

Virološki i imunološki parametri u infekciji virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1

Rimac, Hrvoje

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:323908>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Hrvoje Rimac

**Virološki i imunološki parametri u infekciji virusom
ljudske imunodeficijencije tipa 1**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Kliničkoj bolnici za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Snježane Židovec-Lepej. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Prije svega, posebno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. Dr. sc. Snježani Židovec-Lepej na iskazanom povjerenju, pruženoj pomoći te uloženom trudu i vremenu tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama na pruženoj podršci i pomoći te na mnogobrojnim zajedničkim lijepim trenucima tijekom zadnjih pet godina.

Na kraju, najviše se zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i ljubavi od upisa na preddiplomski studij pa sve do završetka diplomskog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

VIROLOŠKI I IMUNOLOŠKI PARAMETRI U INKFEKCIJI VIRUSOM LJUDSKE IMUNODEFICIJENCIJE TIPA 1

Hrvoje Rimac

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Ciljevi ovog istraživanja bili su analiza imunostog statusa i kinetike virusne replikacije u osoba kojima je zaraza virusom ljudske imunodeficijencije (HIV) otkrivena u Hrvatskoj u razdoblju od 2014. do 2017. g. te usporedba dobivenih rezultata podacima iz 2020. g. Također su istražene potencijalne razlike u broju slučajeva kasne prezentacije u skrb i uznapredovale HIV infekcije u promatranim vremenskim intervalima te su analizirani dodatni parametri stanične imunosti i njihova moguća povezanost s kinetikom virusne replikacije. Jednosmjerna analiza varijance i Bonferroni post-hoc test pokazali su statistički značajno veće srednje vrijednosti apsolutnog broja i postotka CD4+ T-limfocita kod osoba s otkrivenom zarazom HIV-om u 2020. g. u odnosu na osobe kojima je zaraza otkrivena 2016. i 2017. g. Hi kvadrat test pokazao je statistički značajnu razliku u broju ispitanika s uznapredovalom HIV bolešću u trenutku dijagnoze tijekom promatranog vremenskog razdoblja, a pacijenti kojima je zaraza otkrivena 2015. i 2020. godine pokazali su najniže vrijednosti postotka ispitanika s kasnom i jako kasnom prezentacijom u skrb. Analizom dodatnih imunoloških parametara u odnosu na referentne vrijednosti utvrđene su i povišene srednje vrijednosti postotka CD8+ T-limfocita, CD8+/CD38+ T-limfocita i postotka aktiviranih T-limfocita kao i omjera CD8+ i CD4+ T-limfocita. Rezultati ovog rada pokazuju da je tijekom 2020. g. zaraza HIV-om u većine ispitanika otkrivena prije nastanka značajne deficijencije stanične imunosti. Dodatne analize imunološkog statusa pokazale su značajnu aktivaciju stanične imunosti u HIV-om zaraženih osoba.

(34 stranice, 7 slika, 7 tablica, 61 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: HIV-1, Broj CD4+ T-limfocita, viremija, kasna prezentacija, imunopatogeneza

Voditelj: dr. sc. Snježana Židovec-Lepej, docent
Ocjenitelji: dr. sc. Snježana Židovec-Lepej, docent
dr. sc. Petra Peharec Štefanić, izvanredni profesor
dr. sc. Jasna Lajtner, izvanredni profesor

Rad prihvaćen: 25.11.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

VIROLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 INFECTION

Hrvoje Rimac

Rooseveltovej trg 6, 10 000 Zagreb

Aims of this study were to analyze the immune status and kinetics of viral replication in individuals diagnosed with human immunodeficiency virus (HIV) in Croatia in the period from 2014 to 2017 and to compare the results with data from 2020. Potential differences in the number of cases of late presentation to HIV care and cases of advanced HIV infection in the observed time intervals were also investigated and additional parameters of cellular immunity and their possible connection with the kinetics of viral replication were analyzed. One-way analysis of variance and Bonferroni post-hoc test showed statistically significantly higher mean values of absolute number and percentage of CD4 + T-lymphocytes in individuals diagnosed with HIV in 2020 compared to people diagnosed with infection in 2016 and 2017. The Chi square test showed a statistically significant difference in the number of cases with advanced HIV disease at the time of diagnosis during the observed time period and patients diagnosed with the HIV infection in 2015 and 2020 showed the lowest percentages with late and very late presentation to care. The analysis of additional immunological parameters in relation to the reference values revealed elevated mean values of the percentage of CD8 + T-lymphocytes, CD8+/CD38+ T-lymphocytes and the percentage of activated T-lymphocytes as well as the ratio of CD8+ and CD4+ T-lymphocytes. The results of this research show that the most cases of HIV infection diagnosed in 2020. were detected before the onset of significant cellular immunity deficiency. Additional analyzes of immune status showed significant activation of cellular immunity in HIV-infected individuals.

(34 pages, 7 figures, 7 tables, 61 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Keywords: HIV-1, CD4+ T-lymphocyte count, viremia, late presentation, immunopathogenesis

Supervisor: Snježana Židovec-Lepej, PhD, Assistant Professor

Reviewers: Snježana Židovec-Lepej, PhD, Assistant Professor

Petra Peharec Štefanić, PhD, Associate Professor

Jasna Lajtner, PhD, Associate Professor

Thesis accepted: November 25, 2021.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Virus ljudske imunodeficijencije tipa 1 | 1 |
| 1.2. Genom i struktura virusne čestice HIV-a tipa 1 | 1 |
| 1.3. Replikacijski ciklus HIV-a 1 | 3 |
| 1.4. Imunopatogeneza infekcije HIV-om tipa 1 | 5 |
| 1.5. Dijagnoza HIV-1 infekcije u kasnoj simptomatskoj fazi bolesti: biološki mehanizmi i biomedicinsko značenje..... | 8 |
| 1.6. Antiretrovirusno liječenje | 9 |
| 1.7. Epidemiologija HIV-1 infekcije i globalna strategija usmjerena na otkrivanje zaraze HIV-om..... | 10 |
| 2. CILJEVI RADA..... | 11 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 12 |
| 3.1. Ispitanici i dizajn istraživanja | 12 |
| 3.2. Definicije i varijable | 12 |
| 3.3. Obrada podataka | 13 |
| 4. REZULTATI..... | 14 |
| 5. RASPRAVA | 22 |
| 6. ZAKLJUČAK | 27 |
| 7. LITERATURA | 28 |
| 8. ŽIVOTOPIS | 34 |

1. UVOD

1.1. Virus ljudske imunodeficijencije tipa 1

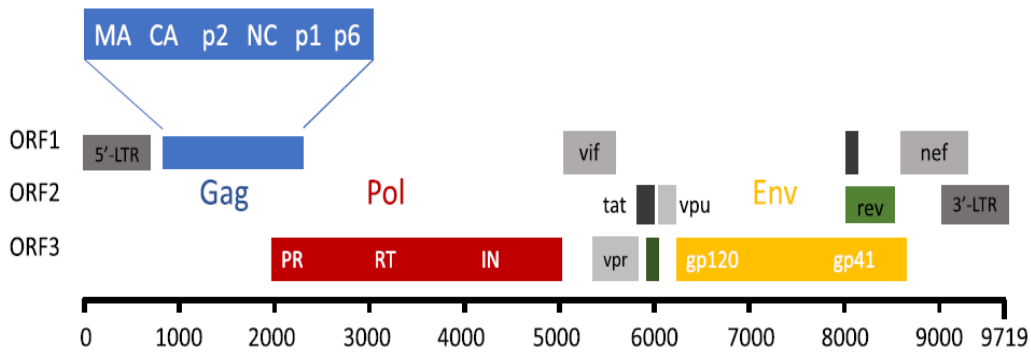
Krajem dvadesetog stoljeća virus ljudske imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) privukao je svjetsku pozornost nakon pojavljivanja uznapredovale i neobjašnjive imunodeficijencije kod muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima u urbanim središtima SAD-a (Deeks i sur. 2015). Dvije godine nakon prvog izvješća o bolesti koju danas nazivamo sindromom stečene imunodeficijencije (AIDS od engl. *acquired immunodeficiency syndrome*), znanstvenici s Instituta Pasteur u Parizu otkrili su da je HIV-1 uzročnik AIDS-a (Barre-Sinoussi i sur. 1983). HIV-1 je danas proširen u cijelom svijetu te predstavlja iznimno ozbiljan javnozdravstveni problem na globalnoj razini s više od 37,6 milijuna zaraženih osoba (UNAIDS 2020). Rijetke su bolesti u povijesti medicine uzrokovale takve posljedice na zdravlje pojedinca, ali i toliku društvenu stigmatizaciju, kao što je to infekcija HIV-om.

Virus HIV pripada rodu *Lentivirus*, potporodici *Orthoretrovirinae* i porodici *Retroviridae* (<https://talk.ictvonline.org>). Lentivirusi se još nazivaju i „sporim“ virusima jer je tijekom infekcije ovim virusima karakteriziran dugim razdobljem između početne zaraze i pojave ozbiljnih simptoma (Nyamweya i sur. 2013). HIV se klasificira u tipove 1 i 2 na temelju genskih obilježja, a oni se dalje dijele na skupine, podtipove i rekombinantne oblike (Beloukas i sur. 2016). Većina infekcija HIV-om tipa 1 u svijetu uzrokovana je virusima iz skupine M koja obuhvaća 10 podtipova (A-D, F-H, J, K i L) i 98 cirkulirajućih rekombinantnih oblika. HIV-1 podtipovi su vrlo raznoliko globalno distribuirani, ali podtip B je najzastupljeniji u srednoj i zapadnoj Europi te je odgovoran za 85% novih slučajeva zaraze HIV-om na tom području (Giovanetti i sur. 2020; Oroz i sur. 2019).

1.2. Genom i struktura virusne čestice HIV-a tipa 1

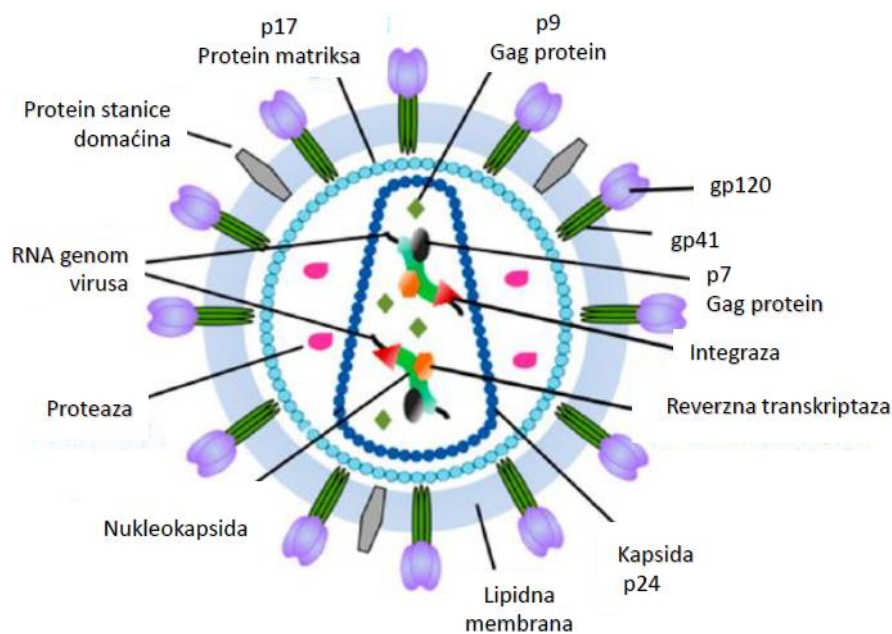
Genom HIV-a tipa 1 je mali RNA genom veličine 9,7 kb (Slika 1) (Cervera i sur. 2019). Genom provirusa HIV-a nastaje procesima reverzne transkripcije virusne RNA u DNA, degradacijom RNA te umetanjem dvolančane virusne DNA u ljudski genom (German Advisory Committee Blood 2016). Proviralni genom obuhvaća 9 funkcionalnih gena podijeljenih u tri okvira čitanja omeđenih dugim terminalnim ponavljajućim sekvencama (LTR). *Gag*, *pol* i *env* su tri glavna gena koja kodiraju za strukturne proteine (protein matriksa (MA), kapsidni protein (CA), protein nukleokapsidni protein (NC) i p16), enzime (proteaza, reverzna transkriptaza i

integraza) te proteine ovojnice (gp120, gp41). Preostali geni kodiraju za regulatorne (Tat, Rev) i pomoćne proteine (Vif, Vpr, Vpu/Vpx, Nef) (Cervera i sur. 2019). Navedeni virusni proteini mogu djelovati na različite načine i ulaziti u interakcije s različitim ljudskim proteinima tijekom replikacijskog ciklusa virusa (Engelman i Cherepanov 2012).



Slika 1. Struktura i organizacija genoma HIV-a tipa 1 (Preuzeto iz Cervera i sur. 2019)

Dvije kopije nekovalentno povezane jednolančane RNA molekule su zatvorene unutar stožaste kapside građene od virusnog kapsidnog proteina (CA, p24) (German Advisory Committee Blood 2016). Nukleokapsidni proteini (NC, p7) čvrsto vežu jednolančane molekule RNA te ih štite od razgradnje nukleazama. RNA je također povezana s proteinima kasnog slaganja (p6) te enzimima reverznom transkriptazom i integransom koje su ključne za razvoj virusnih čestica (German Advisory Committee Blood 2016). Virusnu ovojniciu čini lipidna membrana podrijetlom iz domaćinske stanice, a potporu joj pružaju proteini matriksa (p17) koji osiguravaju integritet virusne čestice povezujući je s nukleokapsidom. Na površini zrele čestice HIV-a nalazi se ograničeni broj trimernih glikoproteina ovojnice (Env) sastavljenih od heterodimera gp120 i gp41 koji su ključni za vezanje primarnog receptora tj. molekule CD4 i virusnih koreceptora tj. kemokinskih receptora CCR5 i/ili CXCR4 na stanicama domaćina (Checkley i sur. 2011).

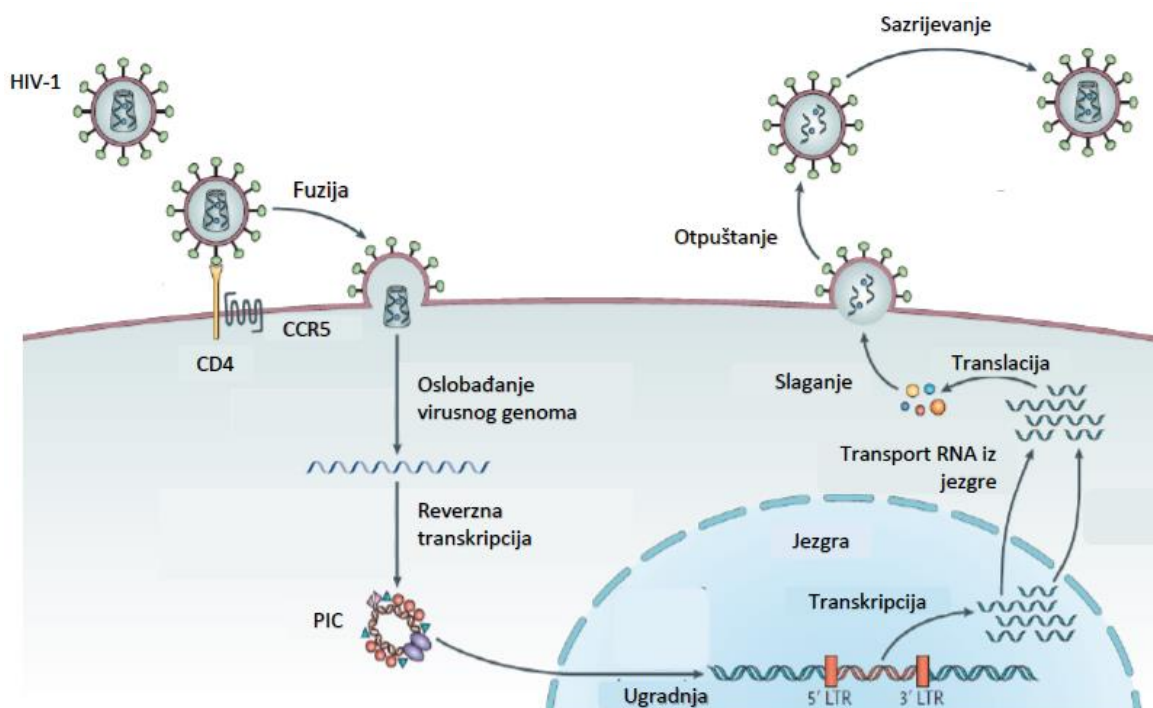


Slika 2. Struktura virusne čestice HIV-a (Preuzeto i prilagođeno prema Musumeci i sur. 2015)

1.3. Replikacijski ciklus HIV-a tipa 1

Kao i ostali retrovirusi, HIV ima sposobnost integracije provirusne DNA u domaćinski genom te se infekcija ne može eradicirati primjenom antivirusnih lijekova čije su ciljne strukture enzimi ovog virusa. Replikacijski ciklus HIV-a možemo podijeliti na ranu fazu koja započinje vezanjem virusne čestice za površinu stanice, a završava umetanjem virusne DNA u genom domaćina i kasnu fazu koja obuhvaća sve procese od ekspresije proviralnog genoma do otpuštanja i sazrijevanja novih virusnih čestica (Freed 2015). HIV prepoznaje i veže molekulu CD4 kao primarni receptor te CCR5 ili CXCR4 koreceptor na površini ciljnih stanica (najčešće aktiviranih memorijskih CD4+ T-limfocita) pomoću virusnog gp120. Vezanjem virusa na stanicu dolazi do konformacijskih promjena u gp120 i gp41 podjedinicama proteina virusne ovojnice (Env) te slijede procesi fuzije membrana i ulaska virusa u stanicu posredovani gp41 podjedinicom koja se zbog svoje hidrofobnosti umeće u plazma membranu stanice domaćina (Ozorowski i sur. 2017). HIV nakon ulaska u stanicu uklanja kapsidu i oslobađa svoju jednolančanu RNA koja se obrnuto prepisuje u virusnu DNA pomoću enzima reverzne transkriptaze. Reverzna transkriptaza je izrazito sklona pogreškama tijekom obrnutog prepisivanja zbog svoje niske vjerodostojnosti ugradnje nukleotida i nedostatka lektorirajuće aktivnosti. Kao posljedica visoke stope mutacija nastaje iznimno raznolika skupina genskih varijanti unutar kvazivrste u zaraženih osoba (Cervera i sur. 2019). Epitopi HIV-a koje

prepoznaju neutralizirajuća antitijela su također varijabilni što virusnim varijantama omogućuje kontinuirano izbjegavanje imunološkog sustava, infekciju novih stanica i sintezu novih virusnih čestica (German Advisory Committee Blood 2016). Novonastala dvolančana virusna DNA ulazi u jezgru u sklopu pre-integracijskog kompleksa (PIC) (Guo i sur. 2018) te se nasumično ugrađuje u genom domaćinske stanice pomoću LTR sekvenci u procesu posredovanom enzimom integrazom (Guo i sur. 2018). Umetanjem virusne DNA uspostavlja se trajna infekcija u obliku provirusa HIV-a integriranih u zaraženim stanicama. HIV upotrebljava enzime stanice domaćina za transkripciju provirusne DNA u jednolančanu RNA i translaciju nužnih proteina. Za slaganje nove virusne čestice ključan je Pr55gag virusni strukturni poliprotein koji regrutira virusnu RNA te virusne i/ili stanične proteine potrebne za pupanje nove virusne čestice s CD4+ T-limfocita. Sazrijevanje nezrelih virusnih čestica se odvija djelovanjem HIV-1 proteaze nakon čega virion poprima prethodno opisanu strukturu i postaje infektivan (Li i sur. 2017).



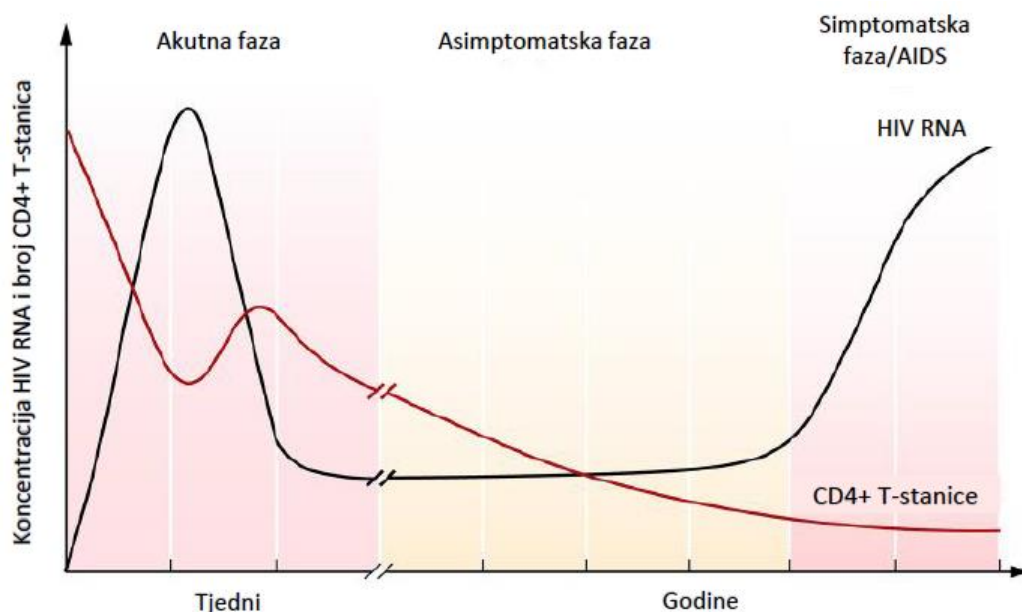
Slika 3. Shematski prikaz replikacijskog ciklusa HIV-a (Preuzeto i prilagođeno prema Barré-Sinoussi i sur. 2013)

Iako su CD4+ T-limfociti najznačajnije ciljane stanice za infekciju HIV-om, mijeloidne stanice poput monocita, makrofaga i dendritičkih stanica također mogu biti zaražene HIV-om jer eksprimiraju primarni receptor CD4 i kemokinske koreceptore CCR5 i CXCR4 (Rodrigues i

sur. 2017). Varijante virusa su klasificirane na R5, X4 ili R5X4 podvrste ovisno o korištenju pojedinačnih ili oba navedena koreceptora (Deeks i sur. 2015). Prirodni tijek infekcije HIV-om gotovo uvijek započinje replikacijom R5 varijante virusa i ranom deplecijom memorijskih CD4+ T-limfocita u crijevima (Le Hingrat i sur. 2021). Nakon rane replikacije u oko približno 50% slučajeva dolazi do promjene tropizma virusa pri čemu HIV prelazi s vezanja CCR5 na CXCR4 koreceptor. Promjena tropizma i prisutnost X4 varijanti HIV-a kod zaraženih osoba su povezane s brzim iscrpljivanjem broja CD4+ T-limfocita i napredovanjem bolesti (He i Wu 2019).

1.4. Imunopatogeneza infekcije HIV-om tipa 1

Tijek infekcije HIV-om tipa 1 u čovjeka može se klasificirati u dvije glavne faze (akutnu i kroničnu fazu) pri čemu u kroničnoj fazi razlikujemo asimptomatsku fazu infekcije te simptomatsku fazu bolesti ili AIDS (Slika 4) (Zitzmann i Kaderali 2018). Tijekom primarne ili akutne infekcije koja se odvija u tjednima nakon infekcije (Zitzmann i Kaderali 2018), dolazi do intenzivne replikacije virusa te razina HIV RNA u plazmi tj. viremija dostiže vrhunac (između $10^5 - 10^9$ kopija po ml plazme) (Zitzmann i Kaderali, 2018). Aktivacijom imunološkog odgovora dolazi do značajnog smanjenja virusnog opterećenja, te se viremija u plazmi najčešće smanjuje na 10^2 kopija/ml ili čak do nemjerljive razine detekcije molekularnim testovima koji se koriste za kvantifikaciju HIV-1 RNA (<40 kopija HIV-1 RNA po ml plazme) (Zitzmann i Kaderali, 2018). Stabilna i značajno snižena vrijednost viremije nakon akutne infekcije naziva se virusnom zadanom vrijednosti (eng. *viral set point*) (Deeks i sur. 2015). Poznata je povezanost između virusne zadane vrijednosti i kliničkog ishoda: kod zaraženih osoba s visokom razinom virusne zadane vrijednosti bolest brže napreduje do AIDS-a i smrti u odnosu na zaražene osobe s nižim virusnim zadanim vrijednostima (Graham i sur. 1995).



Slika 4. Dinamika broja CD4+ T-limfocita i razine virusnog opterećenja tijekom vremena u neliječenoj infekciji HIV-om (Preuzeto i prilagođeno prema Zitzmann i Kaderali 2018)

Virusna replikacija značajno doprinosi početnom smanjenju broja CD4+ T-limfocita tijekom akutne faze infekcije (Slika 4) indukcijom nekoliko mehanizama stanične smrti: a) citoliza stanica nakon pupanja virusa s površine stanice (citopatski učinak), b) aktivnost CTL-a specifičnih za HIV c) apoptoza potaknuta kaspazom 3 i/ili Bax proteinom (Le Hingrat i sur. 2021). Međutim, opisani su i dodatni tj. indirektni mehanizmi deplecije CD4+ T-limfocita tijekom akutne infekcije koji se ne odnose na zaražene stanice: a) apoptoza okolnih stanica (eng. *bystander apoptosis*) potaknuta djelovanjem virusnih proteina (gp120), b) aktivacijom-inducirana stanična smrt (ACID) zbog imunološke aktivacije koja uključuje i sintezu FasL te ekspresiju Fas receptora na okolnim nezaraženim stanicama, c) piroptoza pomoću kaspaze-1 zbog abortivne infekcije stanice (Le Hingrat i sur. 2021). Temeljno obilježje kronične faze infekcije HIV-om je trajna replikacija virusa koja se prati određivanjem virusnog opterećenja kao i gubitak kontrole virusne replikacije od strane imunskog sustava (Fenwick i sur. 2019) (Slika 3). Tijekom asimptomatske faze infekcije HIV godinama opstaje u obliku latentnih virusnih rezervoara dok se broj CD4+ T-limfocita kontinuirano smanjuje. U kasnoj fazi kronične infekcije, broj CD4+ T-limfocita značajno se smanjuje dok se kinetika virusne replikacije povećava što u konačnici dovodi do deficijencije stanične imunosti, razvoja oportunističkih bolesti te AIDS-a (Slika 4) (Zitzmann i Kaderali 2018).

Aktivirani CD4+ T-limfociti su preferencijalne stanice za produktivnu HIV-1 infekciju, ali imaju kratki životni vijek zbog citopatskog učinka virusa ili uništenja posredovanog citotoksičnim imunskim odgovorom (Vanhamel i sur. 2019). Međutim, dio efektorskih stanica

prelazi u stanje mirovanja i diferencira se u dugoživuće memorijske CD4+ T-limfocite. Identificirani su različiti tipovi memorijskih CD4+ T-limfocita prema ekspresiji površinskih staničnih markera (Barton i sur. 2016). Centralne memorijske stanice se ističu kao najznačajniji rezervoari latentne HIV-1 infekcije zbog svoje velike brojnosti, zadržavanja proliferativnih sposobnosti i dugog životnog vijeka (Barton i sur. 2016; Vanhamel i sur. 2019). Uz stanične rezervoare, najvažnije anatomske rezervoare predstavljaju limfoidno tkivo povezano s crijevima, središnji živčani sustav, genitalni sustav i limfni čvorovi (Ait-Ammar i sur. 2020). Kao što je prethodno spomenuto, i druge imunološke stanice mogu biti inficirane HIV-om te postati rezervoarima virusa. Monociti i makrofagi predstavljaju značajne posrednike upale tijekom infekcije HIV-om, a disregulacija njihovih upalnih funkcija povezuje se i s razvojem bolesti koje su povezane s upalnim procesima u HIV-om zaraženih osoba (Wong i sur. 2019). Makrofagi preživljavaju citopatske učinke virusa *in vitro* što ih čini pogodnim rezervoarima virusa. Međutim o njihovoj ulozi u infekciji HIV-om i latenciji se još uvijek raspravlja s obzirom veliku funkcionalnu raznolikost ovih stanica (Vanhamel i sur. 2019). Dendritičke stanice su također podložne infekciji HIV-om *in vitro*, ali su *in vivo* relativno oskudna stanična subpopulacija. Smatra se da doprinose širenju HIV-a tako što vežu kompletne virione i prezentiraju T-limfocitima te omogućuju njihovu infekciju (Vanhamel i sur. 2019). Iscrpljenost T-limfocita igra ključnu ulogu u kroničnoj fazi infekcije, a uzrokovano je trajno povišenom razinom virusnih antigena, hiperaktivacijom imunskog sustava te narušenom homeostazom T-stanica u timusu i limfoidnom tkivu (Fenwick i sur. 2019; Le Hingrat i sur. 2021). Karakteristike T-limfocita HIV-om zaraženih osoba u fazi opsežne imunodeficijencije uključuju smanjeni proliferativni kapacitet, smanjeni citotoksični potencijal te nepotpun polifunkcionalni citokinski odgovor (sinteza IL-2, IFN- γ , and TNF- α) (Fenwick i sur. 2019). Ekspresija receptora programirane stanične smrti (PD-1) na površini HIV-specifičnih T-limfocita je najznačajniji biljeg iscrpljenosti stanica koji je povezan sa smanjenom citotoksičnom aktivnošću CD8+ T-limfocita, povećanim virusnim opterećenjem i smanjenim brojem ukupne subpopulacije CD4+ T-limfocita. U zdravih osoba, PD-1 se kao jedan od inhibitornih receptora, kratkotrajno pojačano eksprimira na površini efektorskih T-limfocita s ciljem inhibicije T-staničnog imunskog odgovora, a nakon uništenja antigena se ponovno uspostavlja normalna razina. Na taj način se ograničava aktivacija T-stanica te zaustavlja imunološka reakcija u završnim fazama akutne infekcije kada se umnažanje patogena već uspješno može kontrolirati. Međutim, u slučaju kronične infekcije HIV-om kada imunološki odgovor nije u stanju uništiti strane antigene te se javlja kronična imunološka aktivacija, CD4+ i CD8+ T-limfociti ulaze u prethodno spomenuto stanje iscrpljenosti (Fenwick i sur. 2019). Do

stvaranja upalnog odgovora dolazi zbog oslobađanja upalnih citokina nakon smrti CD4+ T-stanica i mijeloidnih stanica. Uz to, dolazi i do oštećenje integriteta crijevnog epitela, enteropatije i mikrobne translokacije. Mikrobni produkti potiču lokalnu i sistemsku upalu te aktivaciju makrofaga (Kristoff i sur. 2014; Sokoya i sur. 2017). Imunološka aktivacija i trajna upala stvaraju ponavljajuću petlju događaja koji uključuju privlačenje novih CD4+ T-limfocita, povećanje broja HIV-osjetljivih stanica i reaktivaciju latentnih provirusa (Doitsh i sur. 2014). Sinteza novih virusnih čestica i njihovih proteina zatim ponovno potiče upalu, oštećenje tkiva i mikrobnu translokaciju (Le Hingrat i sur. 2021). U konačnici nastaje kronična upalna reakcija koja uzrokuje progresivnu imunosnu disregulaciju koja rezultira razvojem AIDS-a (de Paula i sur. 2018).

1.5. Dijagnoza HIV-1 infekcije u kasnoj simptomatskoj fazi bolesti: biološki mehanizmi i biomedicinsko značenje

Kaskada skrbi osoba zaraženih HIV-om je pojam koji opisuje odnos između pretpostavljenog broja zaraženih osoba u određenom geografskom području, broja osoba kod kojih je dijagnosticirana zaraza te broja uspješno liječenih osoba s nemjerljivom viremijom u plazmi (Haber i sur. 2016). Kaskade u skrb kod osoba zaraženih HIV-om značajno se razlikuju u pojedinim europskim zemljama, a postotak osoba za koje se pretpostavlja da su zaražene no ostaju nedijagnosticirane u rasponu je od 20% do čak 70% (Drew i sur. 2017). Uz to, procjenjuje se da se zaraza HIV-om dijagnosticira u kasnoj fazi infekcije u čak 50% HIV-om zaraženih osoba u Europi (ECDC 2020). Kasna prezentacija (KP) u skrb kod infekcije HIV-om odnosi se na osobe kod kojih se zaraza HIV-om dijagnosticira te koje ulaze u skrb u fazi značajne deficijencije imunološkog sustava tj. s <350 CD4+ T-limfocita/ μ l krvi ili u slučaju da su oboljeli od AIDS-a tj. kasne simptomatske faze HIV bolesti neovisno o broju CD4+ T-limfocita u razdoblju do 6 mjeseci nakon dijagnoze zaraze HIV-om (Antinori i sur. 2011).

Kasna dijagnoza i/ili kasno uključivanje u skrb povezano je s brojnim nepovoljnim biomedicinskim parametrima od kojih je značajno istaknuti: i) širenje virusa i pojava sve većeg broja oboljelih osoba u populaciji te nepovoljne posljedice na javno zdravlje; ii) širenje sojeva HIV-a rezistentnih na antiretrovirusne lijekove u populaciji, iii) brza progresija deficijencije stanične imunosti usprkos primjeni antiretrovirusnih lijekova te iv) povećan mortalitet i morbiditet zbog brojnih oportunističkih infekcija (Darcis i sur. 2018; Hu i sur. 2019). Rana dijagnoza HIV-infekcije i uključivanje u skrb te posljedično započinjanje antiretrovirusnog liječenja u što ranijoj fazi infekcije iznimno su značajni u biološkom smislu tj. u kontekstu

imunopatogeneze HIV-bolesti jer rani početak liječenja smanjuje brzinu uspostavljanja latentnih rezervoara virusa te utječe na molekularnu raznolikost sojeva HIV-a koji se povezuju s infekcijom dugoživućih stanica. Naime, u osoba kod kojih je dijagnoza postavljena u kasnoj simptomatskoj fazi infekcije, većina latentnih virusnih rezervoara sadrži sojeve virusa sa brojnim stečenim mutacijama koje virusu omogućuju izbjegavanje efektorskih mehanizama imunološkog sustava, osobito citotoksičnog imunogenog odgovora (Darcis i sur. 2018). Vrlo kasna prezentacija bolesti tj. prezentacija u uznapredovaloj fazi HIV bolesti odnosi se na osobe kojima je dijagnosticirana zaraza HIV-om u fazi iznimno opsežne deficijencije stanične imunost tj. s <200 CD4+ T-limfocita/ μ l krvi ili s dijagnozom bolesti koja je karakteristična za AIDS neovisno o broju CD4+ T-limfocita u razdoblju do 6 mjeseci nakon dijagnoze infekcije (Antinori i sur. 2011). Uznapredovala HIV bolest ukazuje na visoku podložnost oportunističkim infekcijama, a što je osobito značajno za gljivične infekcije uključujući pneumoniju uzrokovanu s *Pneumocystis jirovecii*, mikobakterijske infekcije i infekciju citomegalovirusom koja može zahvatiti različite organske sustave (Le Hingrat i sur. 2021).

1.6. Antiretrovirusno liječenje

Vrlo djelotvorno antiretrovirusno liječenje (engl. *highly active antiretroviral treatment*, HAART) HIV-1 infekcije omogućuje učinkovito smanjenje virusne replikacije, rekonstituciju imunološkog sustava s posebnim naglaskom na porast broja CD4+ T-limfocita, te značajno smanjenja rizika od razvoja AIDS-a (Deeks i sur. 2015). Standardno liječenje HIV-infekcije temelji se na primjeni kombinacije antiretrovirusnih lijekova iz klase inhibitora reverzne transkriptaze, integraze i proteaze s ciljem smanjenja virusnog opterećenja na nemjerljivu razinu tj. na razinu koja je niža od granice detekcije testova lančane reakcije polimerazom s reverznom transkripcijom u stvarnom vremenu koja se primjenjuje za kvantifikaciju HIV-1 RNA u plazmi (najčešće <40 kopija HIV-1 RNA po mL) (Osborne i sur. 2020). Važno je istaknuti da je ART cjeloživotna terapija jer se razina virusnog opterećenja može obnoviti već nakon dva tjedna od prestanka liječenja. Smatra se da su stabilni rezervoari HIV-1 provirusa glavni razlog za ponovno započinjanje replikacije virusa nakon prestanka liječenja (Vanhamel i sur. 2019). Uz nemogućnost potpune eliminacije stabilnih virusnih rezervoara, jedan od značajnih nedostataka ART-a je i otežan prolaz nekih lijekova kroz krvno-moždanu barijeru što predstavlja nužan preduvjet za postizanje optimalnih terapijskih koncentracija u središnjem živčanom sustavu (Osborne i sur. 2020). Latentni virusni rezervoari HIV-a formiraju se u vrlo ranoj fazi infekcije, prije nego što nastupi simptomatska akutna faza i prije nego što dijagnostički testovi mogu potvrditi zarazu (Ait-Amman i sur. 2020). Iako započinjanje

antiretrovirusnog liječenja u ranoj fazi akutne infekcije ne može spriječiti latentnu zarazu mirujućih CD4+ T-limfocita, rani početak liječenja osigurava manji opseg latentnog virusnog rezervoara što povoljno djeluje na ishod liječenja te patogenezu bolesti (Vanhamel i sur. 2019). Temeljem spoznaja o imunopatogenezi HIV-1 infekcije i značajnosti biološke funkcije latentnih rezervoara virusa, međunarodne smjernice za liječenje HIV-1 infekcije preporučuju započinjanje liječenja neposredno nakon otkrivanja zaraze kod svih odraslih osoba, neovisno o apsolutnom broju CD4+ T-limfocita (WHO 2021). U tom smislu je dijagnoza HIV-infekcije u ranoj fazi tj. pri što većem broju CD4+ T-limfocita jedan od prioriteta u ovom području.

Antiretrovirusno liječenje dostupno je u Hrvatskoj od siječnja 1998.g., a sustav dijagnostike (uključujući praćenje CD4+ T-limfocita i viremije) centraliziran je na nacionalnoj razini u Klinici za infektivne bolesti (KZIB) "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu.

1.7. Epidemiologija HIV-1 infekcije i globalna strategija usmjerena na otkrivanje zaraze HIV-om

Jedan od globalnih ciljeva održivog razvoja UN-a za zdravlje je okončanje epidemije HIV-a do 2030. godine (<https://www.unaids.org/>). Kako bi se to ostvarilo, Zajednički program Ujedinjenih naroda za HIV/AIDS (UNAIDS) je postavio ciljeve da do 2020. godine 90% inficirane populacije zna svoj HIV status, da 90% populacije dijagnosticirane s HIV-om prima ART te da 90% ljudi koji primaju ART postignu viralnu supresiju (<https://www.unaids.org/>). U 2020. godini 84% inficiranih ljudi znalo je svoj HIV status, 87% inficirane populacije primalo je ART, a 90% inficirane populacije je postiglo viralnu supresiju (UNAIDS 2020). Ukoliko ova strategija bude uspješna, a u suradnji sa kontinuiranim donatorskim i nacionalnim financiranjem programa za borbu protiv HIV-a, otvara se mogućnost održavanja i unapređenja kliničkih intervencija te u konačnici stavljanja pandemije HIV-a pod kontrolu.

U Hrvatskoj je u razdoblju od 2010.-2019.g. zaraza HIV-om dijagnosticirana kod 1734 osobe, a Hrvatska se svrstava u skupinu europskih zemalja s najnižom stopom novih slučajeva infekcije HIV-om na 100 000 stanovnika (ECDC 2020). Međutim, značajno je istaknuti da postoje potencijalni čimbenici rizika za širenje infekcije te za porast opsega epidemije u Hrvatskoj zbog određenih posebnosti koje uključuju širenje infekcije u muškoj populaciji koji imaju spolne odnose s muškarcima, otvorene granice i razvijeni turizam, državljane koji putuju u inozemstvo kao i veliki broj radnih migranata (uključujući pomorce) koji borave u zemljama visoke incidencije infekcije.

2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog rada su:

- 1) Analizirati imunosni status (na temelju postotka i broja CD4+ T-limfocita u perifernoj krvi) i kinetiku virusne replikacije u osoba kod kojih je zaraza HIV-om otkrivena u Hrvatskoj u vremenskom razdoblju od 2014. do 2017. godine i dobivene rezultate usporediti s podacima iz 2020. godine
- 2) Utvrditi postoji li značajna razlika u broju ispitanika kod kojih je infekcija HIV-om otkrivena pri broju CD4+ T-limfocita manjim od 350 (kasna prezentacija u skrb) odnosno manjim od 200 CD4+ T-limfocita (vrlo kasna prezentacija u skrb) u promatranim vremenskim intervalima (prije i tijekom pandemije COVID-19)
- 3) Analizirati dodatne parametre stanične imunosti (B-limfocite, T-limfocite, NK-stanice, CD8+ T-limfocite, omjer CD4+ i CD8+ T-limfocita, aktivirane HLA-DR+ T-limfocite i CD38+CD8+ T-limfocite) te njihovu moguću povezanost s kinetikom virusne replikacije

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i dizajn istraživanja

U ovo retrospektivno istraživanje uključeno je 451 ispitanika iz Hrvatske kod kojih je zaraza HIV-om tipa 1 otkrivena u razdoblju od siječnja 2014.g. do prosinca 2017.g. te od siječnja do prosinca 2020.g. Ispitanici su nakon dijagnoze uključeni u skrb Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ (KZIB) u Zagrebu. U istraživanje su uključeni ispitanici koji nisu prethodno bili u skrbi u drugoj ustanovi te nisu liječeni ART-om. Imunološki status ispitanika (postotak i broj CD4+ T-limfocita po μ L krvi) i kinetika virusne replikacije (broj kopija HIV-1 RNA po ml plazme) u trenutku dijagnoze infekcije HIV-om tipa 1 (tj. prilikom uključanja u skrb) određeni su u Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku KZIB. Rezultati imunoloških i molekularnih testova izdvojeni su iz elektronske baze podataka Odjela. Identifikacijski podaci o ispitanicima kodirani su za potrebe ovog istraživanja. Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Molekularna epidemiologija, kliničke osobitosti i skrb za osobe zaražene HIV-om u Hrvatskoj“.

3.2. Definicije i varijable

U ovom je istraživanju broj CD4+ T-limfocita korišten kao temeljni kriterij procjene deficijencije stanične imunosti HIV-om zaraženih osoba. Također je korišten i kao kriterij za definiciju kasne prezentacije (<350 CD4+ T-limfocita/ μ l) odnosno vrlo kasne prezentacije (<200 CD4+ T-limfocita/ μ l) u skrb (Antinori i sur. 2011). Broj CD4+ T-limfocita po mikrolitru krvi u zdravih osoba u rasponu je od 500-1400 stanica. Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) definira broj CD4+ T-limfocita manji od 200 stanica po μ l krvi kao jedan je od kriterija za dijagnozu kasne simptomatske HIV-bolesti tj. AIDS-a. Podaci o broju CD4+ T-limfocita po μ l krvi bili su dostupni za 449 ispitanika i uključeni su u statističku analizu.

Podaci o dodatnim parametrima stanične imunosti bili su dostupni za 68 ispitanika kod kojih je HIV-1 infekcija dijagnosticirana tijekom 2020.g. te uključuju postotak T-limfocita (CD3+ stanice nakon analize veličine, zrnatosti te ekspresije pan-leukocitnog biljega CD45), B-limfociti (CD19+ stanice), NK-stanice (CD16+CD56+ stanice), CD8+ T-limfociti (CD8+CD3+ stanice), omjer CD4+ i CD8+ T-limfocita, postotak aktiviranih HLA-DR+ T-limfocita te postotak aktiviranih CD38+CD8+ T-limfocita.

U razdoblju od 2014. do 2017.g. limfocitne subpopulacije određene su metodom četverostrukog i peterostrukog bojanja (kombinacijama protutijela specifičnih za CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD-3PC-5 te CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC-5 i HLA-DR PC7) uz direktnu kvantifikaciju stanica na protočnom citometru CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, USA). Tijekom 2020.g., limfocitne subpopulacije periferne krvi analizirane su metodom šesterostrukog bojanja uz primjenu kombinacije protutijela CD3-FITC/CD16-PE + CD56-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD4-PE-Cy7/CD19-APC/CD8-APC-Cy7 i četverostrukog bojanja (CD38-FITC/CD38-PE/CD3-PerCP/HLA-DR-APC) uz primjenu protočnog citometra FACS Canto II (Beckton Dickinson, USA).

Viremija je određena koristeći PCR u stvarnom vremenu uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-qPCR) primjenom testa COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 assay, version 2.0 (Roche Diagnostics), a izražena je kao broj RNA kopija virusa/ml plazme. U testu se primjenjuju početnice koje umnažaju sekvencu unutar visoko konzervirane regije gena *gag* i LTR regije virusnog genoma. Podaci o viremiji bili su dostupni za 426 ispitanika koji su uključeni u statističku analizu.

3.3. Obrada podataka

Sve statističke analize i grafičke obrade podataka obavljene su u programima SPSS 17 (IBM 2008) i Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation 2016). Prikupljeni podaci o virološkim i imunološkim parametrima pacijenata su opisani pomoću standardne deskriptivne statistike. Za kontinuirane varijable izračunata je aritmetička sredina sa pripadajućom standardnom devijacijom, standardnom pogreškom te minimumom i maksimumom. Analiza varijance (engl. *Analysis of variance*, ANOVA) korištena je za usporedbu kontinuiranih varijabli među skupinama, a razlike među skupinama su potvrđene *post hoc* analizom koristeći Bonferroni test. Hi kvadrat test je korišten za analizu trendova kasne prezentacije i uznapredovale HIV bolesti tijekom različitih godina. Povezanost između pojedinih parametara analizirana je upotrebom Pearsonovog koeficijenta korelacije (r). P-vrijednost $<0,05$ smatrana je značajnom, a svi testovi značajnosti bili su dvostrani. Predstavljeni rezultati isključuju nedokumentirane ili nepoznate vrijednosti.

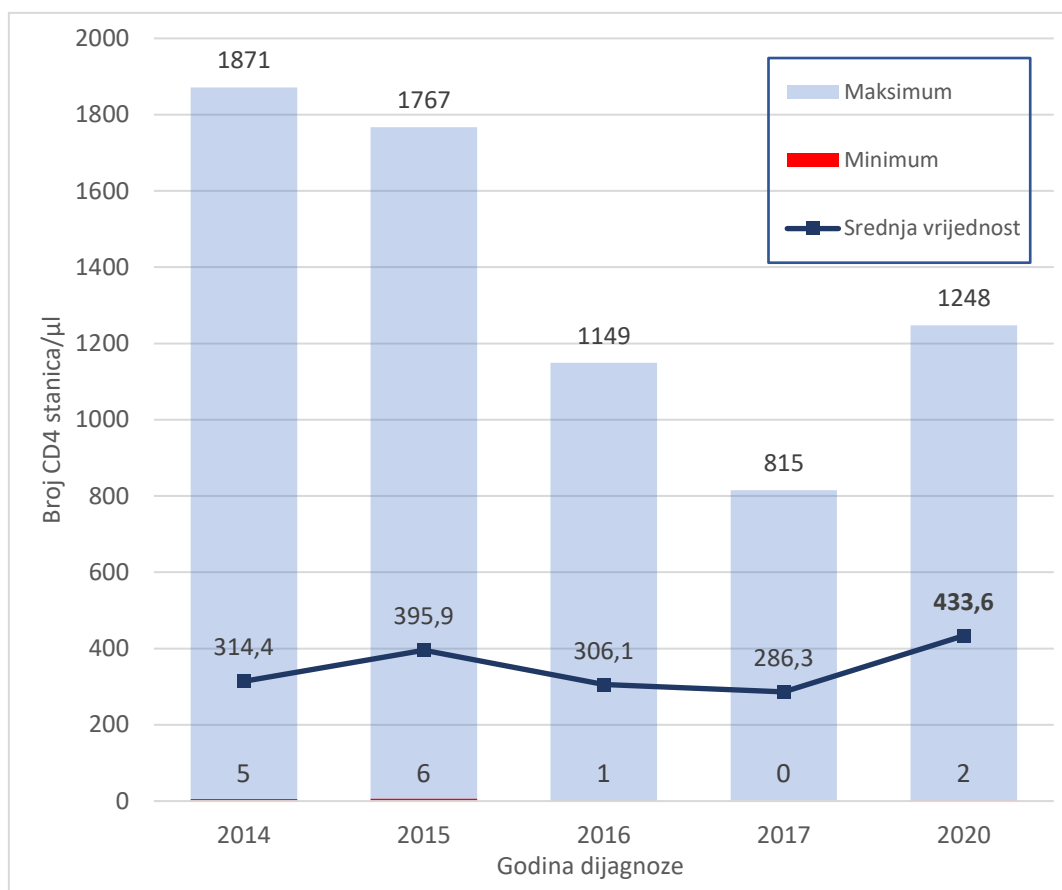
4. REZULTATI

Rezultati deskriptivne statističke analize odabranih imunoloških i viroloških parametara (viremija u plazmi, broj i postotak CD4+ T-limfocita po μl krvi) kod ukupno 451 ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om tipa 1 dijagnosticirana u razdoblju od 2014.-2017.g. te 2020.g. prikazani su u Tablici 1.

Srednje vrijednosti postotka i broja CD4+ T-limfocita bile su najviše u ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om dijagnosticirana tijekom 2020.g. (Tablica 1). Srednja vrijednost broja CD4+ T-limfocita po μl krvi bila je viša od vrijednosti koja definira kasnu prezentaciju u skrb (350 CD4+ stanica/ μl) u ispitanika kod kojih je zaraza dijagnosticirana 2015. i 2020.g. (Slika 5). Najviša srednja vrijednost viremije dokazana je u ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om tipa 1 dijagnosticirana tijekom 2017.g.

Tablica 1. Odabrani virološki i imunološki parametri ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om tipa 1 dijagnosticirana u razdoblju od 2014.-2017. i 2020.g

| Varijabla | Godina | N | Srednja vrijednost | Minimum | Maksimum | Standardna devijacija |
|--------------------------------------|--------|-----|--------------------|---------|--------------|-----------------------|
| Viremija | 2014. | 73 | 274 541,4 | 0 | 2 290 975 | 505 292,5 |
| | 2015. | 109 | 778 782,9 | 966 | 40 716 110 | 4 029 892,3 |
| | 2016. | 80 | 138 294 | 2 | 2 790 000 | 429 818,724 |
| | 2017. | 107 | 284 622 003,2 | 159 | 300 006 9200 | 2 929 093, 491 |
| | 2020. | 57 | 294 072,1 | 165 | 6083296 | 850 442,216 |
| % CD4+ T-limfocita | 2014. | 75 | 18 | 0,4 | 48,2 | 12,5 |
| | 2015. | 109 | 20,7 | 0,7 | 50,8 | 11,4 |
| | 2016. | 80 | 19 | 0,178 | 47,8 | 11,6 |
| | 2017. | 107 | 17,6 | 0,3 | 45,8 | 10,5 |
| | 2020. | 67 | 25 | 2 | 52 | 12,2 |
| Broj CD4+ T-limfocita/ μl | 2014. | 75 | 314,4 | 5 | 1 871 | 343,2 |
| | 2015. | 109 | 395,9 | 6 | 1 767 | 293,4 |
| | 2016. | 80 | 306,1 | 1 | 1 149 | 247 |
| | 2017. | 107 | 286,3 | 0 | 815 | 214,6 |
| | 2020. | 78 | 433,6 | 2 | 1 248 | 306,4 |



Slika 5 Srednje vrijednosti broja CD4+ T-limfocita/ μ l u ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om tipa 1 otkrivena u razdoblju od 2014.-2017. i 2020.g.

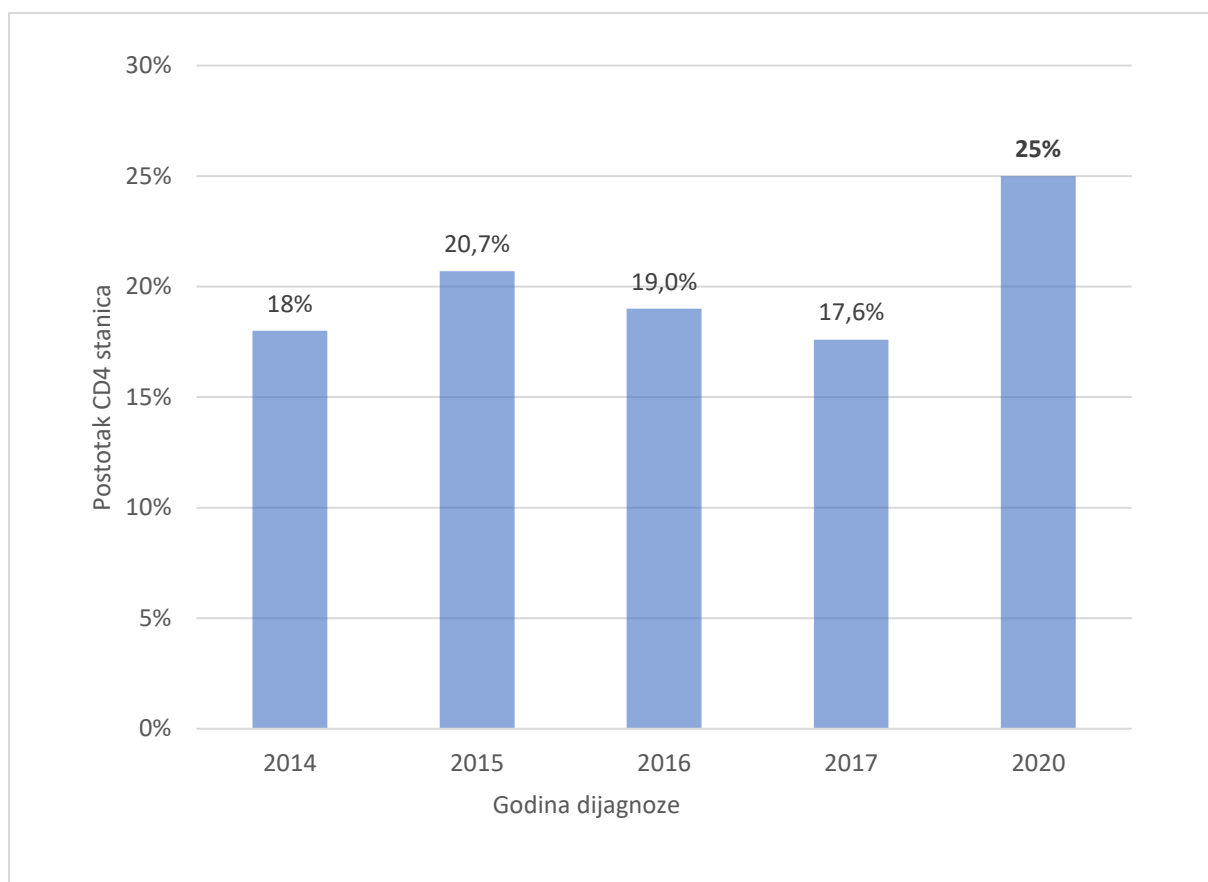
Provedena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) kako bi se usporedili virološki i imunološki parametri ispitanika obzirom na godinu dijagnoze zaraze HIV-om tipa 1 i uključivanja u skrb. ANOVA test nije pokazao statistički značajan utjecaj različitih godina dijagnoze i uključivanja u skrb na viremiju u ispitanika (Tablica 2). Međutim, dokazan je statistički značajan utjecaj različitih godina dijagnoze i uključivanja u skrb na postotak i broj CD4+ T-limfocita u promatranom vremenskom razdoblju.

Tablica 2. Jednosmjerna ANOVA za usporedbu srednjih vrijednosti viremije, postotka i broja CD4+ T-limfocita između skupina ispitanika zaraženih HIV-om tipa 1 koji su uključeni u skrb tijekom 2014.-2017. odnosno u 2020.g. (SS (engl. *Sum of Squares*) - zbroj kvadrata odstupanja, df (engl. *Degrees of Freedom*) - stupnjevi slobode, MS (engl. *Mean Squares*) - srednji kvadrati, F (engl. *F-ratio*) - F-omjer)

| Varijabla | | SS | df | MS | F | p-vrijednost |
|---------------------------|----------------|--------------|-----------|-----------|----------|---------------------|
| Viremija | | | | | | |
| | Između skupina | 5,725E+21 | 4 | 1,431E+21 | 0,489 | 0.744 |
| | Unutar skupina | 9,094E+23 | 311 | 2,924E+21 | | |
| Postotak CD4+ T-limfocita | | | | | | |
| | Između skupina | 2 679,1 | 4 | 669,8 | 5,024 | 0,001 |
| | Unutar skupina | 57 726,1 | 433 | 133,3 | | |
| Broj CD4+ T-limfocita/μl | | | | | | |
| | Između skupina | 1 453 965,7 | 4 | 363 491,4 | 4,619 | 0,001 |
| | Unutar skupina | 34 942 925,1 | 444 | 78700,3 | | |

Obzirom na to da su testom jednosmjerne ANOVA analize dokazane statistički značajne razlike, proveden je Bonferroni post-hoc test koji potvrđuje razlike srednjih vrijednosti postotka CD4+ T-limfocita kao i broja CD4+ T-limfocita/μl između skupina ispitanika obzirom na vremenski period dijagnoze infekcije te uključanja u skrb (razdoblje od 2014.-2017. i 2020. g.).

Srednja vrijednost postotka CD4+ T-limfocita u ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om otkrivena tijekom 2020.g. bila je statistički značajno veća u usporedbi s ispitanicima kod kojih je zaraza dijagnosticirana 2014.g. (*post hoc* Bonferroni test, $P = 0.03$), 2016.g. (*post hoc* Bonferroni test, $P = 0.019$) i 2017.g. (*post hoc* Bonferroni test, $P = 0.001$) (Tablica 3; Slika 6).



Slika 6. Srednje vrijednosti postotka CD4+ T-limfocita u ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om tipa 1 otkrivena u razdoblju od 2014.-2017. i 2020.g.

Nije dokazana statistički značajna razlika između srednjih vrijednosti postotka CD4+ T-limfocita u ispitanika koji su uključeni u skrb nakon dijagnoze tijekom 2020. i 2015. g. (*post hoc* Bonferroni test, $P = 0.0173$).

Tablica 3. Bonferroni post-hoc test za određivanje značajnosti razlika između srednjih vrijednosti postotka CD4+ T-limfocita u ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om tipa 1 dijagnosticirana u razdoblju od 2014.-2017. i 2020.g. (MD (engl. *Mean Difference*) - Razlike između srednjih vrijednosti, SE (engl. *Standard Error*) – Standardna pogreška)

| Postotak CD4+ T-limfocita | MD | SE | p-vrijednost |
|---------------------------|-------|-------|--------------|
| 2020. vs 2014. | 7,010 | 1,940 | 0,03 |
| 2020. vs 2016. | 5,974 | 1,912 | 0,019 |
| 2020. vs 2017. | 7,324 | 1,799 | 0,001 |

Srednja vrijednost broja CD4+ T-limfocita/ μ l bila je statistički značajno veća u osoba koje su uključene u skrb tijekom 2020.g. u usporedbi s osobama koje su uključene u skrb 2016. (*post hoc* Bonferroni test, $p=0.045$) i 2017.g. (*post hoc* Bonferroni test, $p=0.005$). Uz to, srednja vrijednost broja CD4+ T-limfocita bila je statistički značajno viša u ispitanika koji su uključeni u skrb nakon dijagnoze tijekom 2015. u usporedbi s 2017.g. (*post hoc* Bonferroni test, $p=0.043$) (Tablica 4; Slika 5).

Tablica 4. Bonferroni post-hoc test za potvrdu značajnosti razlika između srednjih vrijednosti broja CD4+ T-limfocita/ μ l u ispitanika koji su u skrb uključeni nakon dijagnoze zaraze HIV-om tipa 1 u razdoblju od 2014.-2017. i 2020.g. (za objašnjenje kratica pogledati Tablicu 3)

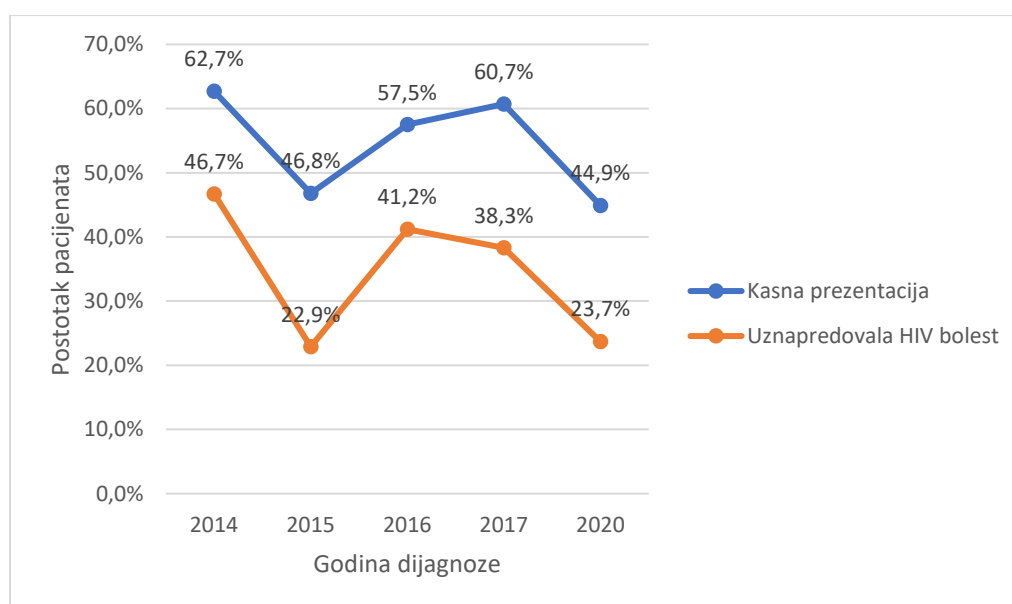
| Broj CD4+ T-limfocita/ μ l | MD | SE | p-vrijednost |
|--------------------------------|---------|--------|--------------|
| 2015. vs 2017 | 109,637 | 38,178 | 0,043 |
| 2020. vs 2016. | 127,502 | 44,640 | 0,045 |
| 2020. vs 2017. | 147,328 | 41,767 | 0,005 |

Dokazana je značajna pozitivna korelacija između postotka i broja CD4+ T-limfocita/ μ l ($\rho = 0.721$, $p<0,001$). Nije utvrđena značajna korelacija između viremije i postotka CD4+ T-limfocita ($\rho = -0.032$, $p=0.580$) te viremije i broja CD4+ T-limfocita/ μ l ($\rho=0.015$, $P=0.791$).

Trendovi kasne prezentacije i uznapredovale HIV bolesti analizirani su pomoću Pearsonovog hi kvadrat testa. Uočen je relativno stabilan broj ispitanika s kasnom prezentacijom bolesti tijekom razdoblja od 2014.-2017. i 2020.g. (Tablica 5). Hi kvadrat test nije pokazao statistički značajne razlike između broja kasnih prezentera primljenih u skrb tijekom različitih godina (kasna prezentacija: $\chi^2 = 9.512$, $P = 0.05$). Međutim, pokazana je statistički značajna razlika broja ispitanika s uznapredovalom fazom HIV bolesti pri dijagnozi tijekom različitih godina ($\chi^2 = 17.675$, $P = 0.001$). Najniže vrijednosti postotka ispitanika s kasnom prezentacijom u skrb te prezentacijom u skrb tijekom uznapredovale faze HIV-bolesti u skrb dokazani su kod ispitanika uključenih u skrb nakon dijagnoze tijekom 2015. i 2020.g. (Slika 7).

Tablica 5. Broj i postotak ispitanika s kasnom prezentacijom u skrb te ispitanika koji su uključeni u skrb tijekom uznapredovale faze HIV-bolesti (jako kasna prezentacija) u razdoblju od 2014.-2017. i 2020.g.

| Godina dijagnoze | Kasna prezentacija N (%) | Bez kasne prezentacije N (%) | Uznapredovala HIV bolest N (%) | HIV bolest (nije uznapredovala) N (%) | Ukupno N |
|------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|----------|
| 2014. | 47 (62,7) | 28 (37,3) | 35 (46,7) | 45 (53,3) | 75 |
| 2015. | 51 (46,8) | 58 (53,2) | 25 (22,9) | 84 (77,1) | 109 |
| 2016. | 46 (57,5) | 34 (42,5) | 33 (41,2) | 47 (58,8) | 80 |
| 2017. | 65 (60,7) | 42 (39,3) | 41 (38,3) | 66 (61,7) | 107 |
| 2020. | 35 (44,9) | 43 (55,1) | 18 (23,7) | 58 (76,3) | 78 |



Slika 7. Postotci ispitanika s kasnom i vrlo kasnom prezentacijom u skrb nakon dijagnoze zaraze HIV-om obzirom na godinu dijagnoze

Dokazana je značajna pozitivna korelacija između postotka CD4+ T-limfocita i broja CD4+ T-limfocita/ μ l ($\rho = 0.721$, $p < 0,001$). Nije pronađena značajna povezanost između viremije i

postotka CD4+ T-limfocita stanica ($p=-0.032$, $p=0.580$) te viremije i broja CD4+ T-limfocita/ μ l ($p=0.015$, $p=0.791$).

Rezultati deskriptivne statističke analize za dodatne imunološke parametre tj. postotak T-limfocita, B-limfocita, citotoksičnih CD8+ T-limfocita, NK-stanica, aktiviranih T-limfocita, CD8+/CD38+ stanica, omjera CD4+/CD8+ T-limfocita kao i broja te postotka CD4+ T-limfocita za 68 ispitanika koji su uključeni u skrb nakon dijagnoze infekcije HIV-om tipa 1 tijekom 2020.g. prikazani su u Tablici 6.

U perifernoj krvi ispitanika zaraženih HIV-om opisana je snižena srednja vrijednost postotka pomoćničkih CD4+ T-limfocita u odnosu na referentne vrijednosti kao i sniženi apsolutni broj pomoćničkih CD4 T-limfocita/ μ l. Srednja vrijednost omjera pomoćničkih CD4+ i citotoksičnih CD8+ T-limfocita također je bila snižena u odnosu na referentne vrijednosti. Srednje vrijednosti postotka citotoksičnih CD8+ T-limfocita te aktiviranih T-limfocita također su bile povišene u odnosu na referentne vrijednosti. Srednje vrijednosti ostalih staničnih populacija nalaze se unutar svojih referentnih vrijednosti (Tablica 6).

Tablica 6. Parametri stanične imunosti ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om otkrivena 2020.g. te su uključeni u skrb (podebljane su srednje vrijednosti koje odstupaju od referentnih vrijednosti)

| Stanična populacija | N | Srednja vrijednost | Minimum | Maksimum | SD | Referentna vrijednost |
|----------------------------------|----|--------------------|---------|----------|-------|-----------------------|
| Postotak T-limfocita | 68 | 87,1 | 56,1 | 759 | 83,1 | 60-85% |
| Postotak B-limfocita | 68 | 9,5 | 0,3 | 31,3 | 6 | 5-20% |
| Postotak CD4+ T-limfocita | 68 | 25,1 | 2 | 51,8 | 11,9 | 35-60% |
| Postotak CD8+ T-limfocita | 68 | 49,1 | 21,3 | 74,5 | 11,5 | 10-30% |
| Postotak NK stanica | 68 | 11,8 | 2,4 | 25,4 | 6,2 | 0-15% |
| Postotak aktiviranih T-limfocita | 68 | 29,1 | 6 | 74,1 | 14 | 0-10% |
| Broj CD4+ stanica/ μ l | 68 | 463,6 | 13 | 1248 | 297,6 | 500-1500/ μ l |
| Postotak CD8+/CD38+ | 68 | 33,6 | 0,9 | 76 | 20 | 0,9-7% |
| Omjer CD4+/CD8+ | 68 | 0,6 | 0 | 2,4 | 0,4 | 1,9 (1-3,6) |

Dokazana je značajna negativna korelacija između postotka aktiviranih T-limfocita i broja CD4+ T limfocita/ μl ($\rho = -0.351$, $p=0.003$). Postotak aktiviranih HLA-DR+ T-limfocita pozitivno korelira s postotkom CD8+/CD38+ T-limfocita ($\rho=0.776$, $p<0.001$) te viremijom ($\rho = 0.428$, $p=0.003$). Uočena je i negativna povezanost između postotka CD8+/CD38+ T-limfocita i broja CD4+ T-limfocita ($\rho=-0.547$, $p<0.001$). Naposljetku, utvrđeno je da viremija pozitivno korelira s postotkom aktiviranih T-limfocita ($\rho=0.776$, $P<0.001$) te postotka CD8+/CD38+ T-limfocita ($\rho=0.34$, $P=0.02$) (Tablica 7).

Tablica 7. Povezanost viroloških i imunoloških parametara kod ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om tipa 1 dijagnosticirana 2020.g. izražena Pearsonovim koeficijentom korelacije

| Varijabla | Postotak aktiviranih T-limfociti | Broj CD4+ stanica/ μl | Postotak CD8+/CD38+ stanica | Viremija |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|----------|
| Postotak aktiviranih T-limfociti | 1 | | | |
| Broj CD4+ stanica/ μl | $\rho = -0.351$, $P=0.003$ | 1 | | |
| Postotak CD8+/CD38+ stanica | $\rho = 0.776$ $P<0.001$ | $\rho = -0.547$ $P<0.001$ | 1 | |
| Viremija | $\rho = 0.428$ $P=0.003$ | $\rho = 0.025$ $P=0.867$ | $\rho = 0.340$ $P=0.02$ | 1 |

5. RASPRAVA

Pomoćnički CD4+ T-limfociti najznačajnije su stanice za aktivnu replikaciju HIV-a tipa 1, a njihova progresivna deplecija tijekom infekcije u biološkom je smislu obilježje imunopatogeneze HIV/AIDS-a. U biomedicinskim istraživanja te praćenju osoba zaraženih HIV-om te oboljelih od simptomatske HIV-bolesti tj. AIDS-a, apsolutni broj CD4+ T-limfocita ključni je parametar za procjenu imunološkog statusa pri dijagnozi te jedan od ključnih parametara praćenja oporavka imunološkog sustava tijekom antiretrovirusnog liječenja (Ren i sur. 2017).

Ovo istraživanje pokazalo je korelaciju između ukupnog broja i postotka CD4+ T-limfocita. Međutim, dostupna su i istraživanja koja pokazuju da u nekih bolesnika (8-10%) nije moguće dokazati korelaciju ovih parametara tj. dolazi do diskordantne kinetike broja i postotka ovih stanica (Goicoechea i Haubrich 2005). Pri tome se postavlja pitanje koji je od ova dva parametra prikladniji za procjenu imunološkog statusa HIV-om zaraženih osoba, posebno u smislu početka primjene profilaktičkih antifungalnih i antivirusnih lijekova. Primjerice, smjernice predlažu početak primjene kemoprofilakse protiv uzročnika pneumonije *Pneumocystis jirovecii* (PJP) ukoliko je apsolutni broj CD4+ T-limfocita manji od 200 stanica/ μ l kao i kod bolesnika s manje od 14% CD4+ T-limfocita (Lin i sur. 2016). Novija istraživanja Anyimadu i sur. (2018) pokazala su da je apsolutni broj CD4+ T-limfocita bolji pokazatelj optimalnog vremena započinjanja primjene profilakse protiv infekcije PJP-om u odnosu na postotak CD4+ T-limfocita. Potrebno je provesti i dodatna istraživanja s ciljem boljeg razumijevanja biološkog značenja različite kinetike apsolutnog broja i postotka CD4+ T-limfocita koja bi omogućila pouzdaniju procjenu optimalnog parametra za procjenu imunološkog statusa HIV-om zaraženih osoba.

Uz apsolutni broj CD4+ T-limfocita, virusno opterećenje neizostavan je dio praćenja tjeka infekcije HIV-om kao i procjene virološkog učinka antiretrovirusnog liječenja (Dessie i sur. 2020). Iako su prethodna istraživanja pokazala povezanost između viremije i broja CD4+ T-limfocita (COHERE 2014; Le Hingrat i sur. 2021; Kumar 2017), rezultati ovog rada ne ukazuju na postojanje korelacije između ova dva parametra te ukazuju na značajnu korelaciju između viremije i postotka aktiviranih T-limfocita te CD8+ T-limfocita. Navedeni rezultati su u skladu s hipotezom o hiperaktivaciji imunološkog sustava kao ključnog parametra u imunopatogenezi HIV-infekcije u kroničnoj fazi. Longitudinalna istraživanja dokazala su da je veće virusno opterećenje povezano s povećanom kinetikom smanjenja broja CD4+ T-limfocita (Farahani i

sur. 2016) što ukazuje da rizik od progresije imunodeficijencije i bolesti raste s kinetikom virusne replikacije te amplitudom smanjenja broja CD4+ T-limfocita (Dessie i sur. 2020).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je u ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om otkrivena 2020.g. broj i postotak CD4+ T-limfocita bio značajno veći u usporedbi s ispitanicima kod kojih je infekcija otkrivena u 2014., 2016. i 2017.g.. Navedeni rezultati pokazuju da je tijekom 2020.g. zaraza HIV-om dijagnosticirana u ranoj fazi infekcije HIV-om u većem broju ispitanika (55,1%) u usporedbi s prethodnim razdobljima. Obzirom na to da je KP značajno povezana s većim rizikom od mortaliteta i morbiditeta te širenja virusa u populaciji (Darcis i sur. 2018), rana dijagnoza i mogućnost što ranije primjene ART-a u liječenju infekcije u fazi prije razvoja uznapredovale imunodeficijencije iznimno su značajni na individualnoj i na globalnoj razini.

Kasna dijagnoza infekcije HIV-om i dalje ostaje veliki izazov u Europi, posebice u regijama istočne i jugoistočne Europe. Procjene ECDC-a pokazuju da je više od polovice (53%) novodijagnosticiranih HIV-om zaraženih osoba u Europi tijekom 2019.g. bilo klasificirano u kategoriju kasnih presentera (<350 CD4+ T-limfocita/ μ l) te da je čak 31% imalo razvijenu uznapredovalu HIV bolest (<200 CD4+ T-limfocita/ μ l) (ECDC 2020). Postoci kasnih presentera u populaciji osoba kod kojih je otkrivena infekcija HIV-om u Hrvatskoj u razdoblju od 2014.-2017. (62%, 47%, 58%, 61%) i 2020.g (45%) u skladu su s rasponom postotaka slučajeva KP u Europi (40-60%) (ECDC 2020).

Glavni čimbenici rizika povezani s KP su dinamika spolnih odnosa (između osoba istog ili različitog spola), starija životna dob i status migranta. Međutim, navedeni čimbenici mogu biti značajno različiti obzirom na regiju u Europi, a mijenjaju se tijekom vremena (Zoufaly i sur. 2012). Prepreku ranog započinjanja liječenja predstavlja i odgođeni ulazak u skrb nakon postavljene dijagnoze, no smatra se da je samo 10% ukupnih slučajeva KP u Europi povezano s odgodom ili barijerama u pristupu skrbi (Darling i sur. 2016).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju značajne varijacije u udjelima jako kasnih presentera među skupinama pacijenata primljenih u skrb tijekom različitih godina. Najmanje slučajeva uznapredovale HIV bolesti uočeno je kod pacijenata primljenih u skrb 2015. i 2020.g. (22,9% i 23,7%), a najviše kod pacijenata primljenih u skrb 2014. i 2016.g. (46,7% i 41,2%). Navedeni podaci ukazuju na činjenicu da je veliki broj osoba bio zaražen HIV-om mnogo godina prije dijagnoze iz čega možemo indirektno zaključiti da su vjerojatno postojale subjektivne, ali i objektivne barijere u pristupu testiranju i skrbi tijekom navedenih godina. Poboljšanje pristupu

skrbi na individualnoj razini vjerojatno bi povoljno utjecalo i na smanjenje širenja infekcije u populaciji.

Pandemija bolesti COVID-19 predstavlja novi globalni čimbenik rizika koji potencijalno može dovesti do smanjenja broja testiranja te povećanja stope KP. Novija istraživanja provedena u Keniji tijekom 2020.g. pokazala su značajno smanjenje broja testiranja HIV zbog mnogih prepreka povezanih s pandemijom, poput straha od zaraze virusom SARS-CoV-2 u klinikama za testiranje na HIV te nedostatak sredstava za dolazak u laboratorije za testiranje zbog gubitka posla povezanog s pandemijom (Lagat i sur. 2020). Obzirom na to da je u KZIB bilo moguće testirati se na HIV i u vrijeme lockdown-a, broj novodijagnosticiranih ispitanika tijekom 2020.g. ne odstupa značajnije u usporedbi s razdobljem od 2014.-2017.g. Rezultati ovog istraživanja također pokazuju da pandemija bolesti COVID-19 nije značajno utjecala na postotak KP u grupi ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om dijagnosticirana tijekom 2020.g. u Hrvatskoj. Međutim, značajno je istaknuti da je pandemija bolesti COVID-19 možda utjecala na udio slučajeva sa uznapredovalom HIV infekcijom pri dijagnozi jer je postotak jako kasne prezentacije u ispitanika kod kojih je zaraza HIV-om otkrivena 2020.g. bio značajno manji u usporedbi s prethodnim godinama. Navedeni rezultati možda su povezani s činjenicom da se u uvjetima pandemije COVID-19 široj javnosti pruža veća količina informacija o zaraznim bolestima što je možda potaknulo određeni broj osoba na ranije testiranje na HIV. Usporedbom ovih rezultata s podacima o KP kod pacijenata dijagnosticiranih s HIV infekcijom tijekom 2018. i 2019.g. omogućila bi se potpunija usporedna analiza trendova KP u razdobljima prije i nakon pandemije COVID-19.

Povišena srednja vrijednost postotka aktiviranih CD38+ citotoksičnih T-limfocita (CD3+/CD8+; CTL) u osoba zaraženih HIV-om u odnosu na zdrave osobe pokazuje da je proupalni stanični imunosni odgovor iznimno značajan u patogenezi infekcije HIV-om te da imunosni sustav kontinuirano pokušava uspostaviti kontrolu nad virusnom replikacijom. Imunosni odgovor posredovan CTL iznimno je značajan tijekom akutne faze infekcije tijekom koje HIV-specifični CD8+ T-limfociti učinkovito induciraju staničnu smrt zaraženih stanica lučenjem perforina i granzima. Međutim, njihova učinkovitost u kontroli virusne replikacije tijekom kronične faze infekcije značajno je niža u usporedbi s akutnom fazom (McBrien i sur. 2018). Navedeni rezultati povezuju se s izbjegavanjem imunosnog odgovora od strane virusa kao i s gubitkom funkcije te iscrpljenosti T-limfocita tijekom kronične faze infekcije (McBrien i sur. 2018).

Aktivacija stanica imunološkog sustava prati se pomoću analize ekspresije antigena ljudskih leukocita (poput HLA-DR) koji su eksprimirani na površini T-limfocita nakon stimulacije antigenima ili mitogenima (Erokhina i sur. 2021) te praćenjem klasičnih biljega stanične aktivacije poput CD38 ili CD69 koji su eksprimirani na aktiviranim CD8⁺ T-limfocitima (Musyoki i sur. 2014). Praćenje imunološke aktivacije iznimno je značajno jer su brojna istraživanja pokazala značajnost ovog mehanizma u nastanku deficijencije imunskog sustava u infekciji HIV-om (de Paula i sur. 2018; Sokoya i sur. 2017). Također, novija istraživanja su pokazala da je postotak aktiviranih T-limfocita bolji prognostički biljeg mortaliteta HIV-om zaraženih osoba u usporedbi s virusnim opterećenjem i brojem CD4⁺ T-limfocita (McBrien i sur. 2018). Povišene vrijednosti aktiviranih HLA-DR⁺ T-limfocita i CD38⁺CD8⁺ T-limfocita u osoba zaraženih HIV-om u usporedbi sa zdravim osobama sukladni su rezultatima prethodnih istraživanja u kojima je aktivacija T-limfocita dokazana tijekom svih faza infekcije HIV-om (Sokoya i sur. 2017). Negativna korelacija aktiviranih T-limfocita (CD3⁺/HLA-DR⁺) i ukupnog broja CD4⁺ stanica/ μ l također sugerira kako aktivacija T-stanica doprinosi patogenezi kod infekcije HIV-om. Nadalje, zabilježena korelacija između aktiviranih T-limfocita (CD3⁺/HLA-DR⁺), aktiviranih CD8⁺ T-limfocita (CD8⁺/CD38⁺) i virusnog opterećenja bila je očekivana s obzirom da su aktivirani T-limfociti i aktivirani CD8⁺ T-limfociti usko povezani i daju sličnu informaciju te su osjetljivi na povišene vrijednosti viremije zbog izravne imunске aktivacije od strane virusnih proteina, ali i drugih mogućih mehanizama imunološke aktivacije (Sokoya i sur. 2017).

Sniženje omjera CD4⁺/CD8⁺ T-limfocita kao još jednog značajnog parametra imunološkog statusa također ukazuje na opsežnu deficijenciju stanične imunosti te depleciju CD4⁺ T-limfocita (Han i sur. 2018; Saracino i sur. 2014). Inverzija omjera CD4⁺/CD8⁺ T-limfocita nije specifična za zarazu HIV-om već je opisana u bolesnika sa sistemskim lupusom, dijabetesom tipa 1 kao i u malignim bolestima (McBride i Striker 2017).

Porast subpopulacije CD8⁺ T-limfocita karakterističan je za ranu fazu akutne infekcije HIV-om, pojavljuje se prije značajnog smanjenja broja CD4⁺ T-limfocita i zadržava se tijekom kronične faze infekcije što rezultira sniženjem omjera CD8⁺ T-limfocita (Trickey i sur. 2017). Iako dugotrajna primjena ART-a omogućuje rekonstituciju subpopulacije CD4⁺ T-limfocita, potrebno je istaknuti da omjer CD4⁺/CD8⁺ T-limfocita rijetko ponovno doseže normalnu razinu zbog visoke razine cirkulirajućih CD8⁺ T-stanica (Hocqueloux i sur. 2013; McBride i Striker 2017). Rezultati brojnih istraživanja potvrđuju povezanost niskog omjera CD4⁺/CD8⁺ T-limfocita s većim mortalitetom uzrokovanim AIDS-om kod pacijenata na ART-u (Mussini i

sur. 2015; Trickey i sur. 2017). Također, McBride i Striker (2017) ističu potencijal omjera CD4+/CD8+ T-limfocita kao markera veličine latentnih rezervoara HIV-a s ozbirom da su prethodna istraživanja pokazala negativnu korelaciju između omjera CD4+/CD8+ T-limfocita i razine provirusne DNA HIV-a u CD4+ T-limfocitima. Nadalje, nemogućnost normalizacije CD4+/CD8+ omjera unatoč dugotrajnom ART-u i postignutoj supresiji virusa povezana je i s povećanim rizikom od morbiditeta i mortaliteta od drugih infektivnih i malignih bolesti koje su uobičajene u osoba sa simptomatskom fazom HIV-bolesti (Han i sur. 2018; McBride i Striker 2017; Trickey i sur. 2017).

6. ZAKLJUČAK

Otkrivanje HIV-infekcije u fazi opsežne deficijencije stanične imunosti koja se procjenjuje temeljem smanjenja broja CD4+ T-limfocita na manje od 350 stanica po μ l krvi te je povezana s kasnim uključivanjem u skrb i odgodom primjene antivirusnog liječenja inhibitorima reverzne transkriptaze, proteaze i integraze predstavlja značajan izazov za znanstvenu zajednicu u Hrvatskoj. Značajno veći broj CD4+ T-limfocita pri dijagnozi koji je dokazan u osoba kod kojih je zaraza otkrivena 2020.g. u usporedbi s prethodnim razdobljima ukazuje na povoljne trendove u smislu ranijeg otkrivanja zaraze HIV-om u Hrvatskoj. Pri tome je značajno istaknuti da nepovoljan učinak pandemije uzrokovane virusom SARS-CoV-2 na udio slučajeva kasne prezentacije u skrb kod osoba zaraženih HIV-om nije dokazan. Međutim, udio HIV-om zaraženih osoba koje su se kasno prezentirale u skrb te imaju opsežnu deficijenciju stanične imunosti, smanjen potencijal za imunološku rekonstituciju te opsežne latentne rezervoare virusa u limfatičkim organima je još uvijek značajan.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na povezanost kinetike virusne replikacije i opsega stanične aktivacije u HIV-om zaraženih osoba koja ne iskazuje direktnu povezanost s kinetikom progresivne deplecije CD4+ T-limfocita iz čega zaključujemo da je opravdana hipoteza o kompleksnim mehanizmima patogeneze ove bolesti koja uključuje virusom-potaknutu apoptozu ciljanih stanica te aktivaciju brojnih mehanizama imunskog sustava.

7. LITERATURA

Ait-Ammar A., Kula A., Darcis G., Verdikt R., Wit S. De, Gautier V., Mallon P.W.G., Marcello A., Rohr O., Van Lint C. (2020): Current Status of Latency Reversing Agents Facing the Heterogeneity of HIV-1 Cellular and Tissue Reservoirs. *Front. Microbiol.* 10: .

Antinori A., Coenen T., Costagliola D., Dedes N., Ellefson M., Gatell J., Girardi E., Johnson M., Kirk O., Lundgren J., Mocroft A., D'Arminio Monforte A., Phillips A., Raben D., Rockstroh J., Sabin C., Sönnnerborg A., De Wolf F. (2011): Late presentation of HIV infection: a consensus definition. *HIV Med.* 12: 61–64.

Anyimadu H., Pingili C., Sivapalan V., Hirsch-Moverman Y., Mannheimer S. (2018): The Impact of Absolute CD4 Count and Percentage Discordance on *Pneumocystis Jirovecii* Pneumonia Prophylaxis in HIV-Infected Patients. *J. Int. Assoc. Provid. AIDS Care* 17: .

Barre-Sinoussi F., Chermann J., Rey F., Nugeyre M., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220: 868–871.

Barré-Sinoussi F., Ross A.L., Delfraissy J.-F. (2013): Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 877–883.

Barton K., Winckelmann A., Palmer S. (2016): HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. *Trends Microbiol.* 24: 345–355.

Beloukas A., Psarris A., Giannelou P., Kostaki E., Hatzakis A., Paraskevis D. (2016): Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. *Infect. Genet. Evol.* 46: 180–189.

Cervera L., Gòdia F., Tarrés-Freixas F., Aguilar-Gurrieri C., Carrillo J., Blanco J., Gutiérrez-Granados S. (2019): Production of HIV-1-based virus-like particles for vaccination: achievements and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103: 7367–7384.

Checkley M.A., Luttge B.G., Freed E.O. (2011): HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation. *J. Mol. Biol.* 410: 582–608.

Natural History Project Working Group for the Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe (COHERE) in EuroCoord (2014): Factors associated with short-term changes in HIV viral load and CD4+ cell count in antiretroviral-naive individuals. *AIDS* 28: 1351–1356.

Darcis G., Lambert I., Sauvage A.-S., Frippiat F., Meuris C., Uurlings F., Lecomte M., Léonard P., Giot J.-B., Fombellida K., Vaira D., Moutschen M. (2018): Factors associated with late presentation for HIV care in a single Belgian reference center: 2006–2017. *Sci. Rep.* 8: 8594.

Darling K., Hachfeld A., Cavassini M., Kirk O., Furrer H., Wandeler G. (2016): Late presentation to HIV care despite good access to health services: current epidemiological trends and how to do better. *Swiss Med. Wkly.*

Deeks S.G., Overbaugh J., Phillips A., Buchbinder S. (2015): HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1: 15035.

Dessie Z.G., Zewotir T., Mwambi H., North D. (2020): Modelling of viral load dynamics and CD4 cell count progression in an antiretroviral naive cohort: using a joint linear mixed and multistate Markov model. *BMC Infect. Dis.* 20: 246.

Doitsh G., Galloway N.L.K., Geng X., Yang Z., Monroe K.M., Zepeda O., Hunt P.W., Hatano H., Sowinski S., Muñoz-Arias I., Greene W.C. (2014): Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505: 509–514.

Drew R., Rice B., Rüütel K., Delpech V., Attawell K., Hales D., Velasco C., Amato-Gauci A., Pharris A., Tavoschi L., Noori T. (2017): HIV continuum of care in Europe and Central Asia. *HIV Med.* 18: 490–499.

Engelman A., Cherepanov P. (2012): The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 279–290.

Erokhina S.A., Streltsova M.A., Kanevskiy L.M., Grechikhina M. V., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. (2021): HLA-DR-expressing NK cells: Effective killers suspected for antigen presentation. *J. Leukoc. Biol.* 109: 327–337.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2020): HIV/AIDS surveillance in Europe 2020 (2019 data) (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hiv-aids-surveillance-europe-2020-2019-data>) (pristup: rujan 2021)

Farahani M., Novitsky V., Wang R., Bussmann H., Moyo S., Musonda R.M., Moeti T., Makhema J.M., Essex M., Marlink R. (2016): Prognostic Value of HIV-1 RNA on CD4 Trajectories and Disease Progression Among Antiretroviral-Naive HIV-Infected Adults in Botswana: A Joint Modeling Analysis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 32: 573–578.

Fenwick C., Joo V., Jacquier P., Noto A., Banga R., Perreau M., Pantaleo G. (2019): T-cell exhaustion in HIV infection. *Immunol. Rev.* 292: 149–163.

- Freed E.O. (2015): HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* 13: 484–496.
- German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup ‘Assessment of Pathogens Transmissible by Blood’ (2016): Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus. Med. Hemotherapy* 43: 203–222.
- Giovanetti M., Ciccozzi M., Parolin C., Borsetti A. (2020): Molecular Epidemiology of HIV-1 in African Countries: A Comprehensive Overview. *Pathogens* 9: 1072.
- Goicoechea M., Haubrich R. (2005): CD4 Lymphocyte Percentage versus Absolute CD4 Lymphocyte Count in Predicting HIV Disease Progression: An Old Debate Revisited. *J. Infect. Dis.* **192**: 945–947.
- Graham N.M.H., Park L.P., Piantadosi S., Phair J.P., Mellors J., Fahey J.L., Saah A.J. (1995): Prognostic Value of Combined Response Markers Among Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons: Possible Aid in the Decision to Change Zidovudine Monotherapy. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 352–362.
- Guo J., Liu X., Wu C., Hu J., Peng K., Wu L., Xiong S., Dong C. (2018): The transmembrane nucleoporin Pom121 ensures efficient HIV-1 pre-integration complex nuclear import. *Virology* 521: 169–174.
- Haber N., Pillay D., Porter K., Bärnighausen T. (2016): Constructing the cascade of HIV care. *Curr. Opin. HIV AIDS* 11: 102–108.
- Han W.M., Apornpong T., Kerr S.J., Hiransuthikul A., Gatechompol S., Do T., Ruxrungtham K., Avihingsanon A. (2018): CD4/CD8 ratio normalization rates and low ratio as prognostic marker for non-AIDS defining events among long-term virologically suppressed people living with HIV. *AIDS Res. Ther.* 15: 13.
- He S., Wu Y. (2019): Relationships Between HIV-Mediated Chemokine Coreceptor Signaling, Cofilin Hyperactivation, Viral Tropism Switch and HIV-Mediated CD4 Depletion. *Curr. HIV Res.* 17: 388–396.
- Hingrat Q. Le, Sereti I., Landay A.L., Pandrea I., Apetrei C. (2021): The Hitchhiker Guide to CD4+ T-Cell Depletion in Lentiviral Infection. A Critical Review of the Dynamics of the CD4+ T Cells in SIV and HIV Infection. *Front. Immunol.* 12: .

Hocqueloux L., Avettand-Fènoël V., Jacquot S., Prazuck T., Legac E., Mélard A., Niang M., Mille C., Moal G. Le, Viard J.-P., Rouzioux C. (2013): Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J. Antimicrob. Chemother.* 68: 1169–1178.

International Committee on Taxonomy of Viruses (<https://talk.ictvonline.org/>) (pristup: listopad 2020.)

Hu X., Liang B., Zhou C., Jiang J., Huang J., Ning C., Liu J., Zhou B., Zang N., Lai J., Chen R., Liao Y., Pan P., Liu X., Lan G., Pang X., Ye L., Shen Z., Liang H. (2019): HIV late presentation and advanced HIV disease among patients with newly diagnosed HIV/AIDS in Southwestern China: a large-scale cross-sectional study. *AIDS Res. Ther.* 16: 6.

Kristoff J., Haret-Richter G., Ma D., Ribeiro R.M., Xu C., Cornell E., Stock J.L., He T., Mobley A.D., Ross S., Trichel A., Wilson C., Tracy R., Landay A., Apetrei C., Pandrea I. (2014): Early microbial translocation blockade reduces SIV-mediated inflammation and viral replication. *J. Clin. Invest.* 124: 2802–2806.

Kumar M. (2017): Study of Viral Load and CD4 Count in Diagnosis of HIV-1 Positive Patients. *J. Fam. Med.* 4: .

Lagat H., Sharma M., Kariithi E., Otieno G., Katz D., Masyuko S., Mugambi M., Wamuti B., Weiner B., Farquhar C. (2020): Impact of the COVID-19 Pandemic on HIV Testing and Assisted Partner Notification Services, Western Kenya. *AIDS Behav.* 24: 3010–3013.

Li H., Omange R.W., Plummer F.A., Luo M. (2017): A novel HIV vaccine targeting the protease cleavage sites. *AIDS Res. Ther.* 14: 51.

Lin X., Garg S., Mattson C.L., Luo Q., Skarbinski J. (2016): Prescription of Pneumocystis Jiroveci Pneumonia Prophylaxis in HIV-Infected Patients. *J. Int. Assoc. Provid. AIDS Care* 15: 455–458.

McBride J.A., Striker R. (2017): Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLOS Pathog.* 13: e1006624.

McBrien J.B., Kumar N.A., Silvestri G. (2018): Mechanisms of CD8 + T cell-mediated suppression of HIV/SIV replication. *Eur. J. Immunol.* 48: 898–914.

Montagnier L. (1999): Human Immunodeficiency Viruses (Retroviridae). *Encycl. Virol.* 763–774.

Mussini C., Lorenzini P., Cozzi-Lepri A., Lapadula G., Marchetti G., Nicastri E., Cingolani A., Lichtner M., Antinori A., Gori A., Monforte A. d'Arminio (2015): CD4/CD8 ratio normalisation and non-AIDS-related events in individuals with HIV who achieve viral load suppression with

antiretroviral therapy: an observational cohort study. *Lancet HIV* 2: e98–e106.

Musumeci D., Riccardi C., Montesarchio D. (2015): G-Quadruplex Forming Oligonucleotides as Anti-HIV Agents. *Molecules* 20: 17511–17532.

Musyoki S., Mining S., Nyongesa P. (2014): Level of CD8 T Lymphocytes Activation in HIV-Infected Pregnant Women: In the Context of CD38 and HLA-DR Activation Markers. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2014: 1–4.

Nyamweya S., Hegedus A., Jaye A., Rowland-Jones S., Flanagan K.L., Macallan D.C. (2013): Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev. Med. Virol.* 23: 221–240.

Oroz M., Begovac J., Planinić A., Rokić F., Lunar M.M., Zorec T.M., Beluzić R., Korać P., Vugrek O., Poljak M., Lepej S.Ž. (2019): Analysis of HIV-1 diversity, primary drug resistance and transmission networks in Croatia. *Sci. Rep.* 9: 17307.

Osborne O., Peyravian N., Nair M., Daunert S., Toborek M. (2020): The Paradox of HIV Blood–Brain Barrier Penetration and Antiretroviral Drug Delivery Deficiencies. *Trends Neurosci.* 43: 695–708.

Ozorowski G., Pallesen J., Val N. de, Lyumkis D., Cottrell C.A., Torres J.L., Copps J., Stanfield R.L., Cupo A., Pugach P., Moore J.P., Wilson I.A., Ward A.B. (2017): Open and closed structures reveal allostery and pliability in the HIV-1 envelope spike. *Nature* 547: 360–363.

Paula H.H.S. de, Ferreira A.C.G., Caetano D.G., Delatorre E., Teixeira S.L.M., Coelho L.E., João E.G., Andrade M.M. de, Cardoso S.W., Grinsztejn B., Veloso V.G., Morgado M.G., Guimarães M.L., Côrtes F.H. (2018): Reduction of inflammation and T cell activation after 6 months of cART initiation during acute, but not in early chronic HIV-1 infection. *Retrovirology* 15: 76.

Ren L., Li J., Zhou S., Xia X., Xie Z., Liu P., Xu Y., Qian Y., Zhang H., Ma L., Pan Q., Wang K. (2017): Prognosis of HIV Patients Receiving Antiretroviral Therapy According to CD4 Counts: A Long-term Follow-up study in Yunnan, China. *Sci. Rep.* 7: 9595.

Rodrigues V., Ruffin N., San-Roman M., Benaroch P. (2017): Myeloid Cell Interaction with HIV: A Complex Relationship. *Front. Immunol.* 8: .

Saracino A., Bruno G., Scudeller L., Volpe A., Caricato P., Ladisa N., Monno L., Angarano G. (2014): Chronic Inflammation in a Long-Term Cohort of HIV-Infected Patients According to the Normalization of the CD4:CD8 Ratio. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 30: 1178–1184.

Sokoya T., Steel H.C., Nieuwoudt M., Rossouw T.M. (2017): HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators Inflamm.* 2017: 1–16.

Trickey A., May M.T., Schommers P., Tate J., Ingle S.M., Guest J.L., Gill M.J., Zangerle R., Saag M., Reiss P., Monforte A. d'Arminio, Johnson M., Lima V.D., Sterling T.R., Cavassini M., Wittkop L., Costagliola D., Sterne J.A.C., Boule A., Stephan C., Miro J.M., Cavassini M., Chêne G., Costagliola D., Dabis F., Monforte A.D., Amo J. del, Sighem A. Van, Vehreschild J.J., Gill J., Guest J., Haerry D.H.-U., Hogg R., Justice A., Shepherd L., Obel N., Crane H.M., Smith C., Reiss P., Saag M., Sterling T., Teira R., Williams M., Zangerle R., Sterne J., May M., Ingle S., Trickey A. (2017): CD4:CD8 Ratio and CD8 Count as Prognostic Markers for Mortality in Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients on Antiretroviral Therapy: The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CC). *Clin. Infect. Dis.* 65: 959–966.

The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Global HIV & AIDS statistics - 2020 fact sheet (<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>) (pristup: rujan 2021)

Vanhamel J., Bruggemans A., Debyser Z. (2019): Establishment of latent HIV-1 reservoirs: what do we really know? *J. virus Erad.* 5: 3–9.

World health organization (WHO) (Geneva, 2021). Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service delivery and monitoring: recommendations for a public health approach (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572729/>) (Pristup: rujan 2021.).

Wong M.E., Jaworowski A., Hearps A.C. (2019): The HIV Reservoir in Monocytes and Macrophages. *Front. Immunol.* 10: .

Zitzmann C., Kaderali L. (2018): Mathematical Analysis of Viral Replication Dynamics and Antiviral Treatment Strategies: From Basic Models to Age-Based Multi-Scale Modeling. *Front. Microbiol.* 9: .

Zoufaly A., an der Heiden M., Marcus U., Hoffmann C., Stellbrink H., Voss L., Lunzen J. van, Hamouda O. (2012): Late presentation for HIV diagnosis and care in Germany. *HIV Med.* 13: 172–181.

8. ŽIVOTOPIS

Obrazovanje

2019.-2021. Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski studij molekularne biologije

2016.-2019. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij

2012.-2016. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci

Iskustvo u struci

Laboratorijska stručna praksa:

Odjel za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ pod mentorstvom doc. Dr. sc. Snježane Židovec-Lepej

Osobne i komunikacijske vještine

Materinski jezik: hrvatski Strani jezici: Engleski (B2)

Digitalna kompetencija: Windows; Microsoft office paket (Word, Excel, Powerpoint); SPSS statistics; Mendeley

Vozačka dozvola B kategorije