



Monta Madelāne

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

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

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes
Nozare – veselības un sporta zinātnes
Apakšnozare – infekcijas slimības

Rīga, 2023



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Monta Madelāne

ORCID 0000-0003-2950-5435

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

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

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – veselības un sporta zinātnes

Apakšnozare – infekcijas slimības

Rīga, 2023

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Infektoloģijas katedrā sadarbībā ar Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcu, Latvijā

Promocijas darba vadītāja:

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

Zinātniskā konsultante:

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

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. profesore **Indra Zeltiņa**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. profesors **Aleksandrs Rapoportis**,
Latvijas Universitāte

Dr. med. profesore **Ligita Jančoriene**,
Viļņas universitāte, Lietuva

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Rīgas Stradiņa universitātes promocijas padomes Veselības un sporta zinātņu promocijas padomes atklātā sēdē 2023. gada 27. jūnijā plkst. 15.00 Hipokrāta auditorijā, Dzirciema ielā 16 un attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<http://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. profesore **Dace Gardovska**

Saturs

Darbā lietotie saīsinājumi	4
Ievads.....	6
1. Materiāli un metodes.....	11
1.1. Pētījuma dizains.....	11
1.2. Materiālu iegūšana un uzglabāšana	12
1.3. Bioķīmisko mikrobu translokācijas un apoptozes parametru noteikšana	13
1.4. Fēču mikrobiotas analīze	14
1.5. Datu apstrādes metodes	16
2. Rezultāti.....	18
2.1. Pacientu raksturojums.....	18
2.2. Bioķīmiskie mikrobu translokācijas, apoptozes un fibrozes marķieri.....	20
2.3. Rādītāju savstarpējās saistības	23
2.3.1. Savstarpējās saistības starp parametriem pacientu grupās.....	24
2.3.2. Parciālās Spīrmena korelācijas kopējā pacientu grupā	26
2.4. Fēču mikrobiotas analīze	28
2.4.1. Fēču mikrobiotas sastāvs	30
2.4.2. Fēču mikrobiotas daudzveidības un bioķīmisko marķieru asociācija	40
3. Diskusija	43
Secinājumi	67
Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu	68
Literatūras saraksts	68
Pateicības	76

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>
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>
FIB-4	aknu fibrozes indekss	<i>Liver fibrosis index</i>
g	paātrinājuma konstante	<i>Acceleration constant</i>
HBV	B hepatīta vīruss	<i>Hepatitis B virus</i>
HCV	C hepatīta vīruss	<i>Hepatitis C virus</i>
HIV	cilvēka imūndeficīta vīruss	<i>Human Immunodeficiency virus</i>
HLA	cilvēka leukocītu 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>
LBP	lipopolisaharīdus saistošais olbaltums	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i>
LPS	lipopolisaharīds	<i>Lipopolysaccharide</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>
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>
RNS	ribonukleīnskābe	<i>Ribonucleic acid</i>
sCD14	šķīstošais CD14	<i>Soluble CD14 (cluster of differentiation)</i>
TNF	audzēja nekrozes faktors	<i>Tumor necrosis factor</i>
U	vienības	<i>Units</i>
μg	mikrogrami	<i>Micrograms</i>
μl	mikrolitri	<i>Microlitres</i>

Ievads

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 atklāti 1,5 miljoni jauni gan HIV, gan HCV gadījumi (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 vērtība 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 HIV inficētiem pacientiem (Morlat et al., 2014; Abutaleb & Sherman, 2018). Ar aknām saistītu komplikāciju risks pacientiem ar hronisku HCV infekciju ir saistīts ar vairākiem faktoriem, 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 iespējama 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 limfoidajos 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 veselīgiem 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

radītājām 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 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). Tādējādi 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 patogēnēzes 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.

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 5 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. Materiāli un metodes

1.1. Pētījuma dizains

Šķērsgriezuma 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 trīs 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 imūnfermatīvo 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 HCV antivielām (imūnfermatīva analīze, *ELISA*) un apstiprināts ar HCV vīrusa kvalitatīvu noteikšanu (HCV RNS) ar polimerāzes ķēdes reakciju reālā laika režīmā vai nosakot HCV *Core Ag* (imūnfermatīva 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 parametri (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).

1.2. Materiālu iegūšana un uzglabāšana

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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā. Ar mikrobu translokāciju saistītie parametri tika testēti atsaldētos plazmas vai seruma paraugos, atbilstoši ražotāju rekomendācijām.

Fēču paraugu iegūšana un uzglabāšana. Hospitalizētiem pacientiem fēču paraugi tika iegūti, izmantojot sterilus trauciņus fēču savākšanai, un pēc to iegūšanas tika uzreiz nogādāti laboratorijā, kur sasaldēti $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā līdz tālākai izmeklēšanai.

Ambulatoriem pacientiem fēces tika iegūtas pašsavākšanas ceļā, izmantojot sterilus trauciņus fēču savākšanai. Fēces tika nogādātas laboratorijā stundas laikā, kur uzreiz tika sasaldētas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā un uzglabātas līdz tālākai izmeklēšanai.

1.3. Bioķīmisko mikrobu translokācijas un apoptozes parametru noteikšana

Lipopolisaharīdu saistošā olbaltuma noteikšana. Lipopolisaharīdu saistošā olbaltuma (LBP) līmeni noteica ar *Human LBP (Lipopolysaccharide binding protein) ELISA* (Hycult Biotech, Nīderlande) reaģentu komplektu cilvēka LBP kvantitatīvai noteikšanai serumā. Analīzei izmantoja asins serumu, kas tika iegūts, centrifugējot venozās asinis (1500 apgriezieni / minūtē) 20 minūšu laikā istabas temperatūrā. Līdz testa noteikšanai visi asins seruma paraugi tika sasaldēti $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā.

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.

sCD14 noteikšana. sCD14 līmeni asins serumā noteica ar cietās fāzes imūnfermentatīvo metodi (*Quantikine ELISA Human CD14 Immunoassay, R7D Systems, ASV*). Analīzei tika izmantots asins serums, ko ieguva, centrifugējot venozās asinis ($1500 \times g$) 20 minūšu laikā istabas temperatūrā. Līdz testa noteikšanai visi asins seruma paraugi tika sasaldēti -80°C temperatūrā.

CK18-M30 noteikšana. CK18-M30 rodas epitēlijaudu apoptozes rezultātā no epitēlijaudu starpfilamenta CK18, aktivizējoties kaspāzei -3 , -7 vai -9 . CK18-M30 daudzumu pacientu asins serumā noteica 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.

1.4. Fēču mikrobiotas analīze

Baktēriju frakcijas iegūšana no fēču paraugiem. Kopējās fēču mikrobiotas DNS ieguva, izmantojot *FastDNA Spin Kit for Soil* un *FastPrep-2 (MP Biomedicals, ASV)* ierīci, saskaņā ar ražotāja protokolu.

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.

16S rRNS gēna amplikonu sagatavošana un sekvenčšana. Mikrobiotas analīzei jeb baktēriju taksonomiskā sastāva noteikšanai tika izmantota 16S ribosomālā RNS (rRNS) gēna hipervariabla reģionu sekvenčšanas metode. 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 (1.1. tabula).

1.1. 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	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	20	Apprill et al., 2015

Sekvencēšanas bibliotēku jeb indeksēto sekvencējamo amplikonu kopas iegūšanai tika izmantota divu soļu amplifikācijas metode.

Polimerāzes ķēdes reakcijā (PĶR) 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.

Attīrītie pirmā PĶR fragmenti tika izmantoti otrā soļa PĶR jeb sekvencēšanas adapteru un indeksu pievienošanas reakcijā, kur tika izmantotas *Illumina Nextera XT2* kombinatorās indeksu sekvenses (*Illumina*, ASV).

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 pārrotiem lasījumiem (2×300 cikli) uz *Illumina MiSeq*, izmantojot v3 600 ciklu reaģentu komplektu (*Illumina*, ASV).

Sekvenču analīze. Sekvencēšanā iegūtie jēldati tika demultipleksēti un attīrīti no indeksiem un adapteriem ar *cutadapt* un *fastp*. Iegūtos datus mikrobiotas analīzei apstrādāja, izmantojot “R” programmatūru (versija 4.2.1.). Lasījumu pirmapstrādi veica ar *DADA2* pakotni (versija 1.16) (Callahan et al., 2016). Sapludināto nolasījumu pārus attīrīja no himēriskām sekvencēm, iegūstot sekvenču amplikonu variantus, kam 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 sekvenču variantiem ar atpazītu taksonomisko piederību, izmantojot *decontam* (versija 1.12.0) pakotni, tika izņemti visi lasījumi, kas tika atrasti negatīvajās kontrolēs.

1.5. Datu apstrādes 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 brīvpiecejas programmā (*JASP 0.16.3 for Windows*).

Fēču mikrobioma 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.

2. Rezultāti

2.1. 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 dalīti trijās grupās: HIV monoinfekcijas 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 (2.1. tabula).

2.1. tabula

Atšķirības starp HIV monoinficēto un HIV / HCV koinficēto 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 %	–

2.1. tabulas turpinājums

Parametri	Grupas		Manna–Vitnija U tests
	HIV (n = 28)	HIV / HCV (n = 29)	
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 monoinfekciju 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 / μl tika konstatēts 75 % pacientu HIV monoinficēto grupā un 66 % pacientu HIV / HCV koinficēto 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, pacienti ar HCV arī 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. Atšķirības starp grupām detalizētāk tiks izskatītas tālāk, grupējot parametrus rutīnas klīniskajos rādītājos (leikocītu, eritrocītu, trombocītu skaits, ALT, AST, KMI), 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. Savukārt atšķirību nebija starp grupām leikocītu un trombocītu skaitā.

Ķermeņa masas indekss 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 ĶMI atšķirības.

Pacientiem ar HCV infekciju bija augstāks eritrocītu skaits un hemoglobīna līmenis nekā pacientiem ar HIV mono un HIV / HCV koinfekciju. Pacientiem ar HCV infekciju bija augstāks arī ALT rādītājs nekā pacientiem ar HIV mono un HIV / HCV koinfekciju. AST rādītājs 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.

2.2. Bioķīmiskie mikrobu translokācijas, apoptozes un fibrozes marķieri

Analizējot mikrobu translokācijas marķierus, statistiski nozīmīgu atšķirību konstatēja tikai LBP līmenim (2.2. tabula).

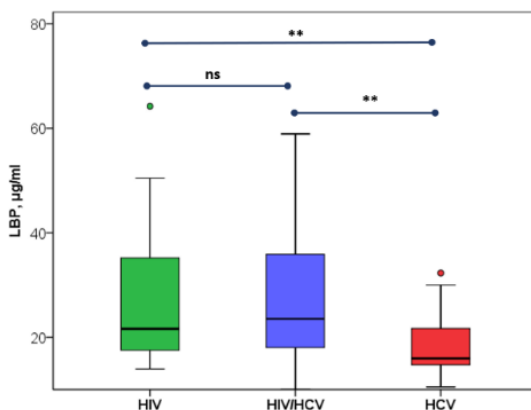
**Atšķirības mikrobu translokācijas marķeros pacientiem
ar HIV monoinfekciju, HIV / HCV koinfekciju un HCV monoinfekciju**

Parametri	Grupas			Krus- kala- Valisa tests
	HIV (n = 28)	HIV/HCV (n = 29)	HCV (n = 24)	
	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	Mediāna (IQR)	H
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
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 neatšķirās starp HIV mono un HIV / HCV koinficēto pacientu grupām (2.1. attēls).



2.1. 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.

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

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 netika konstatētas.

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.

FIB-4 indeksā atšķirības starp grupām netika konstatētas, 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. 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.

2.3. Rādītāju savstarpējās saistības

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

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 ($r_s = 0,43$, $p < 0,001$).

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 minētajām korelācijām leukocītu 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 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 ($r_s = -0,64$, $p < 0,001$).

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 $r_s = -0,37$, $p < 0,001$).

2.3.1. Savstarpējas saistības starp parametriem pacientu grupās

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 ($r_s = 0,55$, $p < 0,01$) (2.3. tabula).

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 ($r_s = -0,38$, $p < 0,05$).

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 vīrusu 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.

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

HIV/HCV koinficēto pacientu grupā tika 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 ($r_s = 0,49$, $p < 0,01$).

HCV pacientu grupā tika 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 ($r_s = -0,47$, $p < 0,05$).

2.3.2. 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 (2.4. 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. Šēnona 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 $p < 0,05$  Negatīva korelācija ar $p < 0,05$ 

Pozitīva korelācija ar $p < 0,01$  Negatīva korelācija ar $p < 0,01$ 

Pozitīva korelācija ar $p < 0,001$  Negatīva korelācija ar $p < 0,001$ 

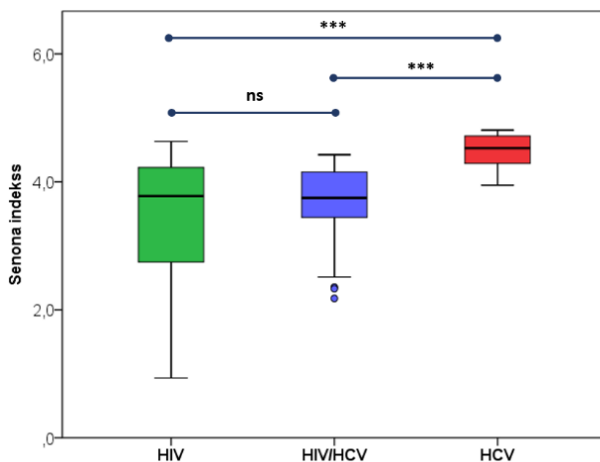
Ņemot vērā darba uzdevumu, kas paredz noteikt fēču mikrobiotas savstarpējo saikni ar mikrobu translokācijas marķieriem un aknu fibrozes rādītājiem, tika skatītas arī saistības starp Šenona indeksu un citiem rādītājiem. Baktēriju daudzums fēču paraugā (Šenona indekss) ir pozitīvi saistīts ar pacienta KMI ($r_s = 0,28$, $p < 0,05$), 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: leukocītiem ($r_s = -0,35$, $p < 0,01$), eritrocītiem ($r_s = -0,30$, $p < 0,01$) un hemoglobīnu ($r_s = -0,42$, $p < 0,001$).

2.4. Fēču mikrobiotas analīze

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, salīdzinot ar HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, bet netika konstatētas atšķirības starp HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem.

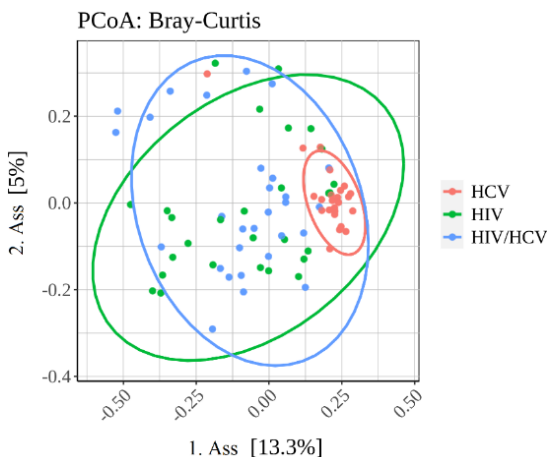
Līdzīgi rezultāti tika konstatēti Šenona indeksa (2.2. attēls) un apgrieztā Simpsona indeksa lielumos. HCV monoinficētiem pacientiem tie bija augstāki nekā pacientiem ar HIV monoinfēciju un HIV / HCV koinfēciju, bet netika konstatētas atšķirības baktēriju gēnu daudzveidībā starp HIV monoinficētiem un koinficētiem ar HCV pacientiem.



2.2. attēls. Atšķirības starp grupām Šenona 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 veidoja atšķirīgu klasteri, ko apstiprināja permutācijas daudzfaktoru ANOVA ($p = 0,001$). HIV pacientiem neatkarīgi no HCV klātbūtnes nevēroja atsevišķu specifisku fēču mikrobiotas sastāva klasteru veidošanos (2.3. attēls).



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

2.4.1. Fēču mikrobiotas sastāvs

Fēču paraugos kopā tika konstatēta 1651 taksonomiskā vienība, kas 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*.

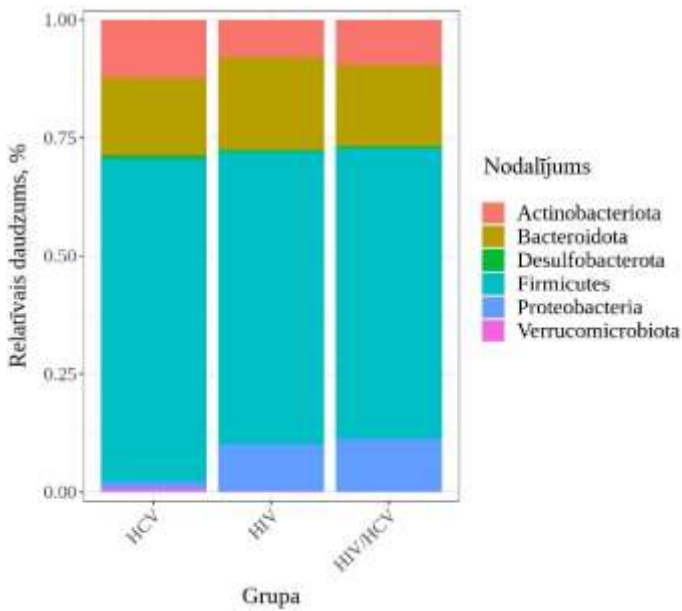
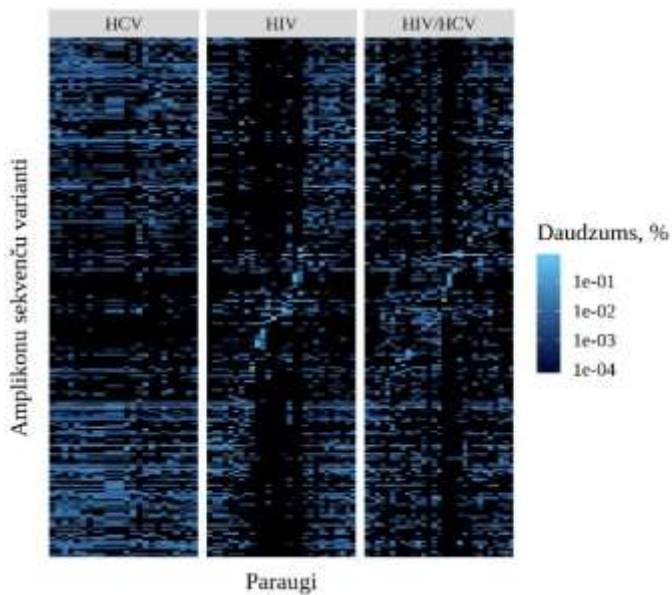
Lai izvērtētu baktēriju sastāva atšķirības, tika veikta taksonomisko vienību analīze pētījuma grupās, apskatot atšķirības baktēriju relatīvajā daudzumā nodalījumu, klašu, rindas un dzimšu līmenī (Cavalier-Smith, 1998).

Nodalījumu līmenī visās pētījuma grupās dominēja šādi baktēriju nodalījumi: *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota* un *Proteobacteria*, turklāt *Firmicutes* relatīvie daudzumi aizņēma vairāk nekā 50 % no visām baktēriju sekvencēm, to mediānas [IQR – starpkvartiļu amplitūda] HCV monoinficētiem bija 66,2 % [63,3–73,6 %], HIV monoinficētiem

62,8 % [53,6–71,6 %] un HIV / HCV koinfēcītiem 64,4 % [51,4–72,9 %] no kopējā baktēriju relatīvā daudzuma.

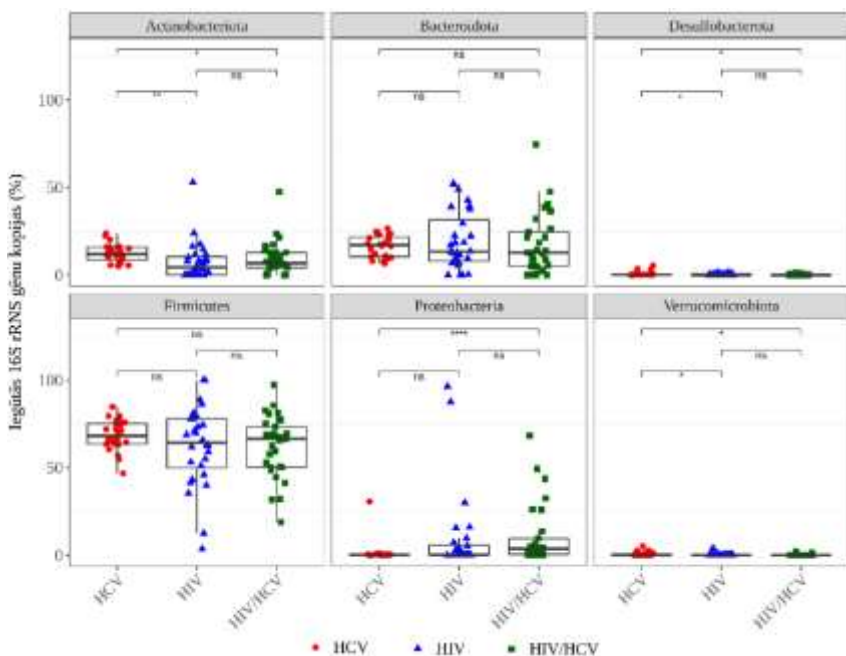
HCV monoinfēcītiem pacientiem tika atrastas *Bacteroidota* 17,9 % [13,4–22,9 %], *Actinobacteriota* 10,2 % [7,1–13,2 %] un *Proteobacteria* 0,8 % [0,57–1,8 %]. HIV moninfēcītiem: *Bacteroidota* 17 % [11,5–25,9 %], *Actinobacteriota* 4,5 % [0,3–9,1 %], *Proteobacteria* 0,8 % [0,1–7,3 %], savukārt HIV / HCV koinfēcītiem pacientiem: *Bacteroidota* 15,4 % [7,1–26,6 %], *Actinobacteriota* 6,9 % [3,9–10,8 %] un *Proteobacteria* 3,1 % [0,7–9,3 %] (2.4. attēls).

Firmicutes-Bacteroidota attiecība statistiski nozīmīgi neatšķīrās starp grupām.



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

Dominējošo nodaļumu līmenī *Firmicutes* un *Bacteriodata* relatīvie daudzumi būtiski neatšķīrās 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 neatšķīrās starp HIV mono un HIV / HCV koinficētiem pacientiem. *Verrucomicrobiota* nodaļuma 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 neatšķīrās starp HIV mono 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 mono un koinficētiem ar HCV pacientiem. Nozīmīgi lielākus relatīvos daudzumus HIV / HCV koinficēto grupā, salīdzinot ar HCV monoinficētiem pacientiem, novēroja *Proteobacteria* ($p < 0,0001$) nodaļuma baktērijām (2.5. attēls).

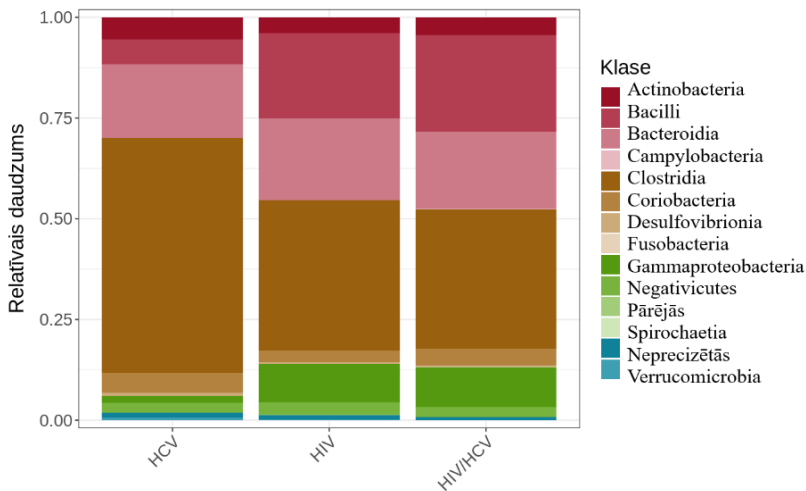


2.5. attēls. Atšķirības starp grupām
baktēriju nodalījumu relatīvajos daudzumos

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

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 %] (2.6. attēls).



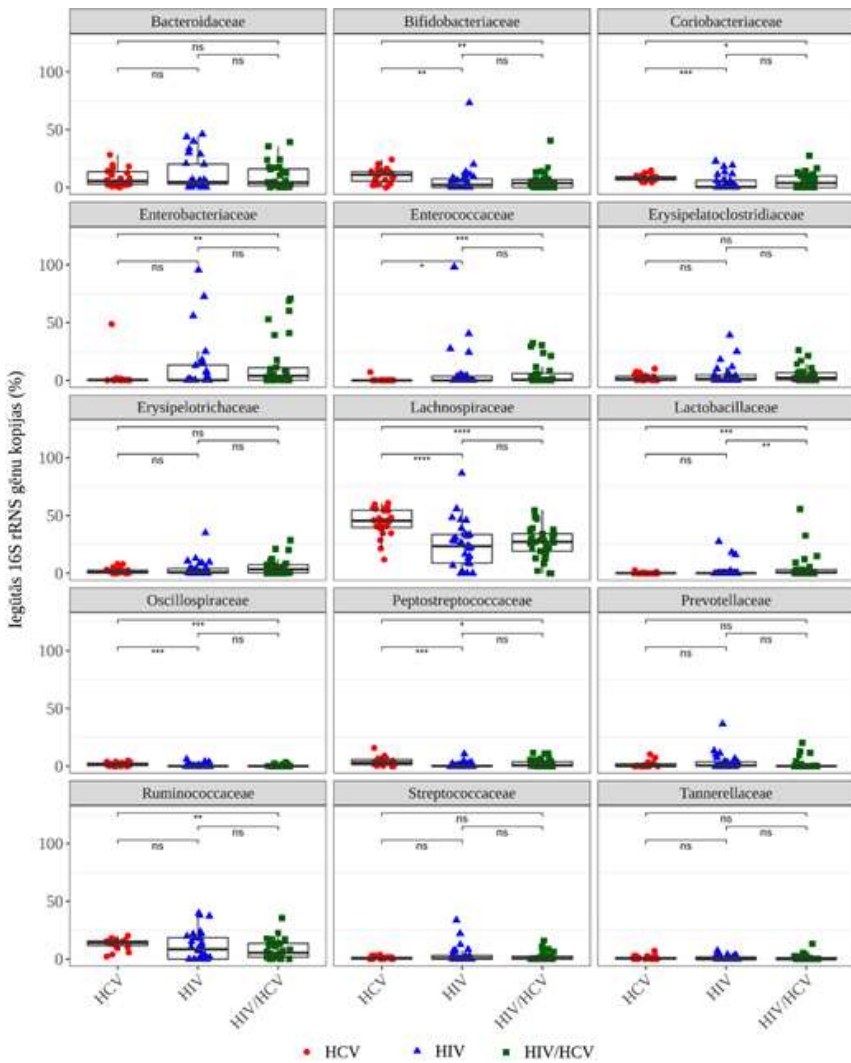
2.6. attēls. Atšķirības starp grupām baktēriju klašu relatīvajos daudzumos

Atšķirības starp klasēm relatīvajos daudzumos netika konstatētas *Bacteroidia* klasē. 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 *Desulfivibrionia* atšķirās starp HCV un HIV un HCV un HIV / HCV inficētiem pacientiem ($p < 0,05$).

Baktēriju **dzimšu** 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 %].

Atšķirības starp grupām relatīvajos daudzumos nenovēroja *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Streptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae* un *Tannerellaceae* dzimtām (2.7. 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 uzrādīja līdzīgus rezultātus – to daudzumi bija mazāki HIV / HCV koinficētiem un HIV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HCV monoinficētiem: *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.



2.7. 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 tika novērotas atšķirības starp grupām. HCV monoinficēto grupā mazāki 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* – ar 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, novērota: *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 ($p < 0,001$).

2.4.2. Fēču mikrobiotas daudzveidības un bioķīmisko marķieru asociācija

Tika veikta korelāciju analīze, lai novērtētu atsevišķu baktēriju klašu savstarpējās saistības ar mikrobu translokācijas un aknu fibrozes parametriem pētījuma grupās. CD4⁺, CD 8⁺ T limfocītu un HIV RNS korelācijas tika skatītas tikai HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem (2.8. attēls). Analīzei tika izvēlēts klašu līmenis, lai labāk varētu izvērtēt iespējamās korelācijas un lai mazinātos datu sadrumstalotība. Analīzei izmantoja Spīrmena korelāciju testu.

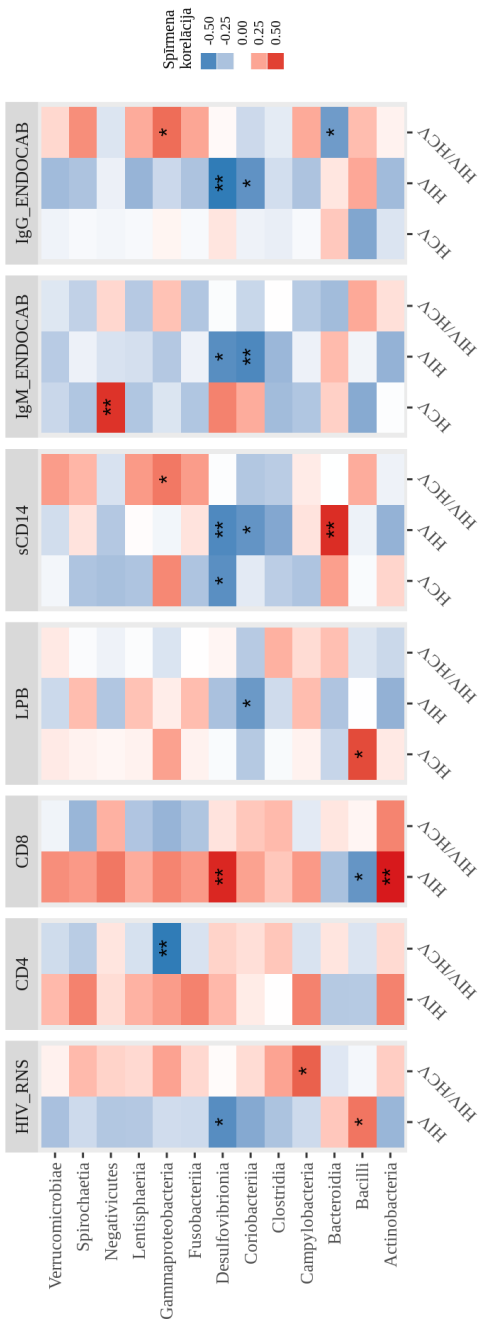
***Actinobacteriota* nodalījuma baktēriju klasēs** konstatēja šādas korelācijas: *Actinobacteria* klase pozitīvi korelēja ar CD8⁺ T limfocītu skaitu HIV pacientiem ($r_s=0,560$, $p<0,01$), savukārt *Coriobacteriia* klase HIV pacientiem uzrādīja negatīvas korelācijas ar LBP ($r_s=-0,426$, $p<0,05$), sCD14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

***Bacteroidota* 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 ($r_s = 0,471$, $p < 0,01$).



2.8. attēls. Bakteriju klašu, HIV infekcijas raksturojošo lielumu un mikrobu translokācijas parametru Spārmēna korelācijas starp pētījuma grupām

HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss, HCV – C hepatīta vīruss, HIV RNS – HIV slodze, CD4 – CD4⁺ T limfocīti, CD8 – CD8⁺ T limfocīti, EndoCAB IgG – IgG antivielas pret endotoksīna serdi, IgM EndoCAB – IgM antivielas pret endotoksīna serdi,

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

3. 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, 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 mūsu 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). Pētījumos mikrobu translokācijas noteikšanai ir izmantots arī LPS jeb endotoksīnu daudzums perifērājās 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 (Brechley, Price & 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, Fernandez Gutierrez del Alamo & Giron-Gonzalez et al., 2016).

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** radītājos, tomēr to mediānas bija lielākas abās ar 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 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. Ar 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/μl (*Balagopal et al., 2008*). *Villanueva-Millan* ar kolēģiem salīdzināja HIV inficētus pacientus, kuri izmantoja vai neizmantoja antivirālo terapiju, ar veselīgiem cilvēkiem un konstatēja, ka sCD14 ir lielāks 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 veselīgiem 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 antivirālas terapijas (*Sandler et al., 2011; Villanueva-Millan et al., 2017*). Tas var liecināt par pastāvīgu imūno aktivāciju, neskatoties uz 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 HIV inficēto pacientu grupā, salīdzinot ar veseliem 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 mono, gan koinficētiem) un HCV inficētiem pacientiem. 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 izvirzītajai 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 veseliem cilvēkiem, bet HIV/HCV koinficētiem neatšķīrās no HIV monoinficētiem pacientiem (Marquez, Fernandez Gutierrez del Alamo & Giron-Gonzalez, 2016; 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 nozīme pētīta arī saistībā ar HIV un HCV infekciju iznākumu pat ārstētu pacientu grupās. Tā *Sandler* ar kolēģiem pierādīja, ka sCD14 korelē ar tādiem 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 ar IL-6 un TNF- α , tādējādi apstiprinot, ka, pieaugot imūnsupresijas dziļumam un palielinoties HIV RNS daudzumam asinīs, palielinās mikrobu translokācija un arī imūnā aktivācija. Turklāt, vērojot šos pacientus dinamikā, konstatēja, ka HIV pacientiem ar augstākiem sCD14 rādītājiem risks slimības progresīvai 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**. Pētījumā netika konstatētas 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* ar kolēģiem 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**, tika konstatēts, 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* ar kolēģiem, 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 tika novērota 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, t. i., sasniedzot līmeni (atbilstoši noteiktajām CK18-M30 testa ražotāja rekomendācijām), 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 augstāki bija HCV monoinficētiem pacientiem, un, lai arī nerasniedza statistisku ticamību, trombocītu skaits bija zemāks HIV / HCV koinficēto pacientu grupā. Tā kā mūsu pētījumā kā izslēgšanas kritēriji bija citas aknu un metabolās slimības, var izteikt apgalvojumu, ka 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.

Interesanta savstarpēja saistība starp CK18-M30 un mikrobu translokācijas marķieriem tika konstatēta 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 balsīt arī uz saistību starp CK18- M30 un IgM EndoCAb, izmantojot parciālās korelācijas koeficientu. Savukārt šo korelāciju esamību tikai HCV monoinficēto grupā daļēji var izskaidrot ar mazāk izteikto mikrobu translokāciju, salīdzinot ar HIV inficētiem pacientiem. Tomēr šādu apgalvojumu būtu pārāgrī 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 attiecībā uz atšķirībām 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 salīdzinošu datu, kā 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 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 a 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 a daudzveidība gan HIV, gan HCV monoinficētiem pacientiem, tomēr kopumā pētījumu secinājumi šobrīd ir konfliktējoši.

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* ar kolēģiem nekonstatēja atšķirības a daudzveidībā starp HCV un HIV / HCV inficēto grupām (Chuaypen et al., 2020), bet *Taylor* un kolēģi konstatēja zemāku a 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, a 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 eiropēdās 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 a 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 nozīmi 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 veselīgiem 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* ar kolēģiem konstatēja atšķirības β daudzveidībā gan starp HIV monoinficētiem un HIV / HCV koinficētiem pacientiem, gan arī starp veselīgiem cilvēkiem (Taylor et al., 2020). Abos šajos pētījumos novēroja atšķirības starp veselīgiem cilvēkiem un inficētiem, kas parāda HIV un HCV vīrusu nozīmīgu 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 nebija informatīva, 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*, līdzīgi citu pētnieku darbiem (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. *Desulfobacteriota* 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*, *Peptospteoceae* 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 HIV inficētiem pacientiem samazinās, ir aprakstīta loma kopējā zarnu veselības uzturēšanā, kā arī tās piedalās butirāta 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* dzimtu 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. 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, 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, kā, 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 inficētie pacienti tika salīdzināti savstarpēji, nevis ar veseliem cilvēkiem, kas vismaz daļēji var 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 iepriekš minēts, mūsu pētījumā bija lielāks HCV monoinficētiem pacientiem, salīdzinot ar HIV monoinficētiem, bet ne ar HIV / HCV koinficētiem. 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 neatšķirās 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 atklāta 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 – lielāku šo baktēriju daudzumu HCV monoinficētiem, salīdzinot ar HIV mono un koinficētiem pacientiem, bet nebija atšķirības HIV inficēto pacientu grupās, lai arī šīs baktērijās 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 HIV inficētiem pacientiem, 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* un kolēģi konstatēja gan *Desulfobacteriaceae* dzimtas pieaugumu, gan arī vienas *Desulfovibrio* sugas samazinājumu ar HIV inficētiem, ART saņēmušiem pacientiem (Villanueva-Millan et al., 2017). *Desulfovibrio* baktērijās 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, kas ļauj saglabāt gļotādas integritāti, kā arī inhibē mikrobiotas biofilmu patoloģisku fragmentēšanos (Buret et al., 2022).

HCV pacientiem arī iepriekš 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 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 HIV inficēto grupās, tomēr statistisku ticamību tie nesasniedza. Savukārt **mazākus** relatīvos daudzumus 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 pārsvarā mikrobiotas pētījumos tiek izmantota vienāda metodoloģija, nosakot mikrobiotu ar 16S rRNS metodi, atsevišķas nesakritības var tikt skaidrotas ar dažādiem faktoriem, 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. Tāpat 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, bet šīs korelācijas izzuda atsevišķās pētījuma grupās, arī 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 tika konstatēti lielāki atsevišķu šīs klases baktēriju dzimšu relatīvie daudzumi, 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 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 **Desulfivibrionia** 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**. **Desulfivibrionia** 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

aprakstīja lielāku daudzumu *Desulfovibrio* baktēriju HIV inficētiem pacientiem, salīdzinot ar veselīgiem 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, šīs klases relatīvie daudzumi negatīvi korelēja gan ar HIV RNS daudzumu asinīs, gan ar mikrobu translokācijas marķieriem, bet tikai HIV monoinficētiem pacientiem. Šāda saikne netika novērota HCV monoinficētiem pacientiem. Līdz ar to var secināt, ka *Desulfobacteriota* 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 *Desulfibrionia* klases baktērijas potenciē 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 *Desulfivibrionia* 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 veselīgiem 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, varam 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, kā, 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 ĶMI, salīdzinot ar HIV pozitīvajiem pacientiem. Palielināts ĶMI 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, 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 gēnu 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, G., 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 cyokeratin 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, G., 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, G., 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: P19. (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 monoinfekciju un koinfekciju ar VHC. In: *Rīgas Stradiņa universitātes 2017. gada zinātniskā konference*, Rīga, Latvija, 2017, tēžu grāmata: 22. (Mutisks referāts).

Literatūras saraksts

1. 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.
2. Abutaleb, A., Sherman, K.E. 2018. A changing paradigm: management and treatment of the HCV/HIV co-infected patient. *Hepatology International*. 12, 500–509.
3. 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.
4. 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.].
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Blackard, J. T., Welge, J. A., Taylor, L. E., Mayer, K. H. et al. 2011. HIV mono-infection is associated with FIB-4 – a noninvasive index of liver fibrosis-in women. *Clinical Infectious Diseases*. 52, 674–680.
9. Brenchley, J. M., Price, D. A., Douek, D. C. 2006. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature Immunology*. 7, 235–239.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews*. 73 (3), 203–266.
15. Chuaypen, N., Chittmittrapap, S., Avihingsanon, A., Tangkijvanich, P. et al. 2020. Gut microbiota composition is difference between HCV mono-infection and HCV/HIV co-infection. Poster presentation abstract. *Journal of Hepatology*. 73, S239.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Lopez-Cortes, 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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. Iegüts no: doi.org/10.1371/journal.pone.0032028 [skatīts 02.07.2022.].
36. Marchetti, G., Tincati, C., Silvestri, G. 2013. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clinical Microbiology Reviews*. 26, 2–18.
37. 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.

38. 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. Iegüts no: doi: 10.1186/2049-2618-1-26 [skafīts 30.07.2023.].
39. 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 / HCV coinfecting patients with advanced cirrhosis: a cohort study. *Frontiers in Medicine*. 8. Iegüts no: doi.org/10.3389/fmed.2021.615342 [skafīts 02.07.2022.].
40. 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.
41. 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. Iegüts no: doi.org/10.1186/s12879-021-06260-y [skafīts 03.07.2022.].
42. Mingjun, Z., Fei, M., Zhou, 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.
43. 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.
44. 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. Iegüts no: doi:10.1371/journal.ppat.1003829 [skafīts 03.07.2022.].
45. 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.
46. 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.
47. Nystrom, J., Stenkvist, J., Haggbloom, 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. Iegüts no: doi: 10.1371/journal.pone.0118643 [skafīts 05.07.2022.].
48. 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). Iegüts no: doi: 10.1186/s12981-020-00273-4 [skafīts 05.07.2022.].

49. 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.
50. 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.
51. 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.].
52. 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-coinfected individuals. *Antiviral Therapy*. 19 (2), 149–159.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Sandler, N. G., Douek, D. C. 2012. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nature Reviews Microbiology*. 10, 655–666.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.].

62. 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.].
63. UNAIDS. Iegūts no: <https://www.unaids.org/en> [skatīts 05.08.2022.].
64. Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Wegner Parfrey, L., Knight, R. 2012. Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*. 70 (1), S38–S44.
65. 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.
66. 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.
67. 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.].
68. World Health organization. Iegūts no: <https://www.who.int/> [skatīts 20.07.2022.].
69. Zilberman-Schapira, G., Zmora, N., Itav, S., Bashardes, 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.].

Pateicības

Vislielākā pateicība manai darba vadītājai *Dr. habil. med.* profesorei **Ludmilai Vīksnai** 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.