8.
220. Villanueva-Millan, M. J., Perez-Matute, P., Recio-Fernandez, E., Lezana Rosales, J. M. et al. 2017. Differential effects of antiretrovirals on microbial translocation and gut microbiota composition of HIV-infected patients. *Journal of the International AIDS Society*. 20, 1–13.
221. Virseda-Berdecies, A., Brochado-Kith, O., Díez, C., Hontañon, V. et al. On behalf of the ESCORIAL Study Group. 2022. Blood microbiome is associated with changes in portal hypertension after successful direct-acting antiviral therapy in patients with HCV-related cirrhosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 77 (3), 719–726. doi.org/10.1093/jac/dkab444.
222. Vyboh, K., Jenabian, M. A., Mehraj, V., Routy, J. P. 2015. HIV and the gut microbiota, partners in crime: breaking the vicious cycle to unearth new therapeutic targets. *Journal of Immunology Research*. 2015, 614127. Iegūts no: doi: 10.1155/2015/614127 [skatīts 05.08.2022.].
223. Vujkovic-Cvijin, I., Dunham, R. M., Iwai, S., Maher, M. C. et al. 2013. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Science Translational Medicine*. 5 (193), 193ra91. Iegūts no: doi:10.1126/scitranslmed.3006438 [skatīts 22.07.2022.].

224. Wang, S. C., Klein, R. D., Wahl, W. L., Alarcon, W. H. et al. 1998. Tissue Coexpression of LBP and CD14 mRNA in a Mouse Model of Sepsis. *Journal of Surgical Research*. 76, 67–73.
225. Wellhoner, F., Doscher, N., Woelfl, F., Vital, M. et al. 2021. Eradication of chronic HCV infection: improvement of dysbiosis only in patients without liver cirrhosis. *AASLD Hepatology*. 74 (1), 72–82.
226. Whipps, J. M., Lewis, K., Cooke, R. C. 1988. Mycoparasitism and plant disease control in Burge, N. M., *Fungi in Biological Control Systems*. Manchester University Press. 161–187.
227. Wiest, R., Lawson, M., Geuking, M. 2014. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 60, 197–209.
228. World Health Organization. Iegūts no: <https://www.who.int/> [skatīts 20.07.2022.].
229. Wu, L., Zeng, T., Deligios, M., Milanesi, L. et al. 2020. Age-Related Variation of Bacterial and Fungal Communities in Different Body Habitats across the Young, Elderly, and Centenarians in Sardinia. *mSphere*. 5 (1), 1–17.
230. Wurfel, M. M., Hailman, E., Wright, S. D. 1995. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *Journal of Experimental Medicine*. 181, 1743–1754.
231. Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehanet, I. et al. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 486, 222–227.
232. Yilmaz, Y. 2009. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 – the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 30 (11-12), 1103–1109.
233. Yilmaz, Y., Dolar, E., Ulukaya, E., Akgoz, S. et al. 2009. Elevated serum levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 (CK18-Asp396) in patients with nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Medical Science Monitor*. 15 (4), 189–193.
234. Zilberman-Schapira, G., Zmora, N., Itav, S., Bashirdes, S. et al. 2016. The gut microbiome in human immunodeficiency virus infection. *BMC Medicine*. 14, 83. Iegūts no: <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0625-3> [skatīts 27.07.2022.].
235. Zoetendal, E. G., Raes, J., van den Bogert, B., Arumugam, M. et al. 2012. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *The ISME Journal*. 6, 1415–1426.

Pateicības

Vislielākā pateicība manai darba vadītājai *Dr. habil. med.* profesorei **Ludmilai Viksnai** par iedrošinājumu uzņemties pētniecību, par ievadīšanu interesantajā zinātnes pasaulē, par atbalstu un vērtīgajiem padomiem visa pētniecības procesa gaitā.

Ļoti liels un īpašs paldies kolēģiem no laboratorijas dienesta **Dacei Rudzītei, Ģirtam Šķenderam** un **Reinim Vangravam** par padomiem, palīdzību un neatsveramu atbalstu laboratorisko izmeklējumu veikšanā.

Esmu ļoti pateicīga savai zinātniskajai konsultantei *Dr. med.* **Oksanai Koļesovai** par veltīto laiku un nozīmīgo atbalstu pētījuma laikā. Kā arī īpašs paldies **Oksanai** un **Aleksandram Koļesoviem** par palīdzību orientēties sarežģītajā statistikas pasaulē.

Paldies arī ģimenei, jo īpaši mammai, daudziem vārdā nenosauktiem kolēģiem, RSU Infektoloģijas katedras darbiniecēm un draugiem par atbalstu, motivēšanu un padomiem darba izstrādes gaitā.

Pielikumi

**Atšķirības parametris pacientiem ar HIV monoinfekciju,
HIV / HCV koinfekciju un HCV infekciju**

Parametri	Grupas			Kruskala- Valisa tests
	HIV (n = 28)	HIV / HCV (n = 29)	HCV (n = 24)	
	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	H
Vecums, gadi	43 (36,0; 55,8)	44 (39,5; 49,0)	45 (36,0; 51,5)	0,01
ĶMI, kg/m ²	21,0 ^a (19,1; 23,4)	21,3 ^a (19,7; 23,8)	24,7 ^b (22,6; 25,6)	14,36**
Leikocīti × 10 ⁹ /l	4,71 (3,76; 7,38)	5,68 (4,00; 7,50)	5,47 (4,42; 7,05)	0,61
Eritrocīti × 10 ¹² /l	4,00 ^a (3,37; 4,47)	3,84 ^a (3,59; 4,34)	4,75 ^b (4,37; 5,03)	16,77***
Hemoglobīns, g/dl	11,75 ^a (9,95; 13,20)	12,10 ^a (10,35; 12,70)	14,25 ^b (13,45; 15,53)	20,80***
Trombocīti × 10 ⁹ /l	214 (136; 237)	170 (126; 243)	202 (182; 247)	2,45
ALT, U/l	20 ^a (14; 39)	28 ^a (18; 59)	69 ^b (47; 101)	19,72***
AST, U/l	24 ^a (15; 43)	40 ^{a,b} (29; 53)	53 ^b (33; 75)	13,30**
FIB-4	1,28 (0,85; 1,75)	1,91 (1,24; 3,06)	1,33 (0,78; 2,03)	5,77
≤ 1,45, pacientu skaits, %	57 %	35 %	58 %	–
1,46-3,24, pacientu skaits, %	39 %	44 %	21 %	–
≥ 3,25, pacientu skaits, %	4 %	21 %	21 %	–
LBP, µg/ml	21,6 ^a (17,4; 35,2)	23,5 ^a (17,9; 39,0)	16,0 ^b (14,7; 22,1)	12,12**
sCD14, ng/ml	7253 (5258; 13912)	6483 (5224; 7713)	5216 (4289; 7720)	5,21
CK18-M30, U/l	95 ^a (69; 170)	138 ^b (95; 300)	196 ^b (110; 380)	14,05**
≥ 200 U/L, pacientu skaits, %	18 %	38 %	50 %	–
IgM EndoCAb, U/ml	0,33 (0,20; 0,58)	0,40 (0,19; 0,68)	0,52 (0,28; 0,76)	3,72
IgG EndoCAb, U/ml	175,6 (100,1; 295,7)	174,8 (107,2; 263,0)	210,8 (124,4; 331,4)	1,50
Novērotā daudzveidība	101 ^a (41; 155)	109 ^a (75; 143)	175 ^b (145; 210)	26,01***
Šenona indekss	3,78 ^a (2,73; 4,23)	3,75 ^a (3,37; 4,16)	4,53 ^b (4,27; 4,72)	33,91***
Apgrieztais Simpsona indekss	24,1 ^a (9,30; 37,91)	23,5 ^a (13,57; 31,33)	56,6 ^b (48,74; 70,23)	36,74***

ĶMI – ķermeņa masas indekss, ALT – alanīnaminotransferāze, AST – aspartāminotransferāze, CK18-M30 – citokeratīna 18 fragments M30, FIB-4 – aknu fibrozes indekss, LBP – lipopolisaharīdu saistošais proteīns, sCD14 – šķīstošais CD14 receptors, IgM EndoCAb – IgM klases antivielas pret endotoksīnu, IgG EndoCAb – IgG klases antivielas pret endotoksīnu.

a, b – indeksi, kas norāda uz atšķirībām starp grupām.

** –p < 0,01, *** –p < 0,001.

Ētikas komitejas atļauja



Darbojas saskaņā ar SHK LKP noteikumiem

Nr. 6-A/16
05.05.2016.
Rīgā

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas atbalsta fonda
Medicīnisko un biomedicīnisko pētījumu Ētikas komitejas

ATZINUMS

Pētījuma nosaukums : Bioķīmisko apoptozes un fibrozes marķieru un endotoksīnu nozīme imūnsupresējošo RNS vīrusu (HIV, HCV) ierosinātu hronisku infekciju patoģenēze

Pētījuma pieteikuma iesniedzējs: Monta Madelāne

Pētījuma pieteikuma iesniedzēja darba vieta: RSU, doktorants

SIA "Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas" atbalsta fonda Medicīnisko un biomedicīnisko pētījumu Ētikas komiteja (sēdes prot.05/16., 05.05.16.) ir izvērtējusi plānotā zinātniskā pētījuma nozīmi un mērķi, iesniedzēja sniegto paredzamā ieguvuma un riska novērtējumu un tā pamatotību. Balstoties uz iesniegto dokumentu izvērtējumu, komiteja nolēma izteikt:

- pozitīvu atzinumu
- negatīvu atzinumu, ar iespēju veikt izmaiņas un iesniegt pieteikumu atkārtoti
- negatīvu atzinumu

par pieteikuma atbilstību zinātnisko pētījumu ētikas prasībām.

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas atbalsta fonda
Medicīnisko un biomedicīnisko pētījumu
Ētikas komitejas priekšsēdētājs Roberts Stašinskis

RAKUS Zinātnes daļas atzinums

aslimnica
RĪGAS AUSTRUMU KLĪNISKĀ UNIVERSITĀTES SLIMNĪCA

SIA Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca
Reģistrācijas Nr.: 40003951628
Hipokrāta iela 2, Rīga, LV-1038, Latvija
Tālr.: 67 042 400, fakss: 67 042 786
E-pasts: aslimnica@aslimnica.lv, www.aslimnica.lv

ZINĀTNES DAĻA
Linezera iela 6, Rīga, LV-1038, Latvija
Tālr.: 67 040 258, fakss: 67 040 258
E-pasts: zinatne@aslimnica.lv

Pielikums Nr. 5

APSTIPRINĀTS
ar SIA „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” valdes 2014. gada 17. aprīļa lēmumu
Nr. V1/01-01/14/192

Rīgā

2016. gada 8. jūnijā
Nr. AP-94/16-16/88

Rīgas Stradiņa universitātes
studentei
Montai Madelānei

APLIECINĀJUMS PAR STUDIJU DARBA PĒTĪJUMA IZSKATĪŠANU

Zinātnes daļa ir izskatījusi Jūsu iesniegto akadēmiskā pētījuma „*Bioķīmisko apoptozes un fibrozes marķieru un endotoksīnu nozīme imūnsupresējošo RNS vīrusu (HIV, HCV) ierosinātu hronisku infekciju patoģenēzē*” pieteikumu (ar pielikumiem), kas reģistrēts Zinātnes daļā ar numuru AP-94/16, un apstiprina pētījuma veikšanu SIA „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” stacionāros “Gaiļezers”, “Latvijas Infektoloģijas centrs” un “Tuberkulozes un plaušu slimību centrs”.

1. Iesniegums par akadēmiskā pētījuma AP-94/16 veikšanu reģistrēts Zinātnes daļā 2016. gada 6. jūnijā;
2. Ētikas komitejas atzinums izsniegts 2016. gada 5. maijā.

Šis dokuments ir uzrādāms SIA „Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca” medicīnas arhīvā.

Valentīna Sondore

Speciālists akadēmisko pētījumu jautājumos


(paraksts)

Ita Sprukule
67040258
zinatne@aslimnica.lv