

# Citokini u infekciji virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1

---

Gorenec, Lana

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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:217:216055>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-22**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Lana Gorenc

# **CITOKINI U INFEKCIJI VIRUSOM LJUDSKE IMUNODEFICIJENCIJE TIP 1**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Lana Gorenec

**CYTOKINES IN HUMAN  
IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1  
INFECTION**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015

Ovaj doktorski rad izrađen je u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb, pod vodstvom dr.sc. Snježane Židovec Lepej, znanstvene savjetnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

*Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Snježani Židovec Lepej na stručnim savjetima, uspješnoj znanstvenoj suradnji, uloženom trudu i pomoći pri izradi ovog rada.*

*Također se zahvaljujem prof.dr.sc. Josipu Begovcu na pomoći pri odabiru ispitanika i analizi rezultata ovog istraživanja.*

*Članovima Povjerenstva za ocjenu doktorskog rada, prof.dr.sc. Nadi Oršolić, prof.dr.sc. Mirni Ćurković Perica, dr.sc. Maji Šantak i zamjeni dr.sc. Dubravku Forčiću hvala na uloženom trudu i savjetima kako bi ovaj doktorski rad dobio svoj završni oblik.*

*Posebno se zahvaljujem kolegicama iz Odjela za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju Klinike za infektivne bolesti, dr.sc. Ivani Grgić, dr.sc. Ani Planinić, mag. med. biok. Janji Iščić-Beš, prof. biol. Bruni Bolarić, mag. mol. biol. Ivani Baća Vrakela, mag. mol. biol. Nataši Kutela Krilić i Jasni Ćosić, bacc. med. lab. diagn., na uspješnom zajedničkom radu i ugodnom radnom okruženju.*

*Mojim dragim roditeljima i bratu veliko hvala na beskrajnoj ljubavi. Vaše razumijevanje i podrška zaslužni su za ostvarenje svih mojih dosadašnjih uspjeha.*

**CITOKINI U INFEKCIJI VIRUSOM LJUDSKE IMUNODEFICIJENCIJE TIPA 1**

LANA GORENEC

Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti ekspresiju citokina na razini gena i proteina u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1, te analizirati učinak dugotrajne supresije virusne replikacije u periodu duljem od dvije godine na citokinsku imunost. U dio istraživanja koji se bavi usporedbom citokinske imunosti na proteinskoj razini u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije uključila sam 34 ispitanika, dok sam u istraživanje učinka dugotrajne supresije virusne replikacije na ekspresiju citokina u infekciji HIV-om-1 uključila 80 ispitanika. Ekspresiju 84 citokinska gena analizirala sam u tri ispitanika u akutnoj i tri u kroničnoj infekciji HIV-om-1 metodom „PCR array“. Za kvantifikaciju Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 citokina primjenila sam citometriju pomoću kuglica (bead-based cytometry). U kroničnoj infekciji HIV-om-1 dokazala sam statistički značajno povećanje ekspresije 13 citokinskih gena (*cd40lg*, *csf2*, *ifna5*, *il12b*, *il1b*, *il20*, *lta*, *osm*, *spp1*, *tgfa*, *tnfsf 11,14* i *8*), te sniženje ekspresije *il12a*. U akutnoj fazi je u odnosu na kontrolnu skupinu došlo do povećanja koncentracija IL-10, IL-4 i TNF- $\alpha$ . Povećane koncentracije IL-10 i TNF- $\alpha$ , te uz njih IL-2, IL-6, IL-13 i IL-22 otkrivene su u kroničnoj infekciji u odnosu na kontrolu. Usporedbom ekspresije citokina između dviju faza infekcije HIV-om-1 vidljivo je smanjenje koncentracija IL-9. Koncentracija IL-17A snižena je u ispitanika prije primjene antiretrovirusne terapije, a kod kojih je dokazana supresija virusne replikacije. Ekspresija aktivacijskih biljega CD38 i HLA-DR snižena je u kroničnoj u odnosu na akutnu infekciju, te u supresiji virusne replikacije u odnosu na uzorke prije primjene terapije. U ovom je istraživanju dokazana promjena citokinskih profila u infekciji HIV-om-1 između akutne i kronične faze na razini genske i proteinske ekspresije.

(131 stranica, 36 slika, 16 tablica, 158 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: HIV tipa 1, biološki modulatori imunskog odgovora, imunosna aktivacija

Mentor: dr. sc. Snježana Židovec Lepej, znanstvena savjetnica

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Nada Oršolić

prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

dr. sc. Maja Šantak, viša znanstvena suradnica

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

## **CYTOKINES IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 INFECTION**

LANA GORENEC

University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

The aim of this study was to compare cytokine expression on both gene and protein levels in acute and chronic phase of HIV type 1 infection and to analyze the effect of long-term suppression of viral replication in period longer than 2 years on cytokine immunity. To analyze cytokine expression on protein level in acute and chronic phase of HIV type 1 infection 34 patients were enrolled and the effect of long-term suppression of viral replication was determined in 80 HIV-positive patients. Using PCR array technology, expression of 84 cytokine genes was measured in 3 patients in acute and 3 patients in chronic phase of HIV type 1 infection. Bead-based cytometry was used to quantify levels of Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 cytokines. The results showed statistically significant increase of 13 cytokine gene expression (*cd40lg*, *csf2*, *ifna5*, *il12b*, *il1b*, *il20*, *lta*, *osm*, *spp1*, *tgfa*, *tnfsf 11*, *14* and *8*) and down regulation of the *il12a* expression in chronic HIV type 1 infection. Concentrations of IL-10, IL-4 and TNF- $\alpha$  were increased in the acute HIV type 1 infection when compared to control group. During chronic HIV type 1 infection there was an increase of IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-13 and IL-22 levels when compared to control group. Comparison of cytokine expression between two stages of infection showed significant decrease in IL-9 concentration. Level of IL-17 was lower in therapy-naive patients with a suppression of viral replication. Expression of activation markers CD38 and HLA-DR was lower in a chronic stage of infection compared to acute infection as well as in samples with suppression of viral replication compared to samples before therapy initiation. This study showed change in cytokine profile in both gene and protein expression in different stages of HIV-infection.

(131 pages, 36 figures, 16 tables, 158 references, original in Croatian)

Keywords: HIV type 1, biological response modifiers, immune activation

Supervisor: Snježana Židovec Lepej, PhD, Scientific Advisor

Reviewers: Prof Nada Oršolić, PhD

Prof Mirna Ćurković Perica, PhD

Maja Šantak, PhD, Senior Associated Researcher

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Definicija problema .....	1
1.2 Ciljevi rada .....	2
1.3 Radne hipoteze .....	2
1.4 Zadaci rada i metodologija istraživanja.....	2
2. LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1 Virus ljudske imunodeficijencije.....	4
2.1.1. Klasifikacija i porijeklo HIV-a.....	4
2.1.2. Struktura viriona i genom HIV-a tipa 1.....	5
2.1.3. Životni ciklus HIV-a tipa 1.....	7
2.1.4. Imunopatogeneza infekcije HIV-om-1 .....	10
2.1.5. Urođena imunost u infekciji HIV-om-1 .....	13
2.1.6. Humoralna imunost u infekciji HIV-om-1 .....	16
2.1.7. Specifični stanični odgovor .....	17
2.1.8. Citokini .....	18
2.1.9. Aktivacija imunskog sustava u infekciji HIV-om-1 .....	24
2.1.10. Antiretrovirusna terapija i imunski oporavak u infekciji HIV-om-1 .....	25
3. MATERIJALI I METODE .....	27
3.1 Ispitanici .....	27
3.2 Biološki uzorci .....	27
3.3 Reagencije i otopine .....	28
3.3.1. Reagencije i otopine za protočnu citometriju.....	28
3.3.2. Reagencije i otopine za određivanje koncentracija citokina u plazmi primjenom citometrije pomoću kuglica (bead-based cytometry).....	30
3.3.3. Reagencije i otopine za određivanje ekspresije citokinskih gena metodom „PCR Array“ .	31
3.3.4. Reagencije i otopine za određivanje broja kopija HIV-1 RNA u plazmi .....	32



3.4 Oprema, računalni programi i potrošni materijal .....	33
3.5 Metode.....	35
3.5.1. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi.....	35
3.5.2. Određivanje koncentracija citokina u plazmi primjenom citometrije pomoću kuglica (engl. bead-based cytometry).....	37
3.5.3. Kvantifikacija HIV-1 RNA u plazmi .....	40
3.5.4. Izolacija RNA iz pune krvi.....	40
3.5.5. Sinteza prvog lanca cDNA .....	41
3.5.6. Određivanje ekspresije citokinskih gena metodom „PCR Array“ .....	42
3.5.7. Statističke analize .....	43
4. REZULTATI.....	44
4.1 Usporedba citokinske ekspresije na razini gena i proteina u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1 .....	44
4.1.1. Usporedba ekspresije gena koji kodiraju sintezu citokina iz porodica interleukina, interferona, čimbenika rasta, porodice TGF- $\beta$ , porodice TNF- $\alpha$ i ostalih citokina u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1 .....	44
4.1.2. Usporedba ekspresije Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina u akutnoj i kroničnoj infekciji HIV-om-1 .....	50
4.1.3. Ekspresija aktivacijskih biljega HLA-DR i CD38 na limfocitima T u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1 .....	73
4.2 Longitudinalna analiza učinka dugotrajne supresije virusne replikacije na ekspresiju Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina.....	75
4.2.1. Ekspresija aktivacijskih biljega HLA-DR i CD38 na limfocitima T u infekciji HIV-om-1 tijekom dugotrajne supresije virusne replikacije .....	91
5. RASPRAVA.....	93
6. ZAKLJUČCI.....	103
7. LITERATURA.....	104
8. PRILOZI.....	120
9. ŽIVOTOPIS .....	129



## 1. UVOD

Virus ljudske imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*, HIV) pripada porodici *Retroviridae*, podporodici *Orthorethrovirinae* i rodu *Lentivirus* (prema International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Kao i u ostalih virusa istoga roda, infekcija HIV-om karakterizirana je dugom inkubacijskom fazom, odnosno periodom od ulaska virusa u stanice domaćina do razvoja simptomatske bolesti (Murphy, 2012). Najčešće ciljne stanice u kojima dolazi do replikacije HIV-a su memorijski CCR5+CD4+ limfociti T, makrofagi i dendritičke stanice (Koppensteiner i sur., 2012). Do fuzije virusa i ciljne stanice dolazi preko staničnog receptora CD4 i jednog od dva kemokinska koreceptora CCR5 ili CXCR4 (Schuitemaker i sur., 2010). Glavno obilježje infekcije HIV-om je progresivno iscrpljivanje CD4+ limfocita T i kronična aktivacija gotovo svih komponenti imunskog sustava (Haas i sur., 2011). Aktivacija stanične imunosti može se analizirati određivanjem ekspresije biljega aktivacije na pojedinim staničnim subpopulacijama te analizom citokinske imunosti. Efektorska funkcija pomoćničkih CD4+ limfocita T ovisi o citokinskoj imunosti. Naivni CD4+ limfocit T diferencira se u efektorsku stanicu nakon prepoznavanja antigena predočenog u kontekstu molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti na antigen-predočnim stanicama (Murphy, 2012). Ovisno o citokinskom okolišu, CD4+ limfociti T diferenciraju se u Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 te u regulacijske (Treg) i folikularne (Tfh) efektorske populacije stanica koje iskazuju različite biološke funkcije (Reuter, 2012).

### 1.1 Definicija problema

Citokini kao biološki modulatori imunskog odgovora sudjeluju u međustaničnoj komunikaciji, te između ostalog usmjeravaju stanicu koja je primila signal bilo u proliferaciju, diferencijaciju, migraciju, lučenje dodatnih citokina ili u smrt. Zbog uloge u određivanju jačine i trajanja imunodne reakcije lučenje citokina mora biti strogo kontrolirano (Delves i sur., 2011). O citokinskoj imunosti ovisi i efektorska funkcija CD4+ limfocita T. Kinetika sinteze i biološka značajnost Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina u pojedinim fazama infekcije HIV-om-1 kao i učinak dugotrajne supresije virusne replikacije na sintezu navedenih citokina nedostatan je istražen. Literaturni podatci o Th1 i Th2 citokinskim profilima u

infekciji HIV-om-1 su varijabilni, dok neki autori navode postojanje prijelaza s Th1 na Th2 profil (Clerici i Shearer, 1993; Sindhu i sur., 2006) drugi to u svojim istraživanjima opovrgavaju (Graziosi i sur., 1994; Sarih i sur., 1996). O ekspresiji Th9 citokina u infekciji HIV-om-1 za sada nema dostupan niti jedan literaturni podatak. Literaturni podatci o usporedbi profila Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina u akutnoj i kroničnoj infekciji HIV-om-1 te o učinku dugotrajne supresije virusne replikacije primjenom antiretrovirusnih lijekova na citokinski profil u infekciji HIV-om-1 za sada nisu dostupni.

## **1.2 Ciljevi rada**

1. Usporediti ekspresiju Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina u akutnoj/recentnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1
2. Istražiti učinak dugotrajne supresije virusne replikacije primjenom antiretrovirusnih lijekova na citokinsku imunost u infekciji HIV-om-1

## **1.3 Radne hipoteza**

1. Ekspresija gena koji kodiraju sintezu citokina (interleukini, interferoni, čimbenici rasta, porodica TGF- $\beta$ , porodica TNF- $\alpha$ ) u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije je različita.
2. Koncentracije Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1 značajno se razlikuju.
3. Supresija virusne replikacije uzrokuje smanjenje koncentracije Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina u HIV-om zaraženih osoba.

## **1.4 Zadaci rada i metodologija istraživanja**

1. Odabir pacijenata u istraživanje prema uključnim kriterijima

U istraživanje će se uključiti HIV-om zaražene osobe starije od 18 godina liječene u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. U dio istraživanja koji se bavi usporedbom citokinske imunosti na proteinskoj razini u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije bit će uključeno 34 ispitanika. Ekspresija gena koji kodiraju sintezu citokina istražiti će se u 3 ispitanika u akutnoj, te u 3 u kroničnoj infekciji HIV-om-1. U istraživanje učinka dugotrajne

(> 2 godine) supresije virusne replikacije na ekspresiju citokina u infekciji HIV-om-1 bit će uključeno 80 ispitanika. Iz istraživanja će biti isključene HIV-pozitivne trudnice, maloljetnici, kao i HIV-om zaražene osobe kod kojih je došlo do reaktivacije nekih drugih latentnih virusa (npr. virusi iz porodice *Herpesviridae* kao što su citomegalovirus, Epstein-Barrov virus). Kontrolnu skupinu sačinjavat će 22 HIV-negativne osobe zaposlenici Centralnog dijagnostičkog laboratorija Klinike „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

## 2. Odrediti limfocitne subpopulacije limfocita periferne krvi

Metodom protočne citometrije analizirati subpopulacija limfocita periferne krvi primjenom protutijela specifičnih za određene stanične diferencijacijske antigene. Apsolutni broj CD4+ limfocita T odrediti izravno na protočnom citometru korištenjem kvantifikacijskog reagensa Flow-Count fluorospheres. Ovom metodom dobit će se podaci o postotcima limfocita T, limfocita B, CD4+ limfocita T, CD8+ limfocita T, NK stanica te apsolutnom broju CD4+ limfocita T svih ispitanika. Analizirat će se i ekspresija biljega stanične aktivacije HLA-DR (na limfocitima T) i CD38 (na CD8+ limfocitima T).

## 3. Analiza ekspresije citokinskih gena metodom PCR Array

Ukupnu RNA iz pune krvi HIV-1 zaraženih osoba izolirati primjenom reagensa PAXgene RNA Kit, te zatim primjenom reagensa RT<sup>2</sup> First Strand Kit pripremiti cDNA. Pripremljenu cDNA koristiti u analizi ekspresije citokinskih gena pomoću reagensa RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Common Cytokines.

## 4. Kvantifikacija citokina u plazmi

Odrediti Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 citokinski profil primjenom protočne citometrije pomoću kuglica (engl. bead-based cytometry) na koje su vezana protutijela specifična za pojedine citokine.

## 5. Kvantifikacija HIV-1 RNA u plazmi

Odrediti broj kopija HIV-1 RNA u plazmi svih ispitanika uključenih u istraživanje metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu COBAS AmpliPrep/COBAS Taqman HIV-1 Test, version 2.0 i Abbott RealTime HIV-1 testa.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1 Virus ljudske imunodeficijencije

Početkom 80-tih godina 20. stoljeća zabilježena je povećana učestalost neuobičajenih oportunističkih infekcija i malignih oboljenja, među njima pneumonije uzrokovane infekcijom s gljivom *Pneumocystis jiroveci* i Kapošijevog sarkoma, u populaciji homoseksualaca na području Sjedinjenih Američkih Država (SAD). Godine 1983. Luc Montagnier i kolege iz Instituta „Pasteur“ u Parizu izolirali su iz bioptata limfnog čvora homoseksualca s limfadenopatijom novi ljudski retrovirus kojeg su nazvali virusom udruženim s limfadenopatijom (franc. *Lymphadénopathie associé virus*, LAV) (Barré-Sinoussi i sur., 1983). Slijedeće godine Robert Gallo i njegova istraživačka grupa otkrili su u kulturi limfocita T iz krvi bolesnika s limfatičkom leukemijom identičan retrovirus, te su ga nazvali ljudskim virusom leukemije limfocita T tipa III (engl. *Human T-cell leukemia virus III*, HTLV-III) (Gallo i sur., 1984). Kako su oba laboratorija izolirala isti virus, 1986. godine je dogovoreno da se za novootkriveni patogen koristi naziv virus ljudske imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*, HIV), dok je bolest uzrokovana ovim virusom nazvana sindromom stečene imunodeficijencije (engl. *Acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) (Ratner i sur., 1985; Coffin i sur., 1986).

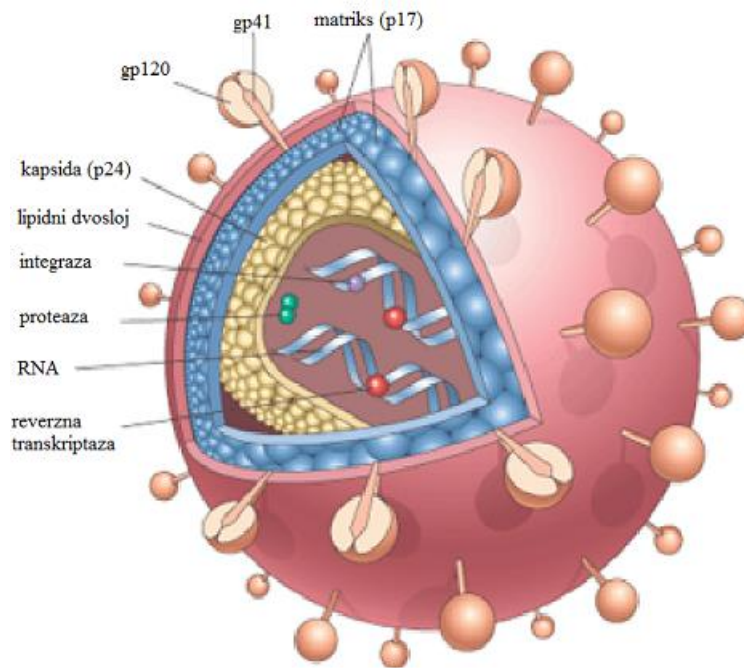
#### 2.1.1. Klasifikacija i porijeklo HIV-a

HIV je pripadnik porodice *Retroviridae*, roda *Lentivirus* i dijeli se u dva tipa, HIV tipa 1 (HIV-1) i tipa 2 (HIV-2). Oba tipa virusa potječu od virusa imunodeficijencije majmuna (engl. *Simian immunodeficiency virus*, SIV), HIV-1 od virusa koji zaražava čimpanze *P. t. troglodytes* (SIV<sub>cpz</sub>) ili gorile *G. g. gorilla* (SIV<sub>gor</sub>), dok je HIV-2 genetski srodniji SIV-u iz mangabejskih majmuna *C. atys* (SIV<sub>sm</sub>) (Santos i Soares, 2010). SIV<sub>cpz</sub> i SIV<sub>gor</sub> su u najmanje četiri neovisna događaja prešli granicu vrsta između primata i ljudi što je dovelo do nastanka četiri grupa HIV-a tipa 1: grupa M (engl. Major), grupa O (engl. Outlier), grupa N (engl. Non M/Non O) i grupa P (Peeters i sur., 2014). Grupa M je prva otkrivena i ujedno odgovorna za pandemiju HIV-1 u svijetu. Temeljem filogenetskih analiza dijeli se u devet subtipova (A-D,

F-H, J, K) i preko 40 cirkulirajućih rekombinantnih formi (CRF) koje nastanu rekombinacijom različitih subtipova. Da bi nastali intersubtipski mozaični virus bio službeno klasificiran kao novi CRF potrebno ga je otkriti u najmanje tri epidemiološki nepovezane osobe (Sharp i Hahn, 2011; Santos i Soares, 2010). Grupa O je manje prevalentna od grupe M i geografski je ograničena na zapad Središnje Afrike, naročito područje Kameruna i Gabona. Od otkrića 1998. godine grupa HIV-1 N je zabilježena u manje od 20 pacijenata iz Kameruna. S područja iste države poznata su i dva za sada jedina slučaja osoba zaraženih HIV-1 grupom P. Nedvojbeno je dokazano da grupe M i N imaju porijeklo u SIV-u koji zaražava čimpanze, dok grupa P filogenetski je bliža SIV-u iz gorila. Za grupu O nije sa sigurnošću utvrđeno porijeklo, iako filogenetska analiza pokazuje da je ona sličnija SIV<sub>gor</sub> nego SIV<sub>cpz</sub> (Vallari i sur., 2011; Peeters i sur., 2014). Najstariji poznati virusni slijed RNA HIV-1 izoliran iz plazme datira iz 1959. godine s područja Léopoldvillea (današnja Kinshasa, Demokratska Republika Kongo). Usporedba tog slijeda s virusnim slijedom RNA porijeklom iz 1960. godine s istog geografskog položaja izoliranom iz bioptata limfnog čvora pokazala je da svaka pripada drugom virusnom subtipu. Slijed RNA iz 1959. godine je subtip D, dok je ona izolirana iz 1960. godine subtip A. Budući svaki subtip predstavlja nekoliko desetljeća neovisne evolucije unutar ljudske populacije, te velike genetske udaljenosti između ova dva uzoraka, smatra se da oba subtipa imaju zajedničkog pretka iz razdoblja prije 1930. godine (Worobey i sur., 2008).

### **2.1.2. Struktura viriona i genom HIV-a tipa 1**

Kao i u ostalih virusa roda Lentivirus, virion HIV-a tipa 1 obavijen je lipidnom ovojnicom koju je virus preuzeo od membrane domaćinske stanice. Izloženi površinski glikoproteini (gp120) vezani su za transmembranske proteine lipidnog dvosloja (gp41), te zajedno sudjeluju u vezanju virusa na stanični receptor i koreceptore, te fuziji virusa i ciljne stanice (Shetty i sur., 2009). Ispod ovojnice nalazi se otprilike 4000-5000 kopija proteina matriksa (p17) i virusna jezgra. Virusnu jezgru čini kapsida s 1000-1500 kopija virusnog proteina p24 unutar koje su dvije kopije virusne RNA, tisuće kopija RNA-vezujućeg proteina nukleokapside (p7) i oko 250 kopija enzima reverzne transkriptaze (RT) i integraze (p31) (Slika 1) (Benjamin i sur., 2005).



Slika 1. Shematski prikaz viriona HIV-1: p17-protein matriksa; gp120 i gp41-glikoproteini virusne ovojnice; p24-kapsidni protein (obrađeno s <http://medicinembbs.blogspot.com/2011/02/diseases-of-immunity.html>)

Genom HIV-1 je molekula jednolančane RNA duljine oko 10 Kb prisutna u virusnoj čestici u dvije kopije. Devet gena kodiranih virusnim genomom mogu se podijeliti u tri funkcionalne grupe: (1) strukturni geni *gag*, *pol* i *env*, (2) regulatorni geni *tat* i *rev* i (3) dodatni geni *vpr*, *vif* i *nef* (Costin, 2007). Na krajevima virusnog genoma nalaze se dugački ponavljajući krajevi (engl. *Long terminal repeat*, LTR) čija je uloga u ugradnji provirusne DNA u genom domaćina, a u LTR-u koji je na 5' kraju genoma se nalazi virusni promotor transkripcije (Janeway i sur., 2005). Protein Gag (engl. *Group antigen*) je poliproteinski prekursor koji sadrži sve strukturne proteine virusa što uključuje proteine matriksa, kapside, nukleokapside i tri kraća peptida SP1 (engl. *Spacer protein 1*), SP2 (engl. *Spacer protein 2*) i p6 (Lee i sur., 2012). Gen *env* (engl. *Envelope*) kodira za jedini površinski eksprimiran virusni protein Env, glikoprotein veličine 160 kD koji se postranlacijski cijepa na gp120 i gp41. Ova dva proteina se spajaju u trimere i ugrađuju u ovojnicu virusa (Arrildt i sur., 2012). Proteinski produkti gena *pol* (engl. *Polymerase*) su virusni enzimi važni za virusnu replikaciju, reverzna transkriptaza, proteaza i integraza (Hill i sur., 2005). Regulatorni protein Tat (engl. *Trans-activator of transcription*) je jedan od ranih virusnih proteina koji se veže za TAR regiju (engl. *Transactivation-responsive region*) smještenu na 5' kraju novonastalog RNA



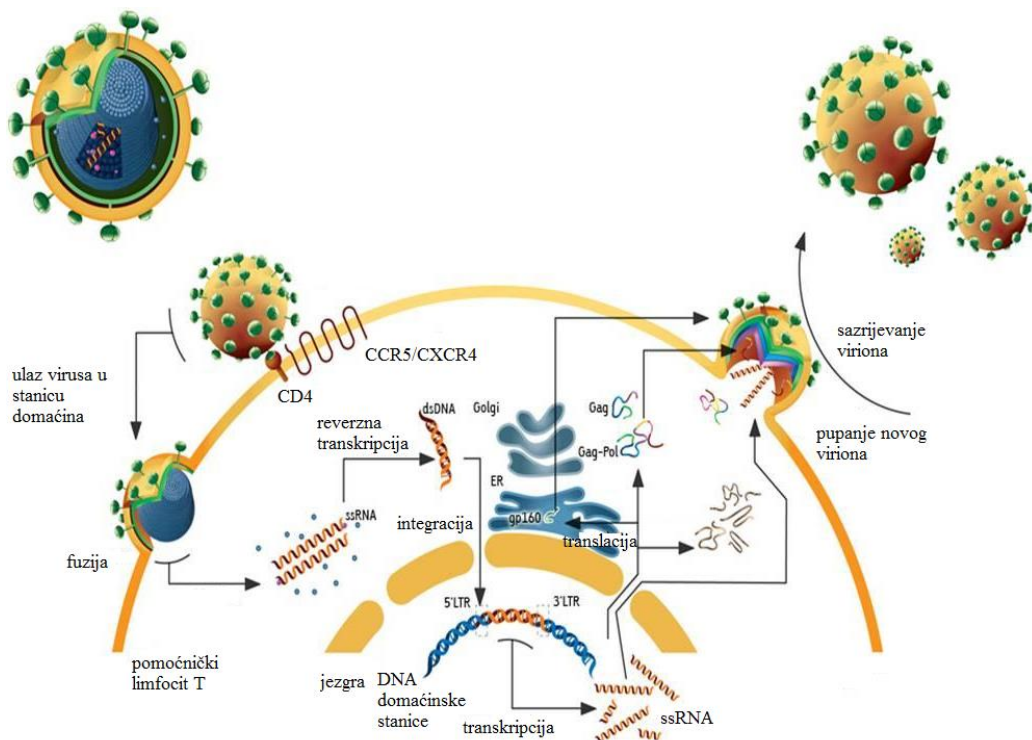
transkripta i omogućuje pozitivnom transkripcijskom elongacijskom faktoru B (engl. *Positive transcriptional factor B*, PTEF-b) fosforilaciju RNA polimeraze II što omogućuje nastavak transkripcije (Das i sur., 2011.; Zhu i sur., 2012). Najvažnija uloga virusnog proteina Rev je posttranskripcijska obrada virusne mRNA. Omogućuje prijenos neprekrojene ili djelomično prekrojene RNA iz jezgre u citoplazmu (Taniguchi i sur., 2014). Protein Vpu uzrokuje razgradnju novonastalih molekula CD4 u endoplazmatskom retikulumu, te omogućuje oslobađanje novih virusa iz HIV-om zaraženih stanica djelujući kao antagonist tetherinu, antivirusnom restrikcijom faktoru (Dube i sur., 2010; McNatt i sur., 2013). Vpr je višefunkcionalan protein i sudjeluje u procesima važnim za izbjegavanje imunskog odgovora domaćina, omogućuje ulazak preintegracijskog kompleksa u jezgru, uzrokuje zastoj staničnog ciklusa u G2 fazi (Kogan i Rappaport, 2011). Proteinski produkt gena *vif* potreban je za patogenezu i širenje virusa spriječavajući djelovanje dviju domaćinskih citidinskih deaminaza iz obitelji APOBEC (engl. *Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like*), APOBEC3G i APOBEC3F. Ovi enzimi ukoliko se upakiraju u pupajući virion uzrokuju letalnu mutagenezu deaminacijom citidina tijekom sinteze negativnog DNA lanca, a Vif potiče njihovu degradaciju u proteasomu (Batisse i sur., 2013). Protein Nef sintetizira se rano u HIV-infekciji, pojačava virusnu replikaciju i preživljenje u zaraženoj stanici i olakšava širenje virusa. Ima ulogu i u smanjenju površinske ekspresije CD4 molekula što je važno za otpuštanje novih virusnih čestica iz zaraženih stanica, te u smanjenju površinske ekspresije molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti klase I (engl. *Major histocompatibility complex class I*, MHC-I) na taj način štiteći zaražene stanice od citotoksičnih limfocita T (Abbas i sur., 2012; Abraham i Fackler, 2012).

### **2.1.3. Životni ciklus HIV-a tipa 1**

Replikacijski ciklus HIV-1 započinje njegovim vezanjem na površinu ciljne stanice što se odvija u nizu koraka koji za cilj imaju oslobađanje virusnog genoma u citoplazmu stanice domaćina. U početku može doći do nekovalentnog međudjelovanja između virusnog proteina gp120 i adhezijskih molekula na površini ciljne stanice među kojima su heparan sulfat proteoglikani, integrin  $\alpha 4\beta 7$  ili lektin tipa C DC-SIGN (engl. *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecular 3-grabbing non-integrin*) (Wilen i sur., 2012a). Vezanje HIV-1 za neku od adhezijskih molekula dovodi gp120 u blizinu specifičnog receptora povećavajući uspješnost infekcije (Dumas i sur., 2014). Stanični receptor za koji se HIV-1

veže je molekula CD4, pripadnik porodice imunoglobulina koji sadrži četiri izvanstanične imunoglobulinske domene, transmembransku domenu i kratki citoplazmatski rep. Ekspimiran je na pomoćničkim limfocitima T, makrofagima i dendritičkim stanicama. Vezno mjesto za CD4 molekulu nalazi se na virusnom proteinu gp120. Vežanjem CD4 na ovo jako konzervirano mjesto aktivira se niz strukturnih promjena samog gp120 i na taj način nastaje koreceptorsko vezno mjesto. Za ulazak u ciljnu stanicu HIV-1 koristi dva kemokinska receptora, CCR5 i/ili CXCR4 što određuje virusni tropizam (Wilén i sur., 2012b). CCR5 je ekspimiran na memorijskim CD4<sup>+</sup> limfocitima T i monocitima/makrofagima, dok naivni i memorijski CD4<sup>+</sup> limfociti T i u manjoj mjeri monociti/makrofagi na svojoj površini ekspimiraju CXCR4 (Loftin i sur., 2010). Virus koji koristi CCR5 kao koreceptor nazivaju se R5, oni koji koriste CXCR4 su X4, dok oni koji koriste oba koreceptora su R5X4 virusi. R5 virusi zastupljeniji su u ranijoj fazi infekcije, a ukoliko dođe do promjene u X4 varijante ona je povezana s bržim smanjenjem broja CD4<sup>+</sup> limfocita T i napredovanjem bolesti prema AIDS-u (Dumas i sur., 2014). Sposobnost R5 virusa da zarazi ciljne stanice s relativno niskom površinskom ekspresijom molekula CD4, kao npr. makrofage i mikroglija, povezana je s jačim afinitetom vezanja virusnog proteina gp120 i receptora kao i većom izloženošću veznog mjesta za molekulu CD4 na gp120. Time je omogućena fuzija virusa i ciljne stanice unatoč ograničenom broju dostupnih receptora (Sterjovski i sur., 2011). U astrocita i bubrežnih epitelnih stanica može doći do infekcije s HIV-1 koja je neovisna o vežanju na receptor CD4 (Maartens i sur., 2014). Vežanjem gp120 za receptor i koreceptor započinje niz konformacijskih promjena virusnog proteina gp41 što rezultira fuzijom virusne i stanične membrane (Garg i sur., 2011). Kao alternativni mehanizam ulaska virusa u ciljnu stanicu predložena je endocitoza iako njena uloga u produktivnoj infekciji različitih tipova stanica još nije potvrđena (Melikyan, 2014). Nakon fuzije HIV-1 i stanične membrane, nukleokapsida ulazi u stanicu domaćina, oslobađa se virusna RNA i započinje reverzna transkripcija. Virusna reverzna transkriptaza posjeduje dvije enzimске aktivnosti, DNA polimeraznu gdje kalup može biti RNA ili DNA, te ulogu RNaze H koja cijepa RNA lanac u RNA-DNA dupleksu. Rezultat reverzne transkripcije virusne RNA je dvolančana DNA koja zajedno s virusnim proteinima čini preintegracijski kompleks koji ulazi u jezgru stanice domaćina. Do integracije virusne DNA najčešće dolazi u transkripcijski aktivnim dijelovima genoma domaćina kako bi se osigurala što brža transkripcija HIV-1 gena (Hu i Hughes, 2012; Craigie i Bushman, 2012). Dominantni regulatorni element transkripcije HIV-1 je 5' LTR unutar kojeg se nalazi regija TAR, promotor, pojačivač transkripcije i negativni/modulatorni

regulatorni element za čije se slijedove vežu transkripcijski faktori domaćina među kojima su NF- $\kappa$ B, AP-1 i Sp1 kako bi se omogućila učinkovita transkripcija (Schiralli Lester i Henderson, 2012). Transkripcija virusnih gena može se podijeliti u dvije faze. Prva je rana faza transkripcije vođena izravnim međudjelovanjem staničnih transkripcijskih faktora i „cis-acting“ elemenata virusne promotorske regije, dok druga ovisi o nakupljanju dovoljnih količina proteina Tat tijekom prve faze. Alternativnim prekrajanjem nastaje oko 30 različitih virusnih transkripata. Razlikuju se tri različita transkripta ovisno o načinu prekrajanja. Na početku transkripcije nastaju kratke, potpuno prekrojene mRNA koje kodiraju za regulatorne proteine Tat i Rev. Kako infekcija napreduje nastaju nepotpuno prekrojene mRNA čijom translacijom nastaju proteini Vpu, Vpr, Vif i Env, te neprekrojena mRNA koja kodira za poliprotein Gag-Pol. Genska ekspresija je kontrolirana virusnim regulatornim proteinima Tat i Rev (Wu, 2004; Karn i Stoltzfus, 2012). Nakon transkripcije nastale mRNA odlaze u citoplazmu gdje započinje translacija virusnih proteina. Pupanjem iz stanične membrane se oslobađaju nezreli, neinfektivni virusi koji zatim prolaze strukturne promjene koje rezultiraju nastajanjem zrelog, infektivnog virusa. Ovaj proces sazrijevanja potaknut je proteolitičkim cijepanjem poliproteina Gag virusnom proteazom (Slika 2) (Fun i sur., 2012).

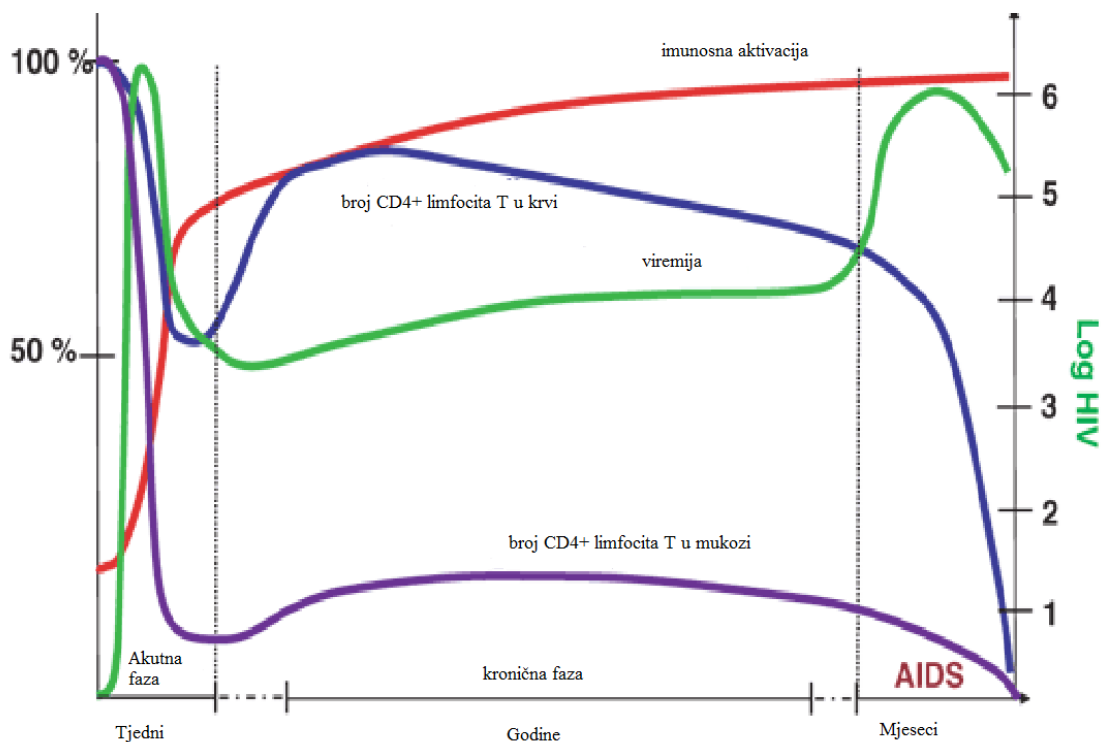


Slika 2. Životni ciklus HIV-a-1 (obrađeno s [http://web.mit.edu/7.01x/7.014/documents/lec\\_28.pdf](http://web.mit.edu/7.01x/7.014/documents/lec_28.pdf))

#### 2.1.4. Imunopatogeneza infekcije HIV-om-1

Glavna obilježja infekcije HIV-om-1 su kontinuirano kvantitativno smanjenje populacije CD4<sup>+</sup> limfocita T i aktivacija svih sastavnica imunskog sustava. Upravo se imunosna aktivacija smatra ključnom komponentom u patogenezi bolesti (Catalfamo i sur., 2012). Ona uključuje poliklonsku aktivaciju limfocita B, povećani obrt limfocita T, odnosno njihovo propadanje i nastajanje novih, povećanu zastupljenost limfocita T aktiviranog fenotipa i povišenje serumskih koncentracija proupalnih citokina i kemokina. Stupanj imunosne aktivacije smatra se boljim pokazateljem napretka bolesti nego viremija u plazmi. S napredovanjem bolesti i progresivnim smanjenjem broja CD4<sup>+</sup> limfocita T zaražene osobe postaju podložnije nizu oportunističkih infekcija koje u konačnici uzrokuju njihovu smrt. Važnu ulogu u brzini napredovanja bolesti ima mukozna imunost i do mnogih strukturnih i imunosnih promjena na mukoznim površinama dolazi u vrlo ranoj fazi infekcije HIV-om-1. Postoji izravna veza između tih promjena tijekom akutne infekcije, imunosne aktivacije tijekom kronične faze i napredovanja prema AIDS-u (Brenchley i Douek, 2008). Tijek infekcije HIV-om-1 odvija se u nekoliko faza. Period od 1-2 tjedna nakon infekcije je tzv „eclipse“ faza tijekom koje se HIV-1 slobodno umnaža i širi od ishodišta infekcije do ostalih tkiva i organa. Prve ciljane stanice koje HIV-1 zarazi su CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> memorijski limfociti T koji su u velikom broju zastupljeni neposredno ispod i unutar epitela genitalnog i gastrointestinalnog sustava. Upravo ova lokalizacija ciljnih stanica u blizinu mjesta najčešćeg puta prijenosa HIV-1 (spolni put) omogućuje uspostavljanje lokalne infekcije. U ovoj najranijoj fazi infekcije viremija je nemjerljiva, a izostaje imunosni odgovor i simptomi bolesti. Iz mukoze se virus, odnosno virusom zaražene stanice prenose do limfnih čvorova gdje se nalaze nove ciljane stanice, aktivirani CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> limfociti T. Smatra se da dendritičke stanice imaju važnu ulogu u širenju virusa vežući intaktni virus putem lektina tipa C uključujući DC-SIGN i prenose ga do nezaraženih CD4<sup>+</sup> limfocita T. Limfociti B su isto vjerojatno uključeni u rano širenje infekcije vežući HIV-1 preko receptora CR2 (CD21) (Siewe i Landay, 2011; Coffin i Swanstrom, 2013). Slijedi akutna ili primarna faza infekcije koja traje otprilike do 4 tjedna od infekcije i karakterizira je nagli porast viremije koja može dosezati i više od 10<sup>7</sup> kopija HIV-1 RNA/mL krvi, te veliki broj zaraženih CD4<sup>+</sup> limfocita T u krvi i limfnim čvorovima. HIV-1 se širi i u ostala limfatička tkiva, prvenstveno u limfatičko tkivo pridruženo crijevu (engl. *Gut-associated lymphoid tissue*, GALT). U crijevu se nalazi 60% stanica imunskog sustava što ga čini najznačajnijim ciljnim organom u infekciji HIV-

om-1. U prva 3 tjedna infekcije smanji se populacija CD4+ limfocita T u GALT-u za 80% (McMichael i sur., 2010; Siewe i Landay, 2011). U akutnoj fazi infekcije obnavljajući potencijal naivnih i mirujućih memorijskih limfocita T ostaje većinom nepromijenjen jer ove stanične populacije ne ekspimiraju na svojoj površini koreceptor CCR5. Upravo u periodu najviše viremije počinje se javljati imunosni odgovor u obliku protutijela na sve virusne proteine i CD8+ T-stanični odgovor na HIV-1 antigene ekspimirane na površni zaražene stanice. U ovoj fazi broj cirkulirajućih CD4+ limfocita T se prolazno smanjuje, no njihov broj u GALT-u je nepovratno dramatično snižen (Slika 3) (Mogensen i sur., 2010; Coffin i Swanstrom, 2013). Fiebig i suradnici su opisali šest faza akutne infekcije poznat kao Fiebig-ov score, odnosno niz seroloških i molekularnih testova koji uključuju detekciju p24 antigena, protutijela specifična za virus i otkrivanje HIV-1 RNA u plazmi (Tablica 1) (Fiebig i sur., 2003; Cohen i sur., 2010).



Slika 3. Promjene u broju CD4+ limfocita T u mukoznoj i krvnoj plazmi, stupnju viremije i imunskoj aktivaciji napredovanjem infekcije HIV-1; ljubičasta linija–promjena broja CD4+ limfocita T u mukoznoj, plava linija–promjena broja CD4+ limfocita T u krvnoj plazmi, zelena linija–viremija, crvena linija–imunska aktivacija (obrađeno s [http://www.nature.com/nm/journal/v12/n3/fig\\_tab/nm1380\\_F3.html](http://www.nature.com/nm/journal/v12/n3/fig_tab/nm1380_F3.html))

Tablica 1. Faze akutne HIV-1 infekcije prema Fiebig-u i njihovo trajanje

<b>Faza</b>	<b>Trajanje pojedine faze (dani)</b>	<b>Ukupno trajanje (dani)</b>
<b>Eclipse</b>	10	10
<b>I (HIV-1 RNA +)</b>	7	17
<b>II (p24 Ag +)</b>	5	22
<b>III (ELISA +)</b>	3	25
<b>IV (Western Blot ±)</b>	6	31
<b>V (Western Blot +, p31 -)</b>	70	101
<b>VI (Western Blot +, p31 +)</b>	neograničeno	

Nakon akutne faze slijedi period kliničke latencije u kojem viremija, koja je imala svoju najvišu vrijednost u akutnoj infekciji, pada i ostaje relativno konstantna kroz dulji vremenski period zahvaljujući aktivaciji specifične stanične imunosti. Ovo je asimptomatska faza infekcije koja može kod nekih HIV-1 pozitivnih osoba trajati i do 20 godina. Tijekom kronične faze infekcije i dalje je prisutna imunosna aktivacija vidljiva po povećanoj ekspresiji aktivacijskih biljega među kojima su CD38, HLA-DR i Ki67. Od njih se CD38 smatra najpouzdanijim biljekom imunosne aktivacije, napretka bolesti do AIDS-a i smrti. U crijevima se nastoji nadoknaditi gubitak efektorskih memorijskih CD4+ limfocita T iz akutne faze pomoću naivnih i središnjih memorijskih limfocita T, no te stanice su kratko živuće i tek djelomično uspijevaju nadoknaditi taj gubitak (Mogensen i sur., 2010). S vremenom, zbog stalne replikacije virusa i imunosne aktivacije dolazi do ponovnog smanjenja broja CD4+ limfocita T ispod vrijednosti od 200 stanica/ $\mu$ L krvi, imunosni sustav gubi kontrolu nad infekcijom i javljaju se oportunističke infekcije kao i maligne bolesti što vodi do smrti neliječenih osoba (Coffin i Swanstrom, 2013).

### 2.1.5. Urođena imunost u infekciji HIV-om-1

Urođen imunosni odgovor domaćina razvio se kao nespecifični brzi obrambeni mehanizam protiv patogena koji uključuje receptore (engl. *Pattern recognition receptor*, PRR) koji prepoznaju specifične molekule mikrobnog porijekla (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) kao što su ugljikohidrati, proteini ili lipidne strukture koje inače ne nalazimo u ljudskim stanicama. Poznate su četiri klase PRR-a i to RIG-I receptori (engl. *Retinoic acid-inducible gene 1-like receptor*, RLR), receptori nalik toll-u (TLR), NOD receptori (engl. *Nucleotide-binding oligomerization domain receptor*, NLR) i lektini tipa C receptori (CLR) (Carrington i Alter, 2012; Bennett i sur., 2014a). Stimulacija PRR-a aktivira signalnu kaskadu i premještanje citoplazmatskih transkripcijskih faktora među kojima NF- $\kappa$ B i IRF3 (engl. *Interferon regulatory factor*) koji potiču transkripciju gena urođenog imunosnog odgovora. U slučaju virusne infekcije dominantna je indukcija i lučenje interferona tipa I (IFN-1) koji se vežu na interferonske receptore na staničnim površinama stimulirajući JAK/STAT signalnu kaskadu. Nastaje ISGF3 kompleks (engl. *Interferon-stimulated gene factor 3*) sastavljen od dimera STAT1-STAT2 i IRF9 koji vežući se na elemente interferon-stimuliranog odgovora (engl. *Interferon-stimulated response element*, ISRE) u promotorima interferonima stimuliranih gena regulira njihovu ekspresiju. Produkti interferonima stimuliranih gena su enzimi koji inhibiraju virusnu transkripciju, translaciju i sazrijevanje virusne čestice. IRF7 inicira transkripciju drugog vala IFN-1. Time nastaje tzv. antivirusno stanje u kojem zaražene i obližnje nezaražene stanice postaju nepermissivne za virusnu replikaciju (Flammer i sur., 2010; Towers i Noursadeghi, 2014). Kao i u ostalih virusnih infekcija, u infekciji HIV-om-1 dolazi do početne aktivacije urođene imunosti koju slijedi razvoj specifičnog stečenog imunosnog odgovora. Urođeni imunosni odgovor u infekciji HIV-om-1 izravno utječe na kontrolu virusne replikacije, mogao bi pridonijeti napredovanju infekcije i imati važnu ulogu u modulaciji uloge HIV-1-specifičnog stečenog imunosnog odgovora (Chang i Altfeld, 2010). HIV-1 RNA kodira za više različitih PAMP-ova koji mogu biti prepoznati od strane TLR7 eksprimiranog na površini plazmacitoidnih dendritičkih stanica (pDC) i TLR8 na površini monocita i mijeloidnih dendritičkih stanica (mDC) pri čemu dolazi do aktivacije dendritičkih stanica i otpuštanja velikih količina IFN-1 i čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) koji aktiviraju kaskadu antivirusnih efektorskih funkcija, no istovremeno pridonose kroničnoj imunosnoj aktivaciji i napredovanju virusne infekcije (Chang i sur., 2012). U citoplazmi stanica nalaze se urođeni DNA senzori koji prepoznaju

prisutstvo cDNA i DNA intermedijera koji nastaju tijekom reverzne transkripcije. Jedan od njih je cGAS (engl. *Cyclic-GMP-AMP synthase*), pripadnik obitelji nukleotidiltransferaza, koji u infekciji HIV-om-1 stvara molekulu drugog glasnika nastalu spajanjem cikličkog AMP i cikličkog GMP (engl. *Cyclic-GMP-AMP*, cGAMP). cGAMP se veže na adaptorsku molekulu STING (engl. *Stimulator of interferon genes*), dolazi do dimerizacije transkripcijskog faktora IRF3 i aktivacije IRF3-reguliranih gena. Na taj se način u zaraženoj stanici oslobađa IFN-1 i to interferon  $\beta$  (IFN  $\beta$ ). Budući su lentivirusi osjetljivi na djelovanje IFN-1 vjeruje se da je HIV-1 evoluirao kako bi izbjegao aktivaciju citoplazmatskih DNA senzora. Virus koristi staničnu nukleazu pridruženu endoplazmatskom retikulumu TREX1 čija je uloga razgradnja virusne DNA. HIV-1 sintetizira DNA na takav način da TREX1 razgradi višak produkata reverzne transkripcije i time spriječi virus u aktivaciji DNA senzora, a time i urođeni imunوسي odgovor (Iwasaki, 2012; Sun i sur., 2013; Towers i Noursadeghi, 2014). U stanicama domaćina prisutni su i restriksijski faktori, odnosno efektorski proteini potaknuti djelovanjem interferona, odgovorni za supresiju virusne infektivnosti. Ekspimirani su u malim količinama i u slučaju nedostatka interferonom potaknute indukcije, te se smatraju dijelom intrinzične urođene imunosti. Najdetaljnije istraženi restriksijski faktori u infekciji HIV-om-1 su obitelj citidinskih deaminaza APOBEC3, protein tetherin i TRIM5 $\alpha$  (engl. *Tripartite-motif-containing 5 $\alpha$* ). APOBEC3G je enzim koji inhibira reverznu transkripciju i uzrokuje deaminacije citidina u uridin tijekom sinteze negativnog lanca virusne DNA. Time dolazi do hipermutacija gvanina u adenin što u konačnici rezultira nastankom nevjabilnih viriona. Virusni protein Vif je antagonist proteina APOBEC potičući njegovu razgradnju u proteasomu (Pitha, 2011; Malim i Bieniasz, 2012). Tetherin je transmembranski protein koji spriječava nezrelim virionima odvajanje od površine zaražene stanice stvarajući fizičku vezu između viriona i stanične membrane. Virusni protein Vpu je njegov antagonist i spriječavanje djelovanja tetherina ključno je za globalno širenje HIV-a tipa 1. To je vidljivo iz toga da jedino pandemijski soj HIV-1, grupa M, kodira za potpuno funkcionalan protein Vpu što s preostale tri grupe N, O i P nije slučaj (Arias i sur., 2014; Giese i Marsh, 2014). Trim5 $\alpha$  veže se na virusnu kapsidu prilikom njenog oslobađanja u citoplazmu ciljne stanice i potiče njenu razgradnju u proteasomu prije završetka reverzne transkripcije. Prepoznavanje kapside od strane Trim5 $\alpha$  potiče njenu E3 ubikvitin ligaznu funkciju, aktivira se TAK1 kinaza i dolazi do aktivacije AP-1 i NF- $\kappa$ B signalnih puteva u dendritičkim stanicama. Mutacije u genu koji kodira za kapsidni protein HIV-1 uzrokovale su da ga ljudski Trim5 $\alpha$  veže vrlo slabo, pa je stoga u ljudi ovaj način spriječavanja širenja virusa vrlo ograničen (Iwasaki, 2012). *In vitro*



istraživanja su pokazala važnost dendritičkih stanica u regulaciji urođenog i stečenog imunskog odgovora tijekom infekcije s HIV-1. Postoji razlika u ulozi pDC i mDC u infekciji HIV-om-1. U osoba zaraženih HIV-om-1 mDC imaju sniženu mogućnost prezentacije antigena i stimuliranja limfocita T, te zapravo pojačavaju virusnu infekciju omogućujući prijenos virusa na ostale stanice. S druge strane pDC inhibiraju replikaciju HIV-1 antivirusnim učinkom IFN-1, prvenstveno IFN- $\alpha$  kojeg one oslobađaju u velikim koncentracijama prilikom aktivacije u doticaju s virusom (Borrow i sur., 2010; Mogensen i sur., 2010). Langerhansove stanice, specijalizirana populacija DC u mukoznom epitelu, na svojoj površini ekspimiraju receptor langerin koji veže HIV-1 i omogućuje njegovu internalizaciju. Virus se zatim usmjerava u Birbeck-ove granule gdje dolazi do njegove brze razgradnje. Na taj način ovaj tip stanica funkcionira kao prepreka infekciji HIV-om-1. Ipak, kod visoke viremije može doći do internalizacije neovisne o langerinu, pa migratorne Langerhansove stanice prenose intaktni HIV-1 do limfocita T šireći infekciju. Važna komponenta urođene imunosti su i prirodno ubilačke stanice (engl. *Natural killer cell*, NK) zbog sposobnosti uništenja virusom zaraženih stanica, oslobađanja citokina i komunikacije sa stečenom imunosti. Njihova je aktivacija kontrolirana međureakcijama aktivirajućih, odnosno inhibitornih receptora i odgovarajućeg liganda. Glavni receptori koji prepoznaju prisustvo, odnosno odsustvo antigena na staničnoj površini su receptori KIR (engl. *Killer immunoglobulin-like receptor*, KIR) koji stvaraju međureakcije s ligandima ljudskog leukocitnog antigena klase I (engl. Human leukocyte antigen, HLA) na površini ciljane stanice. U infekciji HIV-om-1 primjećeno je usporavanje napredovanja bolesti u određenim međureakcijama KIR-a i molekula HLA. Mehanizmi koji stoje iza toga nisu još razjašnjeni iako se smatra da je zaštitni učinak tih međureakcija receptora i liganda povezan s pojačanom aktivnosti NK stanica u infekciji HIV-om-1 (Altfeld i sur., 2011). U infekciji NK stanice i DC međusobno surađuju pri čemu DC pojačavaju efektorsku funkciju NK stanica, dok one potiču daljnje sazrijevanje DC. Ukoliko dođe do neodgovarajućeg sazrijevanja DC, NK stanice će ih uništiti. DC zaražene HIV-om-1 postaju otporne na lizu posredovanu NK stanicama što je povezano s pojačanom ekspresijom inhibitora stanične smrti na površini DC. Alarmin HMGB1 odgovoran je za indukciju tih inhibitora i time su zaražene DC zaštićene od apoptoze ovisne o TNF-povezanom apoptoza-inducirajućem ligandu (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL) (Melki i sur., 2010). Promijenjene funkcije naročito DC tijekom infekcije HIV-om-1 mogle bi imati značajne posljedice na antivirusni odgovor limfocita T i B (Altfeld i sur., 2011).

### 2.1.6. Humoralna imunost u infekciji HIV-om-1

Tjedan dana od pojave virusne replikacije javlja se odgovor limfocita B na infekciju HIV-om-1. U početku je on vidljiv u obliku imunokompleksa, dok se prva slobodna protutijela specifična za virusni protein ovojnice gp41 javljaju tjedan dana kasnije. Dva tjedna poslije pojavljuju se protutijela specifična za gp120 i ostala Env-specifična vezna protutijela (McMichael i sur., 2010). Spomenuta protutijela javljaju se rano u virusnoj infekciji, nemaju vidljiv utjecaj na viremiju i ne stvaraju selekcijski imunski pritisak na virusnu ovojnicu. Važan mehanizam pomoću kojeg ne-neutralizacijska protutijela mogu ukloniti virus je njihovo vezanje za virusom zaraženu stanicu i aktivirane efektorske stanice što potiče citolizu ili apoptozu zaražene stanice. Stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (engl. *Antibody-dependant cellular cytotoxicity*, ADCC) rezultat je nastanka kompleksa između Fab domene imunoglobulina G (IgG) i virusnog proteina na staničnoj površini, te vezanja Fc domene s receptorom Fc $\gamma$  na efektorskoj stanici uključujući NK stanice, makrofage, dendritičke stanice i neutrofile. Osim citolize, vezanje na receptor Fc $\gamma$  može potaknuti otpuštanje antivirusnih citokina (Baum, 2010; Overbaugh i Morris, 2012). Protutijela sposobna neutralizirati autologni virus (engl. *Neutralizing antibody*, nAb) nastaju nakon otprilike 12 ili više tjedana nakon zaraze, dok svega 20% zaraženih osoba ima protutijela koja neutraliziraju više različitih virusnih varijanti (engl. *Broadly neutralizing antibody*, bnAb). Za njihov nastanak potrebne su godine stalne izloženosti virusu i često je povezano s mutacijom 10 - 30% aminokiselina u Fab domeni protutijela. Činjenica da svega mali broj HIV-zaraženih osoba stvara bnAb upućuje na ulogu dodatnih čimbenika, virusnih ili domaćinskih ili najvjerojatnije njihovu kombinaciju. Virusni subtip bi mogao biti važan jer je primjećen jači humoralni odgovor u osoba zaraženih subtipom C i A u odnosu na zaražene subtipom B (McMichael i sur., 2010; Overbaugh i Morris, 2012; Robinson, 2013). Više je razloga koji onemogućuju djelovanje nAb u infekciji HIV-om-1. Velika genetska varijabilnost virusa pridonosi antigenskoj različitosti proteina ovojnice koji su cilj djelovanja neutralizacijskih protutijela. Epitopi na koje se oni vežu su često sakriveni ispod glikanskog štita, dok se vezno mjesto receptora CD4 nalazi u džepu do kojeg je protutijelima ograničen pristup (McCoy i Weiss, 2013). Pojačana virusna replikacija je uzrok, a ne posljedica veće sposobnosti neutralizacijskih protutijela da neutraliziraju različite virusne varijante. Osobe s većom viremijom i većom različitosti proteina ovojnice HIV-1 u ranoj infekciji imaju širi nAb odgovor što podupire tezu da je antigenska stimulacija važna za sposobnost nAb da

neutraliziraju različite virusne varijante. Longitudinalne analize nisu pokazale utjecaj nAb odgovora na napredovanje infekcije HIV-om-1 prema stupnju AIDS-a kao ni njihov značajan doprinos kontroli virusne infekcije. To se objašnjava činjenicom da uvjeti koji potiču širi nAb odgovor mogu inhibirati ostale zaštitne mehanizme u kroničnoj infekciji kao što su gubitak proliferativnih CD4+ limfocita T ili iscrpljivanje CD8+ limfocita T (Piantadosi i sur., 2009; Gray i sur., 2011).

### **2.1.7. Specifični stanični odgovor**

CD8+ limfociti T specifični za HIV-1 pojavljuju se u perifernoj krvi zaraženih osoba u prvim mjesecima infekcije. Njihov nastanak je vremenski povezan s početnim padom viremije u akutnoj fazi što potvrđuje njihovu ulogu u kontroli virusne replikacije. Još jedan dokaz važnosti citotoksičnog odgovora specifičnog za virus proizlazi iz istraživanja na SIV-om zaraženim majmunima kod kojih uslijed deplecije CD8+ limfocita T dolazi do gubitka nadzora virusne replikacije. U akutnoj infekciji HIV-1 specifični odgovor posredovan limfocitima T je manje jačine i usmjeren je na ograničen broj epitopa u usporedbi s kroničnom infekcijom (Altfeld i sur., 2006; Bennett i sur., 2014b). Rano u infekciji HIV-om-1 uslijed HIV-1 specifičnog odgovora posredovanog CD8+ limfocitima T pojavljuju se mutirani virusi koji tako uspjevaju izbjeći prepoznavanje od strane imunskog sustava (engl. *Escape mutants*). Zanimljivo je da su takvi virusi prisutni i u osoba tzv. elitnih kontrolora koji uspjevaju imati kontrolu nad infekcijom s HIV-om dugi niz godina bez antiretrovirusne terapije sugerirajući da pojava mutacija koje omogućuju bijeg virusu od imunskog prepoznavanja nije kritični faktor u gubitku imunskog kontrole u većini HIV-zaraženih osoba (Ferrari i sur., 2011; Bennett i sur., 2014b). Još jedan dokaz važnosti uloge CD8+ limfocita T specifičnih za HIV-1 je povezanost alela MHC klase I i brzine napredovanja bolesti. Smatra se da je međureakcija T-staničnog receptora (engl. *T-cell receptor*, TCR) citotoksičnih limfocita i molekule HLA na antigen predočnim stanicama ključna za kontrolu virusne replikacije (Streeck i Nixon, 2010). U HIV-pozitivnih osoba s mjerljivom viremijom citotoksični limfociti T su često poremećene funkcije; najčešće eksprimiraju nisku razinu perforina, *ex vivo* imaju smanjenu sposobnost ubijanja, oslobađaju ograničen spektar citokina i smanjen im je proliferativni kapacitet. Citotoksični limfociti T elitnih kontrolora su polifunkcionalne stanice koje karakterizira učinkovit proces degranulacije, oslobađanje

perforina i granzima B, kao i citokina IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 i MIP-1 $\beta$  (Rehr i sur., 2008; Genovese i sur., 2013; Graw i Regoes, 2014). Dok je doprinos CD8<sup>+</sup> limfocita T specifičnih za HIV-1 u ranoj kontroli virusa relativno poznat, uloga HIV-1 specifičnog odgovora posredovanog CD4<sup>+</sup> limfocitima T u kontroli virusne replikacije je nedovoljno istražena. Sve je više dokaza da ove stanice osim pomoćničke funkcije imaju sposobnost prepoznavanja i ubijanja stanica zaraženih virusom (Soghoian i sur., 2012). Istraživanja na životinjskim modelima i ljudskim uzorcima pokazuju da je uloga CD4<sup>+</sup> limfocita T *in vivo* kritična za nastanak djelotvornog odgovora limfocita B i citotoksičnih limfocita T, te za usmjeravanje citotoksičnih limfocita T prema zaraženoj mukozi. Do narušavanja HIV-1 specifičnog odgovora posredovanog CD4<sup>+</sup> limfocitima T dolazi rano u infekciji. Obilježje progresivne infekcije HIV-om-1 je slab ili nepostojeći odgovor HIV-1 specifičnih CD4<sup>+</sup> limfocita T što je posljedica gubitka njihove uloge, naročito poremećenog oslobađanja IL-2, a ne fizičkog iščeznuća. Za razliku od HIV-pozitivnih osoba s progresivnom infekcijom, a koje nisu na antiretrovirusnoj terapiji, elitni kontrolori zadržavaju proliferativni kapacitet HIV-1 specifičnih CD4<sup>+</sup> limfocita T koji oslobađaju više IL-2, te su polifunkcijski. U mononuklearnim stanicama periferne krvi (engl. *Peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) zaraženih osoba kod kojih je došlo do kontrole viremije nakon započinjanja antiretrovirusne terapije primjećeno je smanjenje broja HIV-1 specifičnih CD4<sup>+</sup> limfocita T (Seth i sur., 2005; Dyer i sur., 2008; Porichis i Kaufmann, 2011). Iako povezanost poremećaja funkcije HIV-1 specifičnih CD4<sup>+</sup> limfocita T i virusne infekcije nije u potpunosti objašnjena, smatra se da u tome ulogu ima signaliziranje kroz inhibicijske receptore PD-1 (engl. *Programmed death 1*), CTLA-4 (engl. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) i TIM-3 (engl. *T cell Ig domain and mucin domain 3*). Više od 30% HIV-1 specifičnih CD4<sup>+</sup> limfocita T istovremeno eksprimira ova tri receptora što pokazuje kooperaciju više inhibicijskih puteva u ograničavanju limfocitnog odgovora tijekom kronične infekcije. Prolazno blokiranje inhibicijskih receptora pojačava funkciju HIV-1 specifičnih limfocita T (Kassu i sur., 2010).

### **2.1.8. Citokini**

Funkcioniranje imunskog sustava ovisi o biološkoj aktivnosti mnogobrojnih malih glikoproteinskih glasnika nazvanih citokini koje luče stanice urođene i stečene imunosti. U aktivacijskoj fazi stečenog imunskog odgovora oni stimuliraju rast i diferencijaciju limfocita,

dok u efektorskoj fazi urođene i stečene imunosti aktiviraju različite efektorske stanice da uklone mikrobe i ostale antigene (Abbas i Lichtman, 2007). *In vivo* citokini vrlo rijetko djeluju samostalno. Ciljna stanica je izložena velikom broju citokina čije zajedničko sinergističko i antagonističko djelovanje ima vrlo različite posljedice. Citokini se sintetiziraju u Golgijevom aparatu i mogu putovati kroz endoplazmatski retikulum kako bi se otpustili kao solubilni medijatori ili ostali vezani na membranu, također mogu djelovati unutar stanica ili se vratiti u jezgru gdje djeluju kao transkripcijski regulatori (Lacy i Stow, 2011; Firestein i sur., 2012). Iako su strukturno različiti, citokini dijele neke zajedničke osobine. Svima je zajedničko da je njihovo lučenje kratak, samoograničavajući događaj, a njihovo djelovanje je često pleotropno i redundantno. Pleotropnost je vidljiva iz činjenice da jedan citokin djeluje na više različitih stanica, a redundantnost da više citokina može imati isto djelovanje. Oni često utječu na sintezu i djelovanje ostalih citokina, te djeluju autokrino ili parakrino (Abbas i Lichtman, 2007). Kako bi izvršili svoju biološku funkciju citokini se vežu na specifične receptore na ciljnim stanicama. Iako su strukturno različiti klasificiraju se u pet obitelji receptora (Kindt i sur., 2006) :

1. citokinski receptori tipa I (hematopoetinski)
2. citokinski receptori tipa II (interferonski)
3. imunoglobulinska superobitelj
4. TNF receptori
5. kemokinski receptori

Mnogi citokinski receptori koji djeluju u imunom i hematopoetskom sustavu pripadaju citokinskim receptorima tipa I koji su transmembranski glikoproteini. Izvanstanična domena sadrži evolucijski očuvane aminokiselinske slijedove koji uključuju četiri cisteina, te motiv WSXWS (Trp-Ser-nekonzervirana aminokiselina-Trp-Ser) koji se nalazi proksimalno membrani. Osim u izvanstaničnoj, sličnosti su vidljive i u citoplazmatskoj domeni gdje je regija Box1/Box2 bogata prolinima najviše evolucijski očuvana i uključena je u međureakciju s obitelji Janus tirozin kinaza (Leonard, 2012). Citokinski receptori tipa II kao i oni tipa I u izvanstaničnoj domeni imaju četiri cisteina, ali nemaju motiv WSXWS. Poznati su i pod nazivom interferonski receptori jer je isprva smatrano da su njihovi ligandi isključivo IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  i IFN- $\gamma$ , a danas se zna da i receptor za IL-10 pripada istoj receptorskoj obitelji.

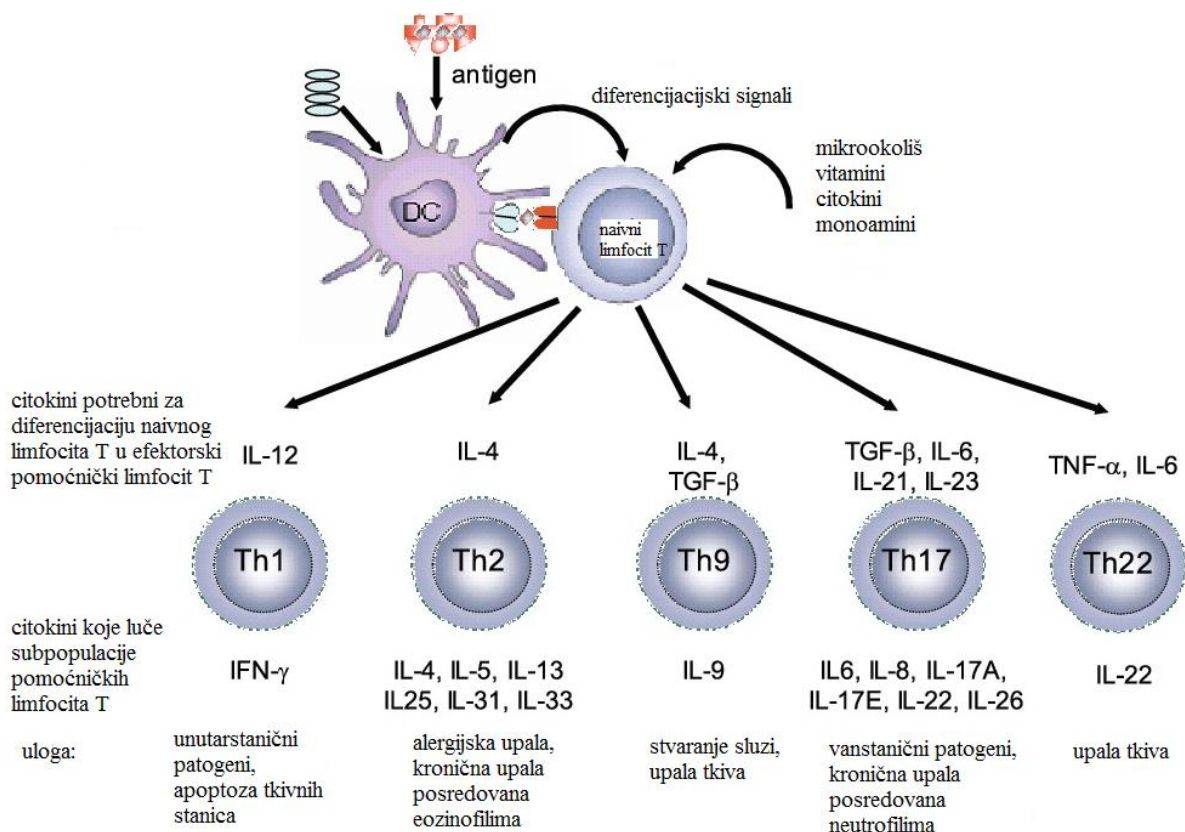
Neki citokinski receptori imaju izvanstaničnu imunoglobulinsku domenu i svrstavaju se u imunoglobulinsku superobitelj (Kindt i sur., 2006). TNF receptori su transmembranski proteini tipa I koje karakterizira postojanje domena bogatih cisteinima koji unutar istog lanca stvaraju disulfidne mostove. Vežanjem liganda ovi receptori aktiviraju pridružene unutarstanične proteine koji aktiviraju apoptozu, stimuliraju ekspresiju gena ili oboje (Hehlhans i Pfeffer, 2005; Abbas i Lichtman, 2007). Kemokinski receptori nazivaju se još i „serpentine“ receptori jer njihova transmembranska domena nekoliko puta zmijoliko prolazi kroz membranu. Signalni put koji se odvija preko njih uključuje GTP-vezujuće proteine (Allen i sur., 2007; Abbas i Lichtman, 2007). Za razliku od ostalih receptora s intrinzičnom enzimskom aktivnosti, citokinski receptori su udruženi s vezanom kinazom. Citokinski receptori tipa I i II sastavljeni su od odvojenih podjedinica,  $\alpha$  lanac veže ligand i prenosi signal, dok je  $\beta$  podjedinica potrebna za signaliziranje i ima malu ulogu u vežanju citokina. Na citoplazmatski dio  $\alpha$  lanca vezana je tirozin kinaza koja pripada obitelji Janus kinaza (JAK) koja sadrži četiri člana: Jak1, Jak2, Jak3 i Tyk2. Vežanje JAK i receptora događa se spontano i ne zahtjeva vežanje liganda, no ukoliko on nije vezan, enzim je inaktivan. Citokin se veže na izvanstaničnu domenu receptora pri čemu dolazi do približavanja dviju odvojenih receptorskih podjedinica i aktivacije JAK kroz transfosforilaciju. Zatim JAK fosforilira tirozinske ogranke u citoplazmatskom dijelu receptora na koje se preko svojih SH2 domena vežu transkripcijski faktori STAT (engl. *Signal transducers and activators of transcription*). SH2 domena jednog transkripcijskog faktora STAT veže se na fosfotirozinske ogranke drugog STAT i kao dimer se odvajaju od receptora, odlazi u jezgru gdje se veže za promotorsku regiju citokinom-inducibilnih gena i aktivira njihovu transkripciju (O`Shea i Murray, 2008; Abbas i Lichtman, 2007). Kako bi se osiguralo odgovarajuće funkcioniranje imunskog sustava sinteza i otpuštenje citokina je strogo regulirano (Lacy i Stow, 2011). U Tablici 2 prikazana je podijela citokina u funkcionalne grupe te njihova osnovna uloga u imunskoj reakciji (Tisoncik i sur., 2012).

Tablica 2. Glavne grupe citokina i osnovna uloga

Tip citokina	Uloga
<b>Interferoni</b>	Regulacija urođene imunosti, aktivacija antivirskog stanja, antiproliferativni učinak
<b>Interleukini</b>	Rast i diferencijacija leukocita, mogu biti proupalni i antiupalni
<b>Kemokini</b>	Kontrola kemotaksije, aktivacija leukocita
<b>Čimbenici poticanja kolonija</b>	Regulacija rasta i sazrijevanja matičnih stanica koštane srži i prekursora leukocita u krvi
<b>Čimbenici tumorske nekroze</b>	Poticanje upale, aktivacija citotoksičnih limfocita T

Efektorska funkcija CD4+ limfocita T ovisi o citokinskoj imunosti. Naivni CD4+ limfocit T diferencira se u efektorsku stanicu nakon prepoznavanja antigena predočenog u kontekstu molekula MHC klase II na antigen-predočnim stanicama (Zhu i Paul, 2010). Ovisno o citokinskom okolišu, CD4+ limfociti T diferenciraju se u Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, te u regulacijske (Treg) i folikularne (Tfh) efektorske populacije stanica koje iskazuju različite biološke funkcije (Slika 4) (Reuter i sur., 2012). IL-12 zajedno s IFN- $\gamma$  potiče razvoj Th1 stanica, dok je prisustvo IL-4 ključno za diferencijaciju naivnih CD4+ limfocita T u efektorsku populaciju Th2 (Shiner i sur., 2014). TGF- $\beta$  i IL-4 čine citokinski okoliš potreban za nastanak Th9 stanica (Kaplan, 2013). Mala količina TGF- $\beta$  u kombinaciji s upalnim citokinima kao što su IL-6 ili IL-21 potrebna je za nastanak efektorskih stanica Th17, dok Th22 stanice nastaju diferencijacijom naivnih CD4+ limfocita T u prisustvu TNF- $\alpha$  i IL-6 (Akdis i sur., 2012). Osim citokina za diferencijaciju naivnih CD4+ limfocita T u efektorske subpopulacije potrebni su i karakteristični transkripcijski faktori i proteini STAT. Za nastanak Th1 stanica potrebni su T-bet i STAT4, za Th2 GATA-3 i STAT5, za Th9 GATA-3 i STAT6, za Th17 ROR $\gamma$ t i STAT3, dok je za nastanak Th22 stanica potreban transkripcijski faktor AHR (Ramirez i sur., 2010; Shiner i sur., 2014). Th1 limfociti sintetiziraju velike

koncentracije interleukina 2 (IL-2) i interferona gama (IFN- $\gamma$ ) te sudjeluju u imunoreakciji na unutarstanične patogene, bakterije i viruse potičući stanični imunosni odgovor. Th2 limfociti sintetiziraju IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 koji potiču aktivaciju limfocita B i sintezu protutijela. Na taj način, Th2 limfociti potiču humoralnu imunost, a najčešće se diferenciraju tijekom imunoreakcije na alergene i antigene izvanstaničnih patogena, bakterija i parazita. Th17 limfociti su efektorske stanice koje sintetiziraju IL-17, IL-17F, IL-22 i IL-21 i imaju značajnu ulogu u obrani od infekcija mukoznih membrana i kože patogenim bakterijama i gljivama kao i u autoimunim bolestima (Luckheeram i sur., 2012). Th22 limfociti, poput Th17 stanica, sintetiziraju IL-22 no ne sintetiziraju IL-17. IL-22 je esencijalni citokin za održanje homeostaze epitela u probavnom sustavu, jetri i plućima (Kim i sur., 2012). Th9 limfociti sintetiziraju IL-9 i imaju važnu ulogu imaju u imunoreakciji na crijevne parazite, autoimunim bolestima i alergijama (Tan i Gery, 2012).



**Slika 4.** Diferencijacija aktiviranih CD4+ limfocita T u efektorske populacije (obrađeno s [http://www.springerimages.com/Images/MedicineAnsPublicHealth/110.1007\\_s11882011017870](http://www.springerimages.com/Images/MedicineAnsPublicHealth/110.1007_s11882011017870))



### 2.1.8.1. Citokini u infekciji HIV-om-1

Kao i u mnogim drugim bolestima citokini imaju središnju ulogu u patogenezi infekcije HIV-om-1. Njihov utjecaj na kontrolu virusne infekcije nije u potpunosti razjašnjen. Istraživanja su pokazala mogući utjecaj citokina prisutnih u akutnoj ili vrlo ranoj fazi infekcije na viremiju otkrivenu mjesecima poslije u kroničnoj infekciji HIV-om-1 što je od velike važnosti budući ona utječe na prijenos virusa i brzinu napretka bolesti (Katsikis i sur., 2011). Porast viremije u akutnoj infekciji prati i povišenje koncentracija mnogih citokina i kemokina. IFN- $\alpha$  i IL-15 su prvi citokini do čijeg porasta koncentracija dolazi unutar pet dana od pojave mjerljive viremije. Slijedi brzi porast koncentracija TNF- $\alpha$  i MCP-1, a zatim raste razina i drugih proupalnih citokina među kojima su IL-6, IL-8, IL-18 i IFN- $\gamma$ . Očekivano, povišenje koncentracija imunoregulatornog citokina IL-10 dolazi kasnije u akutnoj fazi (Roberts i sur., 2010). Nagli porast koncentracija citokina u akutnoj fazi infekcije HIV-om-1 ima dvojak učinak za domaćina. S jedne strane citokini ubrzavaju imunski odgovor usmjeren protiv virusa (Goonetilleke i sur., 2009). Istovremeno citokini svojim djelovanjem povećavaju populaciju ciljnih stanica HIV-a tipa 1 aktivirajući CD4+ limfocite T. Zbog svoje pleotropnosti oni mogu imati suprotni učinak na imunski odgovor i replikaciju virusa (Katsikis i sur., 2011). Jedan od primjera je proupalni citokin TNF- $\alpha$  koji pojačava odgovor usmjeren protiv virusa, ali također aktivira transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B koji potiče provirusnu transkripciju i replikaciju HIV-1 (Stacey i sur., 2009; Vallabhapurapu i Karin, 2009). Imunski odgovor u obliku oslobađanja citokina nastavlja se i u kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1. Povišene koncentracije proupalnog citokina TNF- $\alpha$  i njegovog receptora TNF-RII u ovoj fazi ukazuju na dugotrajnu upalu (Keating i sur., 2011; Keating i sur., 2013). Clerici i Shearer su 1993. godine iznijeli hipotezu da je promjena iz Th1 u Th2 citokinski profil ključna u imunopatogenezi infekcije HIV-om-1. Njihovo istraživanje provedeno je *in vitro* na PBMC-ovima izoliranim iz HIV-om zaraženih osoba što naravno ne mora davati realnu sliku *in vivo* stanja (Clerici i Shearer, 1993). Sindhu i suradnici su također uočili pomak od Th1 na Th2 citokinski profil prilikom određivanja citokina Th1 i Th2 profila u serumu i staničnim kulturama, te ekspresije mRNA u CD4+ i CD8+ limfocitima T (Sindhu i sur., 2006). Dolazi li doista do pomaka prema Th2 citokinskom profilu u infekciji s HIV-1 nije u potpunosti razjašnjeno jer postoje oprečni literaturni podaci. Tako Sarih i suradnici u *in vivo* studiji nisu dokazali porasta koncentracija Th2 citokina u zaraženih osoba (Sarih i sur., 1996). Funkcija Th17 stanica u infekciji HIV-om-1 nije u potpunosti razjašnjena. Primjećen je gubitak Th17

stanica u mukozi crijeva neliječenih HIV-pozitivnih osoba i to se povezuje s narušenom cjelovitošću crijevne mukozne barijere, te translokacije mikrobnih produkata u sistemsku cirkulaciju (El Hed i Unutmaz, 2010). Ndhlovu i suradnici utvrdili su kod HIV-pozitivne djece postojanje pozitivne korelacije HIV-1 viremije u plazmi i smanjenja broja Th17 stanica (Ndhlovu i sur., 2008). Th22 stanice luče IL-22 koji održava cjelovitost crijevnog epitela i stimulira sekreciju antimikrobnih peptida koji ograničavaju diseminaciju bakterija. U infekciji HIV-om-1 dolazi do smanjenja te stanične subpopulacije što može pridonijeti sistemskoj imunskoj aktivaciji i narušavanju mukozne imunosti (Page i sur., 2014).

### **2.1.9. Aktivacija imunskog sustava u infekciji HIV-om-1**

Jedno od glavnih obilježja infekcije HIV-om-1 je kronična aktivacija imunskog sustava koja utječe na patogenezu bolesti. Zaražene osobe pokazuju povećanu ekspresiju biljega aktivacije na CD8+ i CD4+ limfocitima T, kao i na limfocitima B, NK stanicama i monocitima. Imunosna aktivacija smatra se normalnom i pozitivnom pojavom u infekcijama s različitim patogenima jer ukazuje na porast antivirusne imunosti. No, u infekciji HIV-om-1 aktivacija imunskog sustava promatrana kroz ekspresiju aktivacijskog biljega CD38 na CD8+ limfocitima T je jak i neovisan pokazatelj napredovanja bolesti (Hazenberga i sur., 2003; Deeks i sur., 2004; Wilson i sur., 2004; Appay i Sauce, 2008). Ključna uloga imunosne aktivacije u patogenezi bolesti vidljiva je u istraživanjima na SIV-zaraženim primatima. U mangabejskih i afričkih zelenih majmuna, prirodnih domaćina SIV-a, visoka razina virusne replikacije, ali u nedostatku imunosne aktivacije, nije dovoljna za razvoj imunodeficijencije (Broussard i sur., 2001; Sumpter i sur., 2007; Sodora i Silvestri, 2008). Zbog složenosti međureakcija između HIV-1 i imunskog sustava domaćina pretpostavlja se da postoji više molekularnih i staničnih mehanizama koji barem u teoriji mogu potaknuti imunosnu aktivaciju u infekciji HIV-om-1. Najvjerojatniji uzrok je izravan odgovor urođene i stečene imunosti usmjeren protiv virusa i njegovih antigena (Paiardini i Muller-Trutwin, 2013). Sinteza virusnih glikoproteina gp120 i Nef izravno potiče aktivaciju limfocita i makrofaga i oslobađanje proupalnih citokina i kemokina (Appay i Sauce, 2008). Antigensku stimulaciju tijekom infekcije HIV-om-1 mogu potaknuti i neki latentni virusi, kao što su CMV i EBV. Iscrpljivanje CD4+ limfocita T rezultira u suboptimalnoj imunskoj kontroli tih virusa što omogućuje njihovu reaktivaciju i replikaciju. Stimulacijom velikog broja stanica

oportunistički patogeni bi mogli imati važnu ulogu u održavanju kronične aktivacije imunskog sustava u infekciji HIV-om-1 (Doisne i sur., 2004; Paiardini i Muller-Trutwin, 2013). Još jedan od mogućih uzroka kronične imunosne aktivacije je gubitak mukozne cjelovitosti u gastrointestinalnom sustavu. Masivno iscrpljivanje CD4+ limfocita T u mukoznom limfatičnom tkivu može uzrokovati poremećaj različitih imunosnih sastavnica koje čine mukoznu barijeru u crijevu. Ona spriječava premještanje mikrobnih produkata iz crijeva. Jedan od indikatora premještanja je pojava povišenih razina cirkulirajućih lipopolisaharida (LPS) što je u izravnoj korelaciji s parametrima imunosne aktivacije. Mikrobnii produkti kao što su LPS, flagelin i CpG DNA su ligandi za receptore nalik toll-u i izravno stimuliraju makrofage i dendritičke stanice na proizvodnju proupalnih citokina (Brenchley i sur., 2006a; Brenchley i sur., 2006b). Kao i u slučaju okidača imunosne aktivacije, postoji više hipoteza o tome kako aktivacija uzrokuje štetu imunskom sustavu domaćina. Jedna od njih je da ona omogućuje virusu stvaranje novih ciljnih stanica budući se zna da HIV-1 preferencijalno zaražava aktivirane CD4+ limfocite T. Njihova iscrpljivanje može potaknuti homeostatski odgovor imunskog sustava pa dolazi do aktivacije i proliferacije preostalih stanica što opet povećava dostupnost ciljnih stanica. Dodatni mehanizam kojim kronična imunosna aktivacija negativno utječe na imunski sustav domaćina je razaranjem i/ili poremećajem regulacije arhitekture tkiva ključnih za homeostazu i funkciju limfocita T kao što su koštana srž, timus i limfni čvor (Dion i sur., 2007; Zeng i sur., 2012). Proliferacija i aktivacija stanica imunskog sustava zajedno s povišenom razinom i dugotrajnom prisutnošću različitih proteina (IL-6, TGF- $\beta$ , D-dimera) uzrokuje oštećenja krvožilnog sustava i poremećaj metabolizma lipida što rezultira razvojem bolesti srca i krvožilja (Kuller i sur., 2008; Hsue i sur., 2012).

#### **2.1.10. Antiretrovirusna terapija i imunosni oporavak u infekciji HIV-om-1**

Primjena vrlo aktivne antiretrovirusne terapije (engl. *Highly active antiretroviral therapy*, HAART) u infekciji HIV-om-1 promijenila je tijek bolesti tako da se ona danas može smatrati kroničnom bolesti koja se može uspješno liječiti. Liječenje se zasniva na kombinaciji lijekova koji djeluju na različite faze životnog ciklusa virusa (vezanje virusa za stanični koreceptor, fuziju viriona i stanične membrane, aktivnosti enzima reverzne transkriptaze, proteaze i integraze). Primjena HAART-a u većine pacijenata vodi do supresije virusne replikacije i

postepenu rekonstituciju populacije CD4+ limfocita T time smanjujući rizik od oportunističkih bolesti (Volberding i Deeks, 2010; Wilson i Sereti, 2013). U nekih pacijenata početak HAART-a prati pojava upalnog odgovora nazvanog IRIS (engl. *Immune reconstitution inflammatory syndrome*). Obilježje sindroma je paradoksalno pogoršanje postojeće ili pojava nove infekcije, a smatra se da je rezultat neuravnotežene imunosne rekonstitucije efektorskih, naročito Th17 stanica, te regulatornih limfocita T. Jedan od najčešćih patogena koji uzrokuje IRIS je *Mycobacterium tuberculosis* (Sharma i Soneja, 2011). Porast broja CD4+ limfocita T nakon započinjanja terapije odvija se u dvije faze. Prvi odgovor na primjenu HAART-a je nagli porast broja CD4+ limfocita T prvenstveno zbog smanjene apoptoze i preraspodjele memorijskih CD4+ limfocita T iz limfatičkih tkiva, a zatim slijedi polakše i postepenije povećanje stvaranjem novih naivnih CD4+ limfocita T (Pakker i sur., 1998.; Autran i sur., 1999). Čimbenici koji utječu na porast broja CD4+ limfocita T tek su djelomično poznati, ali smatra se da utjecaj imaju i virus i domaćin. U pacijenata s virusnom supresijom (broj kopija HIV-1 RNA <1000/ml), starija dob, aktivna koinfekcija najčešće virusom hepatitisa C, duže trajanje infekcije HIV-om-1 i niži broj CD4+ limfocita T u trenutku započinjanja terapije prediktori su nepotpune rekonstitucije broja CD4+ limfocita T (Mocroft i sur., 2007). Oko 20% svih HIV-1 zaraženih osoba ne uspije postići optimalnu imunosnu rekonstituciju unatoč odgovarajućem liječenju i potpunoj supresiji virusne replikacije, te se nazivaju imunosni „nonresponderi“ (engl. *Immunological nonresponder*, INR). Najčešće ih se definira kao HIV-pozitivne osobe čiji je broj CD4+ limfocita T manji od 200 po mikrolitru krvi. Dogovorno je određeno da odgovarajući imunosni odgovor na HAART uključuje broj CD4+ limfocita T veći od 500 po mikrolitru krvi najviše iz razloga što se na ovoj razini imunosnog oporavka stope morbiditeta i mortaliteta HIV-pozitivnih osoba približavaju onima zabilježenim u zdravih, HIV-negativnih osoba (Gaardbo i sur., 2011).

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1 Ispitanici**

Ovo istraživanje dio je znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (MZOŠ) Republike Hrvatske naslovljenog „Imunološka rekonstitucija i rezistencija na antiretrovirusne lijekove u HIV-bolesnika iz Hrvatske“ (šifra projekta 143-1080116-0097, glavni istraživač Snježana Židovec Lepej) koji je proveden u Klinici za infektivne bolesti „Dr.Fran Mihaljević“ u Zagrebu. Projekt je 2006. godine dobio odobrenje Etičkog povjerenstva Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. U ovo istraživanje uključene su HIV-om zaražene osobe starije od 18 godina liječene u Referentnom centru za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a pri Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Iz istraživanja su isključene trudnice, maloljetne osobe, te HIV-pozitivne osobe s aktualnom oportunističkom ili drugom akutnom bolesti koja bi mogla utjecati na ekspresiju citokina. U dio istraživanja koji se bavi usporedbom citokinske imunosti na proteinskoj razini u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije istih ispitanika (12 mjeseci od dijagnoze akutne infekcije HIV-om-1) uključeno je 34 ispitanika. Ekspresija gena koji kodiraju sintezu citokina istražena je u 3 ispitanika u akutnoj, te u 3 ispitanika u kroničnoj infekciji HIV-om-1. Akutna faza infekcije HIV-om-1 određena je primjenom Fiebig-ovog sustava koji prepoznaje 6 faza (I-VI) akutne faze infekcije HIV-om-1. Ovaj sustav uključuje molekularne i imunolosne testove kojima se prati pojava virusne RNA, p24 i p31 virusnih antigena, te protutijela specifičnih za HIV-1 u plazmi/serumu HIV-om zaraženih osoba tijekom akutne faze infekcije. U dijelu istraživanja učinka antiretrovirusnim liječenjem-potaknute kontinuirane supresije virusne replikacije na ekspresiju citokina u infekciji HIV-om-1 uključeno je 80 ispitanika kod kojih je primjenom PCR-a u stvarnom vremenu dokazana nemjerljiva viremija u periodu duljem od 2 godine. Kontrolnu skupinu sačinjavaju 22 HIV-negativne osobe zaposlenici Centralnog dijagnostičkog laboratorija Klinike „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

#### **3.2 Biološki uzorci**

Za potrebe određivanja parametara stanične imunosti metodom protočne citometrije i određivanja broja kopija HIV-1 RNA u plazmi metodom klasičnog i PCR-a u stvarnom vremenu, periferna je krv uzimana venepunkcijom u dvije sterilne VACUTAINER epruvete s

antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA (etildiamintetraoctena kiselina), od 3 ml odnosno od 7 ml. Uzorke za protočnu citometriju sam pohranila na sobnoj temperaturi do analize. Za određivanje broja kopija HIV-1 RNA plazmu sam izdvojila centrifugiranjem pune krvi na 3500 okretaja/min tijekom 10 minuta i do obrade je pohranila na -80°C. Za određivanje koncentracije citokina u plazmi koristila sam plazmu preostalu nakon određivanja broja kopija HIV-1 RNA. Ekspresiju citokina na proteinskoj razini u akutnoj i kroničnoj infekciji HIV-om-1 odredila sam u tri vremenske točke. U prvoj vremenskoj točki su prikupljene plazme HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji HIV-om-1. Šest mjeseci nakon akutne faze prikupljene su plazme istih onih HIV-om zaraženih osoba u kojih je određena koncentracija citokina u akutnoj infekciji HIV-om-1 i to predstavlja drugu vremensku točku, dok treća vremenska točka označava period 12 mjeseci od akutne infekcije HIV-om-1. Učinak antiretrovirusnim liječenjem-potaknute kontinuirane supresije virusne replikacije na ekspresiju citokina u infekciji HIV-om-1 promatrala sam u dvije vremenske točke. U prvoj točki su prikupljene plazme HIV-om zaraženih osoba prije primjene antiretrovirusne terapije. Koncentracije citokina odredila sam u plazmi istih ispitanika, a u kojih je dokazana nemjerljiva viremija u periodu duljem od dvije godine nakon započinjanja terapije i to predstavlja drugu točku uzorkovanja. Puna krv za analizu ekspresije citokinskih gena vađena je venepunkcijom u PAXgene RNA epruvete (PreAnalytiX). Epruvete sam ostavila na sobnoj temperaturi dva sata, a zatim ih pohranila na -80°C do obrade.

### **3.3 Reagensije i otopine**

#### **3.3.1. Reagensije i otopine za protočnu citometriju**

CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD-3PC-5 Monoclonal Antibody Reagents for use with tetraONE SYSTEM software (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Reagens sadrži kombinaciju monoklonskih protutijela specifičnih za molekule CD45, CD4, CD8 i CD3.

CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC-5 Monoclonal Antibody Reagents for use with tetraONE SYSTEM software (Beckman Coulter, Inc., Brea,

CA, USA). Reagens sadrži kombinaciju monoklonskih protutijela specifičnih za molekule CD45, CD56, CD19 i CD3.

HLA-DR-PC-7 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Monoklonsko protutijelo specifično za molekulu HLA-DR.

CD38-PC-7 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Monoklonsko protutijelo specifično za molekulu CD38.

ImmunoPrep Reagent System Whole Blood lysing reagent (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) koji se sastoji od tri otopine. Immunoprep A sadrži mravlju kiselinu (1,2 mL/L) i stabilizator, Immunoprep B otopinu soli Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6,0 g/L), NaCl (14,5 g/L), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i stabilizator, te Immunoprep C paraformaldehid (10,0 g/L) i pufer.

Flow-Count™ Fluorospheres absolute count determination on CXP Flow Cytometry System (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Reagens je otopina fluorosfera poznate koncentracije na koje je vezana boja s emisijskim spektrom od 525 nm do 700 nm nakon ekscitacije na 488 nm, te omogućuje direktno određivanje apsolutnog broja limfocitnih subpopulacija na protočnom citometru.

Flow-Check™ Fluorospheres, Flow Cytometer Alignment Verification (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Reagens sadrži polistirenske fluorescentne mikrosfere promjera 10 µm u koncentraciji od 1x10<sup>6</sup> fluorosfera/mL, te emisijskim spektrom valnih duljina od 525 nm do 700 nm nakon ekscitacije na 488 nm. Služi za provjeru optičkog i protočnog dijela citometra.

IsoFlow™ Sheath Fluid Azide free balanced electrolyte solution (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Izotonična otopina koja se u citometru miješa s uzorkom.

AC-T Rinse™ Shutdown Diluent (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). Otopina proteolitičkih enzima koja služi za čišćenje citometra.

### **3.3.2. Reagensije i otopine za određivanje koncentracija citokina u plazmi primjenom citometrije pomoću kuglica (bead-based cytometry)**

Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix (eBioscience, San Diego, CA, SAD ) koji sadrži:

*Setup Beads* sadrži dva seta kuglica različitih veličina. Veličina A (5  $\mu\text{m}$ ) sastoji se od 11 populacija, a veličina B (4  $\mu\text{m}$ ) od 9 populacija kuglica s unutarne strane obojenih fluorescentnom bojom različitih intenziteta. Služe za pripremu citometra prije analize uzoraka.

*Fluorescent Beads* su fluorescentne kuglice sa vezanim monoklonskim protutijelima specifičnim za ljudske citokine: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IL-22 i TNF- $\alpha$

*Standardi*: u testu se koristi 13 standarda poznatih koncentracija IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IL-22 i TNF- $\alpha$ . Služe za određivanje koncentracija navedenih analita u uzorcima. Koncentracije standarda: IFN- $\gamma$  (400 ng/mL), IL-1 $\beta$  (400 ng/mL), IL-2 (400 ng/mL), IL-4 (400 ng/mL), IL-5 (400 ng/mL), IL-6 (400 ng/mL), IL-9 (40 ng/mL), IL-10 (400 ng/mL), IL-12 p70 (400 ng/mL), IL-13 (400 ng/mL), IL-17A (200 ng/mL), IL-22 (1600 ng/mL) i TNF- $\alpha$  (400 ng/mL).

*Biotin-Conjugate* je specifično protutijelo s vezanim biotinom. U testu se koristi 13 različitih protutijela specifičnih za ljudske citokine (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IL-22 i TNF- $\alpha$ ) s konjugiranim biotinom koja imaju ulogu u otkrivanju prisustva pojedinog analita.

*Assay Buffer* je otopina fosfatnog pufera (PBS) i albumina goveđeg seruma (10%) koja služi za pripremu otopina standarda i streptavidina-PE, te u samom testu za ispiranje jažica, te kao blank (negativna kontrola).

*Reagent Dilution Buffer* je otopina koja služi za pripremu otopine biotin konjugata i otopine fluorescentnih kuglica konjugiranih specifičnim protutijelima.

*Streptavidine-Phycoerythrin* (Streptavidin-PE) je otopina streptavidina konjugiranog fluorescentnom bojom fikoeritrin koja omogućuje analizu analita prisutnih u uzorku vezanjem za biotin.



### **3.3.3. Reagensije i otopine za određivanje ekspresije citokinskih gena metodom „PCR Array“**

#### **3.3.3.1. Reagensije i otopine za izolaciju ukupne RNA iz pune krvi pomoću PAXgene RNA Kit (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Švicarska) koji sadrži:**

BR1 Resuspension Buffer, pufer za resuspenziju taloga

BR2 Binding Buffer, pufer koji sadrži gvanidin tiocijanat i održava određenu pH vrijednost kako bi enzim (proteinaza K) mogao djelovati

BR3 Wash Buffer 1, pufer za ispiranje, sadrži gvanidin tiocijanat

BR4 Wash Buffer 2, pufer za ispiranje, koncentrat, priprema se dodavanjem apsolutnog etanola

BR5 Elution Buffer, elucijski pufer

RNFW RNase-Free Water

PK Proteinase K, otopina proteinaze K koja se dodaje da razgradi proteine i inaktivira nukleaze

RNFD DNase I, RNase-Free, liofilizat, priprema se dodavanjem DNase Resuspension Buffer (DRB)

DRB Dnase Resuspension Buffer, pufer za pripremu otopine RNFD

RDD DNA Digestion Buffer, pufer za razgradnju DNA

Agaroz (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD)

RNA Loading Dye, 2X (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)

#### **3.3.3.2. Sinteza cDNA pomoću RT2 First Strand Kit (Qiagen, Germantown, MD, SAD) koji sadrži:**

Buffer GE, pufer za uklanjanje genomske DNA

Buffer BC3, pufer za reverznu transkripciju

P2, otopina početnica i vanjske kontrole

RE3, otopina enzima za reverznu transkripciju

### **3.3.3.3. Reagencije i otopine za PCR u stvarnom vremenu za RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Common Cytokines**

RT<sup>2</sup> SYBR Green Mastermix (QIAGEN, Germantown, MD, SAD) koji sadrži Real-time PCR pufer, HotStart DNA Taq polimerazu, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, SYBR Green boja

### **3.3.4. Reagencije i otopine za određivanje broja kopija HIV-1 RNA u plazmi**

COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, version 2.0 koji sadrži:

- HIV-1 v2.0 CS1 (HIV-1 Magnetic Glass Particles Reagent Cassette) sadrži staklene magnetske čestice, 93% izopropanol

-HIV-1 v2.0 CS2 (HIV-1 Lysis Reagent Cassette) sadrži natrijev citrat dihidrat, 42,5% gvanidin tiocijanata, <14% polidokanola, 0,9% ditiotreitola

-HIV-1 v2.0 CS3 (HIV-1 Multi-Reagent Cassette) sadrži:

-proteinaznu otopinu (Pase) koja sadrži Tris pufer, <0,05% EDTA, kalcijev klorid, kalcijev acetat, ≤7,8% proteinaze, glicerol

-elucijski pufer (EB) koji sadrži Tris bazni pufer, 0,2% otopinu metilparabena

-HIV-1 v2.0 CS4 (HIV-1 Test-Specific Reagent Cassette) sadrži:

-HIV-1 QS (HIV-1 Quantitation Standard) sadrži Tris-HCl pufer, EDTA, <0,005% sintetsku Poly rA RNA, <0,001% neinfektivne mikrobne RNA koja sadrži ciljni slijed za početnice i jedinstvenu regiju za vezanje proba, 0,05% natrijevog azida

-HIV-1 MMX (HIV-1 Master Mix) sadrži tricinski pufer, kalijev acetat, kalijev hidroksid, 20% dimetilsulfoksida, glicerol, <0,04% dATP, dGTP, dCTP, dUTP, dTTP, <0,003% uzvodnih i nizvodnih početnica specifičnih za *gag* i LTR regije HIV-1, <0,003% oligonukleotidnih aptamera, <0,003% fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih proba specifičnih za HIV-1 i HIV-1 kvantifikacijski standard, <0,05% mikrobne Z05 DNA polimeraze, <0,1% AmpErase (uracil-N-glikozilaza), 0,09% natrijevog azida

-CAP/CTM Mn<sup>2+</sup> (CAP/CTM Manganese Solution) sadrži <0,5% manganovog acetata, ledenu octenu kiselinu, 0,09% natrijevog azida

-HIV-1 H(+), v2.0 (HIV-1 High Positive Control) sadrži <0,001% neinfektivne mikrobne RNA koja sadrži ciljne sekvence, humanu plazmu koja je negativna u serološkom testu na protutijela specifična za HIV-1/2, HCV, HIVp24 i u testu na HBsAg kao i na prisutnost HIV-1 RNA, HCV RNA i HBV DNA PCR-om, 0,1% Proclin 300

-HIV-1 L(+), v2.0 (HIV-1 Low Positive Control) sadrži <0,001% neinfektivne mikrobne RNA koja sadrži ciljni slijed, humanu plazmu koja je negativna u serološkom testu na protutijela specifična za HIV-1/2, HCV, HIVp24, testu na HBsAg kao i na HIV-1 RNA, HCV RNA i HBV DNA PCR-om, 0,1% Proclin 300

-CTM (-) C (COBAS TaqMan Negative Control Human Plasma) sadrži ljudsku plazmu nereaktivnu u serološkim testovima na protutijela na hepatitis virus C (HCV), protutijela na HIV-1/2, HIV p24 antigen i HbsAg; HIV-1 RNA, HCV RNA i HBV RNA nije mjerljiva u PCR testu, 0,1% ProClin 300

COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan Wash Reagent sadrži:

-PG WR (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan Wash Reagent sadrži natrijev citrat dihidrat, <0,1% N-metilizotiazolon-HCl

### **3.4 Oprema, računalni programi i potrošni materijal**

-aparatus za pipetiranje uzoraka za protočnu citometriju Coulter PrepPlus 2 (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD)

- aparatus za pripremu uzoraka za protočnu citometriju Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD)
- protočni citometar CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD) s pripadajućim CXP softverom povezan s računalom Pentium (IBM, Armonk, NY, SAD) i laserskim štampačem Business inkjet 2300 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, SAD)
- vortex Vibromix, miješalica za epruvete (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- termoblok Thermomixer comfort 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- K<sub>3</sub>EDTA VACUTAINER epruvete za uzimanje krvi (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ SAD)
- Polistirenske epruvete 12x75 mm (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, SAD)
- COBAS AmpliPrep, aparat za izolaciju nukleinskih kiselina (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska)
- COBAS TaqMan Analyzer, aparat za umnažanje i analizu nukleinskih kiselina (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska)
- Sample processing units (SPU), jedinice u kojima se odvija proces izolacije (Roche Diagnostic, Basel, Švicarska)
- Sample input tubes, epruvete za uzorke (Roche Diagnostic, Basel, Švicarska)
- COBAS TaqMan "K-carrier", "K-carrier rack" i transporter za "K-carrier" (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska)
- COBAS TaqMan "K-tube" i "K-tube rack" (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska)
- centrifuga EBA 20 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
- uređaj za vakuum filtraciju s vakuum pumpom (Millipore, Billerica, MA, SAD)
- spektrofotometar BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- kivete za spektrofotometar (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- termociklički amplifikator ABI 7500 Standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD)

- aparatura za horizontalnu gel elektroforezu Mini Sub CELL GT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD)
- uređaj za snimanje gelova ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD)
- horizontalna tresilica za mikrotitarske pločice DIGENE Hybrid Capture System (Digene Corporation, Gaithersburg, MD, SAD)
- automatske pipete (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD; Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- nastavci s filterom za automatske pipete (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)
- mikrotitarske pločice s 96 jažica za izvođenje testa Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix (eBioscience, San Diego, CA, SAD)
- FlowCytomix™ Pro Software (eBioscience, San Diego, CA, SAD), računalni program za određivanje koncentracija citokina
- 7500 System SDS Software, ver. 1.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), računalni program za analizu i izračun  $C_t$  vrijednosti, kao i analizu disocijacijske krivulje
- RT2 Profiler PCR Array Data Analysis (QIAGEN, SABiosciences, Frederick, MD, SAD), računalni program za analizu genske ekspresije tehnologijom „PCR Array“.

### **3.5 Metode**

#### **3.5.1. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi**

Protočna citometrija omogućuje multiparametrijsku analizu morfoloških, biokemijskih i funkcionalnih karakteristika stanica, unutarstaničnih molekula i organela. Uzorak koji se analizira na protočnom citometru mora biti suspenzija pojedinačnih stanica, odnosno molekula. U protočnom citometru razlikujemo tri glavna sustava. Protočni dio (fluidics) prenosi uzorak pomoću izotonične tekućine do laserske zrake. Optički dio čine laseri i optički filteri koji usmjeravaju reflektirane zrake svjetlosti na detektore. Ti se svjetlosni signali uz

pomoć elektroničkog dijela pretvaraju u elektroničke signale i obrađuju uz pomoć softvera. Stanice, odnosno molekule se moraju usmjeravati prema laserskoj zruci u vrlo tankom mlazu kako bi se osiguralo da se analiziraju pojedinačno. To se postiže hidrodinamičkim fokusiranjem na način da brzina protoka izotonične tekućine ubrzava kretanje uzorka, te se pojedinačne stanice kreću kroz centar toka. Prolaskom stanice kroz lasersku zraku dolazi do rasipanja svjetlosti. U protočnoj citometriji razlikujemo dva parametra, forward i side scatter. Forward scatter ili usmjereno rasipanje svjetlosti proporcionalno je veličini stanice, a side scatter ili bočno rasipanje svjetlosti daje podatke o granuliranosti i unutarnoj složenosti stanice. Kako bi mogli razlikovati pojedine stanične populacije potrebno ih je obilježiti specifičnim protutijelima koja na sebi imaju vezan fluorokrom. To je molekula koja absorbira svjetlost određene, njoj karakteristične, valne duljine i pri tome elektroni u fluorokromu prelaze u pobuđeno stanje. Prilikom njihovog povratka u osnovno stanje elektroni emitiraju svjetlost manje energije, tj. veće valne duljine, nego što je bila pobuđujuća svjetlost. Svaki fluorokrom ima specifičan absorpcijski i emisijski spektar što omogućuje njihovu analizu, a time i prepoznavanje različitih staničnih populacija u uzorku. Prepoznavanje različitih staničnih populacija pomoću specifičnih monoklonskih protutijela obilježenih fluorokromima nazivamo imunofenotipizacijom.

Uzorke periferne krvi za analizu metodom protočne citometrije pripremila sam pomoću aparata PrepPlus 2 (Beckman Coulter, Brea, California, SAD) koji je programiran da u silikonizirane polistirenske epruvete (12x75 mm) dodaje po 10 µL odabrane kombinacije monoklonskih protutijela obilježenih fluorokromima, te 100 µL periferne krvi. Za svaki uzorak potrebne su dvije epruvete. U jednoj je kombinacija slijedećih monoklonskih protutijela (peterostruko bojanje): CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD3-PC-5 i CD38-PC7, a u drugoj: CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC-5 i HLA-DR PC7. Tako pripremljene uzorke inkubirala sam 10 minuta u mraku u aparatu TQ-Prep (Beckman Coulter, Brea, California, SAD) koji po isteku vremena započinje lizu eritrocita i fiksiranje limfocitne membrane dodavanjem otopina ImmunoPrep A, B i C. ImmunoPrep A je otopina mravlje kiseline koja uzrokuje lizu eritrocita bez narušavanja integriteta membrana limfocita. ImmunoPrep B zaustavlja djelovanje reagensa ImmunoPrep A i djeluje kao stabilizator, dok ImmunoPrep C fiksira membrane limfocita. Prije analize na protočnom citometru u pripremljeni uzorak sam pomoću aparata PrepPlus 2 dodala 100 µL kvantifikacijskog reagensa Flow Count fluorospheres (Beckman Coulter, Brea, California, SAD) kako bi mogla odrediti apsolutni broj CD4+ limfocita T. Pripremljene uzorke sam analizirala na protočnom

citometru CYTOMIX FC 500 (Beckman Coulter, Brea, California, SAD), a dobivene podatke obradila pomoću CXP softvera samog aparata. Kako bih odvojila limfocite od ostalih stanica krvi koristila sam panleukocitni biljeg CD45 i parametar bočnog raspršenja svjetlosti (engl. side scatter) na jednom histogramskom prikazu, te parametre prednjeg (engl. forward scatter) i bočnog raspršenja svjetlosti na drugom histogramu. Ovom metodom odredila sam zastupljenost pojedinih limfocitnih subpopulacija u perifernoj krvi i to postotke limfocita T, limfocita B, CD4+ limfocita T, CD8+ limfocita T, NK stanica, aktiviranih limfocita T (pomoću biljega HLA-DR), aktiviranih CD8+CD38+ limfocita T, te apsolutni broj CD4+ limfocita T.

### **3.5.2. Određivanje koncentracija citokina u plazmi primjenom citometrije pomoću kuglica (engl. bead-based cytometry)**

Za određivanje koncentracija citokina u plazmi metodom citometrije pomoću kuglica koristila sam reagens Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix (eBioscience, San Diego, California, SAD). Metoda se zasniva na detekciji citokina pomoću fluorescentnih kuglica na koje su vezana protutijela specifična za pojedini citokin. Protutijela koja su vezana na kuglice prepoznaju specifičan antigen, tj. citokin i vežu se na njega. Zatim se u reakcijsku smjesu dodaje sekundarno protutijelo s konjugiranim biotinom koje se veže na kompleks citokina i fluorescentne kuglice s vezanim protutijelom. Za otkrivanje se dodaje streptavidin s vezanim fluorokromom fikoeritrinom. Takav obilježeni streptavidin se veže na biotin, te zajedno čini kompleks citokin-primarno protutijelo-sekundarno protutijelo-streptavidin. Cijeli proces imunskih reakcija vezanja protutijela na citokine odvija se u jažicama mikrotitarske pločice, a za detekciju citokina se koristi protočni citometar. Prije početka izvođenja testa pripremila sam sve potrebne reagense iz Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix prema uputi proizvođača. Assay pufer sam razrijedila 10x u destiliranoj vodi, te sam otopila liofilizirane standarde u destiliranoj vodi u volumenu označenom na pojedinoj bočici. Pripremila sam serijsko razrijeđenje standarda tako što sam pipetirala po 10 µL svakog rekonstituiranog standarda u jednu epruvetu, te dodala 70 µL Assay pufera (1x) do ukupnog volumena od 200 µL. Epruvetu sam označila sa standard 1. U šest epruveta označenih sa standard 2 do 7 pipetirala sam 100 µL Assay pufera. U epruvetu označenom sa standard 2 dodala sam 50 µL standarda 1,

promiješala sadržaj, te odpipetirala 50  $\mu\text{L}$  u epruvetu označenom sa standard 3. Ponovila sam postupak do epruvete s oznakom standard 7 stvorivši niz od 7 razrijeđenja standarda. Otopinu fluorescentnih kuglica s vezanim specifičnim protutijelom pripremila sam pipetirajući 150  $\mu\text{L}$  svake od 13 otopina tih kuglica u epruvetu te sam dodala 1050  $\mu\text{L}$  Reagent Dilution pufera. Epruvetu s pripremljenom otopinom fluorescentnih kuglica centrifugirala sam 5 minuta na 3000 g, pažljivo uklonila nadtalog ostavivši oko 50  $\mu\text{L}$  otopine da ne resuspendiram talog. Dodala sam Reagent Dilution pufer do ukupnog volumena od 3000  $\mu\text{L}$ . Radnu otopinu biotin konjugata pripremila sam u epruveti u kojoj sam pipetirala po 300  $\mu\text{L}$  svakog od 13 biotin konjugata, te dodala 2100  $\mu\text{L}$  Reagent Dilution pufera. Jažice mikrotitarske pločice namočila sam s 50  $\mu\text{L}$  Assay pufera, te sam pufer uklonila vakuum filtracijom uz pomoć vakuum pumpe. Prema rasporedu u Tablici 3 pipetirala sam po 25  $\mu\text{L}$  pripremljenih razrijeđenja standarda, uzoraka, te Assay pufera kao negativne kontrole u jažice označene Blank.

Tablica 3. Raspored pipetiranja standarda, uzoraka i negativne kontrole (blank)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	St 1	St 1	St 1	Uz 8	Uz 16	Uz 24	Uz 32	Uz 40	Uz 48	Uz 56	Uz 64	Uz 72
B	St 2	St 2	Uz 1	Uz 9	Uz 17	Uz 25	Uz 33	Uz 41	Uz 49	Uz 57	Uz 65	Uz 73
C	St 3	St 3	Uz 2	Uz 10	Uz 18	Uz 26	Uz 34	Uz 42	Uz 50	Uz 58	Uz 66	Uz 74
D	St 4	St 4	Uz 3	Uz 11	Uz 19	Uz 27	Uz 35	Uz 43	Uz 51	Uz 59	Uz 67	Uz 75
E	St 5	St 5	Uz 4	Uz 12	Uz 20	Uz 28	Uz 36	Uz 44	Uz 52	Uz 60	Uz 68	Uz 76
F	St 6	St 6	Uz 5	Uz 13	Uz 21	Uz 29	Uz 37	Uz 45	Uz 53	Uz 61	Uz 69	Uz 77
G	St 7	St 7	Uz 6	Uz 14	Uz 22	Uz 30	Uz 38	Uz 46	Uz 54	Uz 62	Uz 70	Uz 78
H	Blank	Blank	Uz 7	Uz 15	Uz 23	Uz 31	Uz 39	Uz 47	Uz 55	Uz 63	Uz 71	Uz 79

Zatim sam dodala po 25  $\mu\text{L}$  pripremljene otopine fluorescentnih kuglica s vezanim specifičnim protutijelom i 50  $\mu\text{L}$  pripremljene otopine biotin konjugata. Jažice sam prekrila adhezivnim filmom, zamotala u aluminijsku foliju, te inkubirala na sobnoj temperaturi 2 sata na tresilici za mikrotitarske pločice s brzinom pomaka od 500 rpm. Pred kraj inkubacije pripremila sam otopinu streptavidina s vezanim fluorokromom PE tako što sam razrijedila 176  $\mu\text{L}$  koncentrirane otopine streptavidin-PE u 5324  $\mu\text{L}$  Assay pufera (1x). Nakon inkubacije uklonila sam adhezivni film, te ispraznila jažice vakuum filtracijom uz pomoć vakuum pumpe. U jažice sam dodala 100  $\mu\text{L}$  Assay pufera (1x) i opet ih ispraznila vakuum filtracijom. Ovaj postupak sam ponovila još jednom. Dodala sam 100  $\mu\text{L}$  Assay pufera (1x) i 50  $\mu\text{L}$  pripremljene otopine streptavidin-PE u sve jažice, prekrila ih adhezivnim filmom, zamotala aluminijskom folijom, te inkubirala na sobnoj temperaturi 1 sat na tresilici za



mikrotitarske pločice s brzinom pomaka od 500 rpm. Nakon inkubacije uklonila sam adhezivni film, te ispraznila jažice vakuom filtracijom uz pomoć vakuom pumpe. U jažice sam dodala 100  $\mu$ L Assay pufera (1x) i opet ih ispraznila vakuom filtracijom. Ovaj postupak sam ponovila još jednom. Dodala sam 200  $\mu$ L Assay pufera (1x), sadržaj svake jažice dobro promiješala pomoću pipete, prebacila u silikonizirane polistirenske epruvete za protočni citometar i nadopunila do volumena od 500  $\mu$ L dodavanjem 300  $\mu$ L Assay pufera (1x). Do analize na protočnom citometru epruvete sam zaštitila od svjetlosti. Prilagodila sam postavke protočnog citometra prema uputi proizvođača reagensa Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix (eBioscience, San Diego, California, SAD). Kut pod kojim se prikupljaju podaci prednjeg raspršenja svjetlosti (engl. forward scatter) sam smanjila s uobičajenih 1-19° na 1-8°. Napravila sam histogram s mjerenjem prednjeg raspršenja svjetlosti (engl. forward scatter, FS) na X-osi i bočnog raspršenja svjetlosti (engl. side scatter, SS) na Y-osi, te još dva histograma s mjerenjem emisije fikoeritrina (PE) pri valnoj duljini od 595 nm na X-osi i emisije crvene svjetlosti pri valnoj duljini od 700 nm na Y-osi. Vorteksirala sam epruvetu s fluorescentnim kuglica (setup beads) koje služe za namještanje FS/SS parametara, stvaranja regija za pojedine populacije fluorescentnih kuglica i prilagođavanja napona emisije fikoeritrina i crvene svjetlosti, te pipetirala 500  $\mu$ L u silikoniziranu polistirensku epruvetu. Pokrenula sam prethodno kreiran protokol na protočnom citometru i podesila parametre FS i SS da dobijem dvije razdvojene populacije fluorescentnih kuglica. Postavila sam „ograde“ (engl. gate) oko populacija; „A“ oko populacije fluorescentnih kuglica veće veličine i „B“ oko populacije manjih fluorescentnih kuglica. Na jednom od dva kreirana histograma koji prikazuju emisiju fikoeritrina (PE) pri valnoj duljini od 595 nm na X-osi i emisiju crvene svjetlosti pri valnoj duljini od 700 nm na Y-osi sam zadala da prikaže populaciju iz „A“ ograde, a drugi da prikaže populaciju iz „B“ ograde. Prilagođavanjem napona emisije fikoeritrina postigla sam da se populacije fluorescentnih kuglica nalaze uz lijevi kraj histograma, a prilagodbom napona emisije crvene svjetlosti potpuno razdvajanje populacija. Pomoću standarda najveće koncentracije (standard 1) još jednom sam provjerila postavke citometra, odnosno vide li se na histogramima sve populacije fluorescentnih kuglica. Nakon toga krenula sam na analizu uzoraka. Dobiveni rezultati pohranjeni su na citometru u obliku LMD (list mode data) i u tom obliku sam ih unijela u FlowCytomixPro softver koji na temelju poznatih koncentracija standarda određuje koncentraciju citokina u uzorcima.

### **3.5.3. Kvantifikacija HIV-1 RNA u plazmi primjenom testa COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, verzija 2.0**

COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test, verzija 2.0 je amplifikacijski test za kvantifikaciju HIV-1 RNA u plazmi koji objedinjuje automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina pomoću uređaja COBAS AmpliPrep (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka), te umnažanje i analizu nukleinskih kiselina metodom PCR-a u stvarnom vremenu na termocikličkom amplifikatoru COBAS TaqMan (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka). Raspon osjetljivosti ovog testa je od 20-10 000 000 kopija HIV-1 RNA po mL plazme, a kvantifikacija je moguća primjenom kvantifikacijskog standarda (QS) poznate koncentracije. Ciljne regije se nalaze unutar visoko konzerviranih regija *gag* gena i LTR regiji genoma. U ovom testu se koriste dvostruko obilježene fluorescentne probe specifične za ciljnu regiju i kvantifikacijski standard. Svaka proba ima vezane dvije boje, reporter i utišivač fluorescencije, te dok je ona intaktna ne može se analizirati fluorescencija reporter boje zbog blizine utišivača. Tijekom reakcije PCR-a proba hibridizira s ciljnim slijedom i zatim se uklanja 5'→3' nukleaznom aktivnosti DNA polimeraze čime se gubi učinak utišivača fluorescencije i omogućuje fluorescencija reporter boje. Ovim testom analiziraju se subtipovi grupe M i grupa O HIV-a tipa 1.

### **3.5.4. Izolacija RNA iz pune krvi**

RNA iz pune krvi vađene venepunkcijom u epruvetu PAXgene RNA Tube izolirala sam pomoću PAXgene RNA Kit (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Švicarska). Epruvetu krvi sam centrifugirala 10 min na 3000 g, zatim uklonila nadtalog, na talog dodala 4 mL vode bez prisustva Rnaza (RNase-free water, RNFW) i promiješala sadržaj dok se talog nije otopio. Ponovila sam postupak centrifugiranja, uklonila nadtalog i na talog dodala 350 µL pufera za resuspendiranje (BR1). Promiješala sam sadržaj dok se talog nije otopio, prebacila u epruvetu od 1,5 mL i dodala 300 µL pufera za vezanje (BR2) i 40 µL proteinaze K, te inkubirala u termobloku 10 min na 55°C uz miješanje brzinom od 1000 g. Dobiveni lizat sam prebacila u PAXgene Shredder Spin kolonu koju sam stavila u epruvetu od 2 mL i centrifugirala 3 min na 20 000 g. Frakciju koja je prošla kroz kolonu prebacila sam u novu epruvetu od 1,5 mL, dodala 350 µL etanola, promiješala sadržaj i kratko centrifugirala 2 s na 1000 g kako bi

uklonila kapljice sa stijenke tubice. U PAXgene RNA Spin kolonu koju sam stavila u epruvetu od 2 mL prebacila sam 700  $\mu$ L uzorka, centrifugirala 1 min na 20 000 g i premjestila kolonu u novu epruvetu od 2 mL. Preostali uzorak sam dodala u kolonu i ponovila centrifugiranje (1 min, 20 000 g), te ponovno premjestila kolonu u novu epruvetu od 2 mL. Dodala sam 350  $\mu$ L pufera za ispiranje 1 (BR3), centrifugirala 1 min na 20 000 g i stavila kolonu u novu epruvetu od 2 mL. U epruvetu od 1,5 mL dodala sam 10  $\mu$ L DNase I i 70  $\mu$ L pufera za digestiju (RDD), te lagano promiješala. Dobivenu otopinu sam dodala direktno u kolonu i ostavila na sobnoj temperaturi 15 min. Nakon isteka vremena u kolonu sam dodala 350  $\mu$ L pufera za ispiranje 1 (BR3), centrifugirala 1 min na 20 000 g, te premjestila kolonu u novu epruvetu od 2 mL. Nakon dodavanja 500  $\mu$ L pufera za ispiranje 2 (BR4) ponovila sam postupak centrifugiranja (1 min na 20 000 g) i premjestila kolonu u novu epruvetu od 2 mL. Još jednom sam u kolonu prebacila 500  $\mu$ L pufera za ispiranje 2 (BR4), centrifugirala 3 min na 20 000 g, te je premjestila u novu epruvetu od 2 mL. Kako bi u potpunosti uklonila pufer za ispiranje 2 (BR4) epruvetu s kolonom sam centrifugirala 1 min na 20 000 g i kolonu premjestila u novu epruvetu od 1,5 mL. Dodala sam 40  $\mu$ L elucijskog pufera (BR5) i centrifugirala 1 min na 20 000 g. Ponovila sam ovaj korak još jednom, te inkubirala eluat 5 min na 65°C. Prije nego što sam pohranila izolate na -20°C odredila sam koncentraciju i čistoću izolirane RNA pomoću spektrofotometra BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm. Uzorak je zadovoljavajuće čistoće ukoliko je omjer  $A_{260/280}$  između 1.8 – 2.1 i omjer  $A_{260/230}$  veći od 1.7. Prisustvo dvije jasne vrpce u 1% agaroznom gelu koje odgovaraju podjedinicama ribosomske RNA od 18S i 28S potvrđuje odgovarajuće kvalitete izolirane RNA. Izolate koji su zadovoljili navedene kriterije čistoće i kvalitete pohranila sam na -20 °C.

### **3.5.5. Sinteza prvog lanca cDNA**

Prvi korak u sintezi prvog lanca cDNA je uklanjanje zaostale genomske DNA iz izolirane ukupne RNA. U reakcijsku smjesu pomiješala sam 1  $\mu$ g ukupne RNA, 2  $\mu$ L reakcijskog pufera GE, dodala RNaza čiste vode do ukupnog volumena od 10  $\mu$ L, te inkubirala 5 min na 42°C. Po isteku vremena reakcijsku smjesu sam odmah ohladila na ledu. Pripremila sam reakcijsku smjesu za reakciju reverzne transkripcije tako što sam dodala 4  $\mu$ L pufera BC3, 1  $\mu$ L otopine početnica, 2  $\mu$ L otopine enzima za reverznu transkripciju i 3  $\mu$ L RNaza čiste vode.

Dobivenu otopinu sam pomiješala s 10  $\mu$ L ukupne RNA koja je pročišćena od ostataka genomske DNA, inkubirala 15 min na 42°C, te zaustavila reakciju povišenjem temperature na 95°C tijekom 5 min. U reakcijsku smjesu dodala sam 91  $\mu$ L RNaza čiste vode i pohranila na -20°C.

### **3.5.6. Određivanje ekspresije citokinskih gena metodom „PCR Array“**

Za analizu ekspresije citokinskih gena koristila sam reagens RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Human Common Cytokines (QIAGEN, Hilden, Njemačka) koji omogućuje istovremenu detekciju ekspresije 84 gena koji uključuju gene za interferone (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNB1, IFNG), interleukine (IL-10, IL-11, IL-12A, IL-12B, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-18, IL-19, IL-1A, IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23A, IL-24, IL-25 (IL-17E), IL-27, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, TXLNA (IL-14)), faktore rasta (CNTF, CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FIGF (VEGFD), LEFTY2 (EBAF), LIF, NODAL, OSM, PDGFA, TGFA, THPO, VEGFA), obitelj TGF- $\beta$  (BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, GDF2 (BMP9), GDF5 (CDMP-1), GDF9, INHA, INHBA, MSTN (GDF8), TGFB1, TGFB2, TGFB3), obitelj TNF (CD40LG (TNFSF5), CD70 (TNFRSF7), FASLG (TNFSF6), LTA (TNFB), LTB, TNF, TNFRSF11B, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11, TNFSF12, TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF14, TNFSF4 (OX40L), TNFSF8), te ostale citokine (ADIPOQ, FAM3B, SPP1 (Osteopontin)). U svakoj od 96 jažica mikrotitarske pločice nalazi se set optimiziranih početnica za pojedini citokinski gen, odnosno kontrolne gene. „PCR Array“ uključuje 12 kontrola i to: 5 konstitutivnih (housekeeping) gena za normalizaciju dobivenih rezultata, kontrolu za detekciju moguće kontaminacije genomskom DNA, 3 kontrole reverzne transkripcije za provjeru efikasnosti reverzne transkripcije prilikom sinteze cDNA i 3 pozitivne kontrole PCR-a za provjeru efikasnosti PCR reakcije. Kao kalup sam koristila cDNA dobivenu reverznom transkripcijom ukupne RNA. Pomiješala sam 102  $\mu$ L cDNA s 1350  $\mu$ L RT<sup>2</sup> SYBR Green reakcijske smjese, dodala 1248  $\mu$ L RNaza čiste vode te pipetirala po 25  $\mu$ L dobivene otopine u svaku jažicu mikrotitarske pločice. PCR reakcija odvijala se u termocikličkom amplifikatoru ABI 7500 Standard (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) u zadanim uvjetima: 10 min na 95°C i 40 ciklusa 15 s na 95°C i 1 min na 60°C. Nakon završetka svih ciklusa analizirala sam krivulje disocijacije za svaku PCR reakciju kako bi provjerila njihovu specifičnost i isključila

postojanje međusobno sparenih početnica (primer dimer). Pomoću programa 7500 System SDS Software, ver. 1.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) samog termocikličkog amplifikatora analizirala sam  $C_t$  vrijednosti i disocijacijskih krivulja svih PCR reakcija. Dobivene rezultate analize genske ekspresije metodom „PCR Array“ analizirala sam računalnim programom RT2 Profiler PCR Array Data Analysis (QIAGEN, SABiosciences, Frederick, MD, SAD).

### **3.5.7. Statističke analize**

Rezultate istraživanja statistički sam analizirala primjenom programa SAS v. 8.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Primijenila sam uobičajene metode deskriptivne statistike. Varijable s nepravilnom distribucijom prikazala sam kao medijan i interkvartilni raspon. Za usporedbu neovisnih grupa koristila sam Fisher's exact test. Za usporedbu unutar iste skupine ispitanika koristila sam Wilcoxon signed rank test. Razina statističke značajnosti definirana je s vrijednosti  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

### **4.1 Usporedba citokinske ekspresije na razini gena i proteina u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1**

#### **4.1.1. Usporedba ekspresije gena koji kodiraju sintezu citokina iz porodica interleukina, interferona, čimbenika rasta, porodice TGF- $\beta$ , porodice TNF- $\alpha$ i ostalih citokina u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1**

Ekspresiju gena koji kodiraju sintezu citokina usporedila sam u tri HIV-om zaražene osobe u akutnoj fazi, te u tri osobe u kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1. Od 84 gena čija je ekspresija analizirana u ovom istraživanju 29 gena je pojačano eksprimirano u kroničnoj infekciji u usporedbi s ekspresijom u akutnoj infekciji HIV-om-1. U 13 gena utvrđen je statistički značajni porast ekspresije između akutne i kronične faze infekcije HIV-om-1 ( $P < 0,05$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 4. Od 84 gena čiju sam ekspresiju analizirala, ekspresija 4 gena je bila smanjena u kroničnoj u odnosu na akutnu infekciju HIV-om-1. Smanjenje genske ekspresije bilo je statistički značajno za IL-12 $\alpha$  (Tablica 5).

Tablica 4. Geni s povišenom ekspresijom u kroničnoj u odnosu na akutnu infekciju HIV-om-1. Ekspresija gena uspoređena je u 3 HIV-om zaražene osobe u akutnoj, te u 3 HIV-om zaražene osobe u kroničnoj infekciji HIV-om-1. Razlika ekspresije gena je statistički značajna pri  $P < 0,05$ .

Oznaka gena	Stupanj promjene	P-vrijednost
BMP3	3,8934	0,271092
BMP4	2,9497	0,130995
BMP6	2,0548	0,608736
<b>CD40LG</b>	2,4723	<b>0,030761</b>
<b>CSF2</b>	3,0674	<b>0,015166</b>
FAM3B	3,1384	0,480934
<b>IFNA5</b>	3,5028	<b>0,026391</b>
<b>IL12B</b>	2,1238	<b>0,003064</b>
IL17A	2,0259	0,1583
IL1A	3,2534	0,419171
<b>IL1B</b>	2,8695	<b>0,049501</b>
<b>IL20</b>	4,8335	<b>0,017437</b>
IL24	2,156	0,156654
IL4	3,3122	0,255982
IL8	3,6018	0,072769
INHBA	2,0775	0,225041
<b>LTA</b>	2,249	<b>0,005554</b>
LTB	2,7339	0,068995
<b>OSM</b>	2,1411	<b>0,025287</b>
PDGFA	2,4991	0,371651
<b>SPPI</b>	47,0997	<b>0,045387</b>
<b>TGFA</b>	2,8574	<b>0,044888</b>
TGFB2	5,405	0,145832
TNF	2,6518	0,22515
<b>TNFSF11</b>	5,0302	<b>0,008954</b>
TNFSF13	2,843	0,164964
<b>TNFSF14</b>	2,2639	<b>0,042561</b>
TNFSF4	2,2559	0,236195
<b>TNFSF8</b>	2,3861	<b>0,046716</b>

U Tablici 4. crvenom su bojom označeni geni sa statistički značajnim povećanjem ekspresije u kroničnoj u usporedbi s akutnom HIV-infekcijom te pripadajuća *P*-vrijednost. Oznake gena: **BMP3** (engl. Bone morphogenic protein 3), **BMP4** (engl. Bone morphogenic protein 4), **BMP6** (engl. Bone morphogenic protein 6), **CD40LG** (CD40 ligand), **CSF2** (engl. Colony stimulating factor 2), **FAM3B** (engl. family with sequence similarity 3, member B), **IFNA5** (engl. interferon alpha 5), **IL12B** (Interleukin 12, podjedinica  $\beta$ ), **IL17A** (Interleukin 17, podjedinica  $\alpha$ ), **IL1A** (Interleukin 1, podjedinica  $\alpha$ ), **IL1B** (Interleukin 1, podjedinica  $\beta$ ), **IL20** (Interleukin 20), **IL24** (Interleukin 24), **IL4** (Interleukin 4), **IL8** (Interleukin 8), **INHBA** (Inhibin beta A), **LTA** (engl. Lymphotoxin  $\alpha$ ), **LTB** (engl. Lymphotoxin  $\beta$ ), **OSM** (engl. Oncostatin M), **PDGFA** (engl. Platelet-derived growth factor  $\alpha$  polypeptide), **SPP1** (engl. Secreted phosphoprotein 1), **TGFA** (engl. Transforming growth factor  $\alpha$ ), **TGFB2** (engl. Transforming growth factor  $\beta$ 2), **TNF** (engl. Tumor necrosis factor), **TNFSF11** (engl. Tumor necrosis factor superfamily, member 11), **TNFSF13** (engl. Tumor necrosis factor superfamily, member 13), **TNFSF14** (engl. Tumor necrosis factor superfamily, member 14), **TNFSF4** (engl. Tumor necrosis factor superfamily, member 4), **TNFSF8** (engl. Tumor necrosis factor superfamily, member 8).

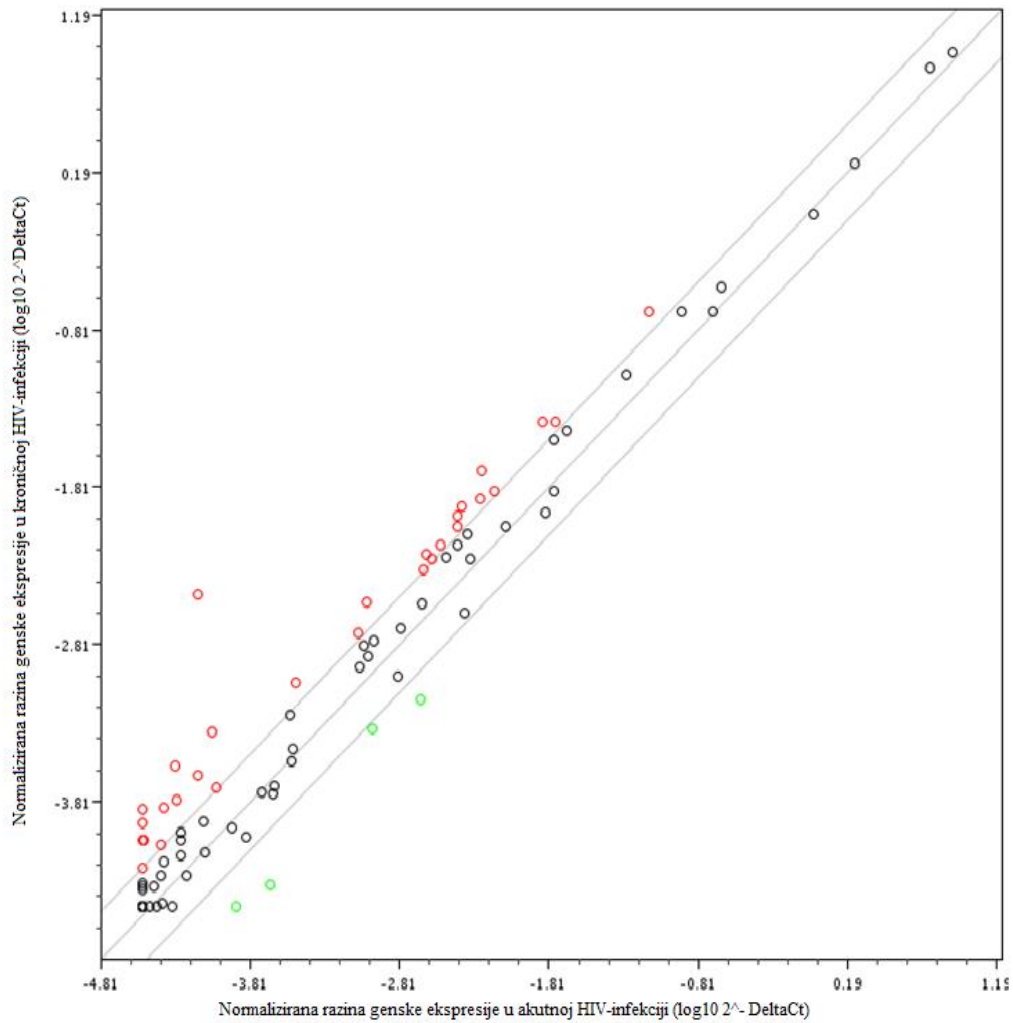
Tablica 5. Geni sa sniženom ekspresijom u kroničnoj u odnosu na akutnu fazu infekcije HIV-om-1. Ekspresija gena uspoređena je u 3 HIV-om zaražene osobe u akutnoj, te u 3 HIV-om zaražene osobe u kroničnoj infekciji HIV-om-1. Razlika ekspresije gena je statistički značajna pri  $P < 0,05$ .

Oznaka gena	Stupanj promjene	<i>P</i> -vrijednost
CD70	-3,1344	0,079237
<b>IL12A</b>	-2,2594	<b>0,020906</b>
IL21	-4,6117	0,147519
THPO	-3,7133	0,130836

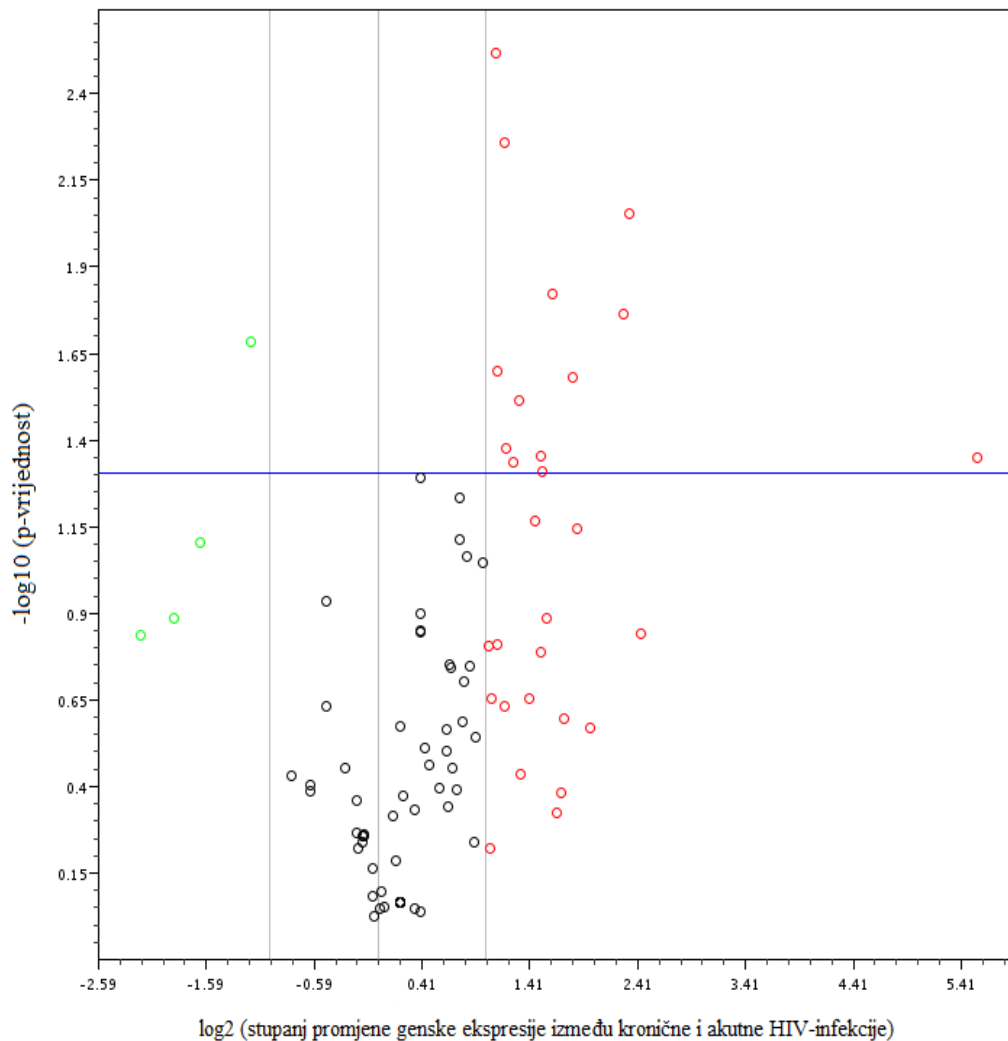
U Tablici 5. prikazani su geni kod kojih je došlo do smanjenja ekspresije u kroničnoj u odnosu na akutnu HIV-infekciju. Zelenom bojom označen je gen kod kojeg je smanjenje ekspresije statistički značajno i pripadajuća *P* -vrijednost. Oznake gena: **CD70** (engl. Cluster of differentiation 70), **IL12A** (Interleukin 12, podjedinica  $\alpha$ ), **IL21** (Interleukin 21), **THPO** (engl. Thrombopoietin).

Na Slici 5. grafički je prikazana usporedba normalizirane ekspresije 84 gena za sintezu citokina između akutne i kronične infekcije HIV-om-1. Iz Slike 6. koja prikazuje promjenu genske ekspresije između akutne i kronične infekcije HIV-om-1 u odnosu na statističku značajnost vidljivo je da je u 14 gena promjena njihove ekspresije statistički značajna.



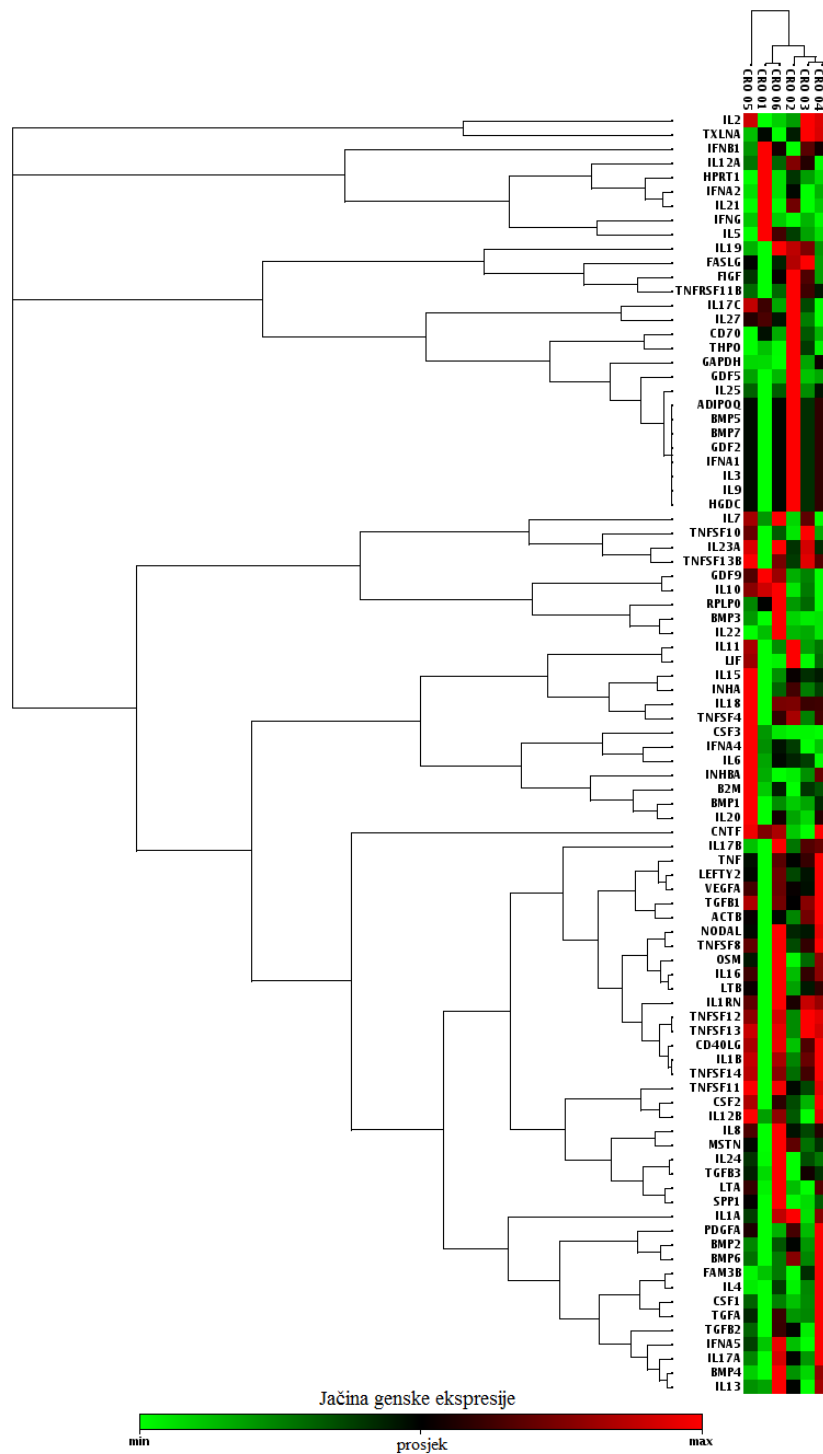


Slika 5. Graf raspršenja („Scatter plot“) uspoređuje normaliziranu ekspresiju svakog od 84 gena. Na x-osi su prikazane vrijednosti  $\log_{10}$  normalizirane genske ekspresije u akutnoj fazi infekcije HIV-om-1, a na y-osi su vrijednosti  $\log_{10}$  normalizirane genske ekspresije u kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1. Crvenim kružićima su označeni geni s povišenom ekspresijom u kroničnoj u odnosu na akutnu infekciju HIV-om-1. Zeleni kružići simboliziraju gene sa smanjenom ekspresijom u kroničnoj u odnosu na akutnu infekciju HIV-om-1.



Slika 6. „Volcano plot“ za 84 analizirana gena prikazuje na x-osi  $\log_2$  vrijednosti stupnja promjene genske ekspresije između kronične i akutne faze infekcije HIV-om-1, u odnosu na statističku značajnost iskazanu na y-osi kao  $-\log_{10} P$  -vrijednosti. Svi kružići iznad horizontalne plave linije (granična vrijednost praga,  $P = 0,05$ ) simboliziraju gene čija je promjena ekspresije između dvije grupe statistički značajna. Kružići crvene boje označavaju gene s povišenom, a zeleni gene sa smanjenom ekspresijom u kroničnoj u odnosu na akutnu fazu infekcije HIV-om-1.

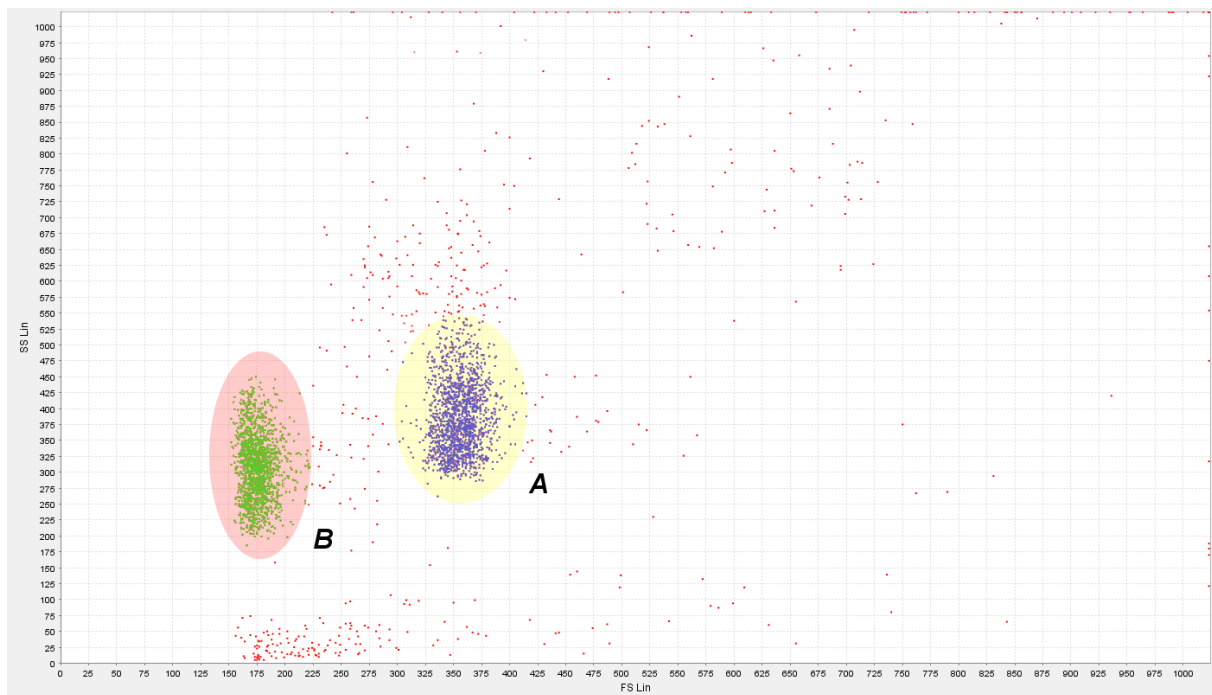
Jačina ekspresije 84 gena prikazana je bojama na Slici 7. gdje zelena boja simbolizira najmanju, a crvena najveću gensku ekspresiju.



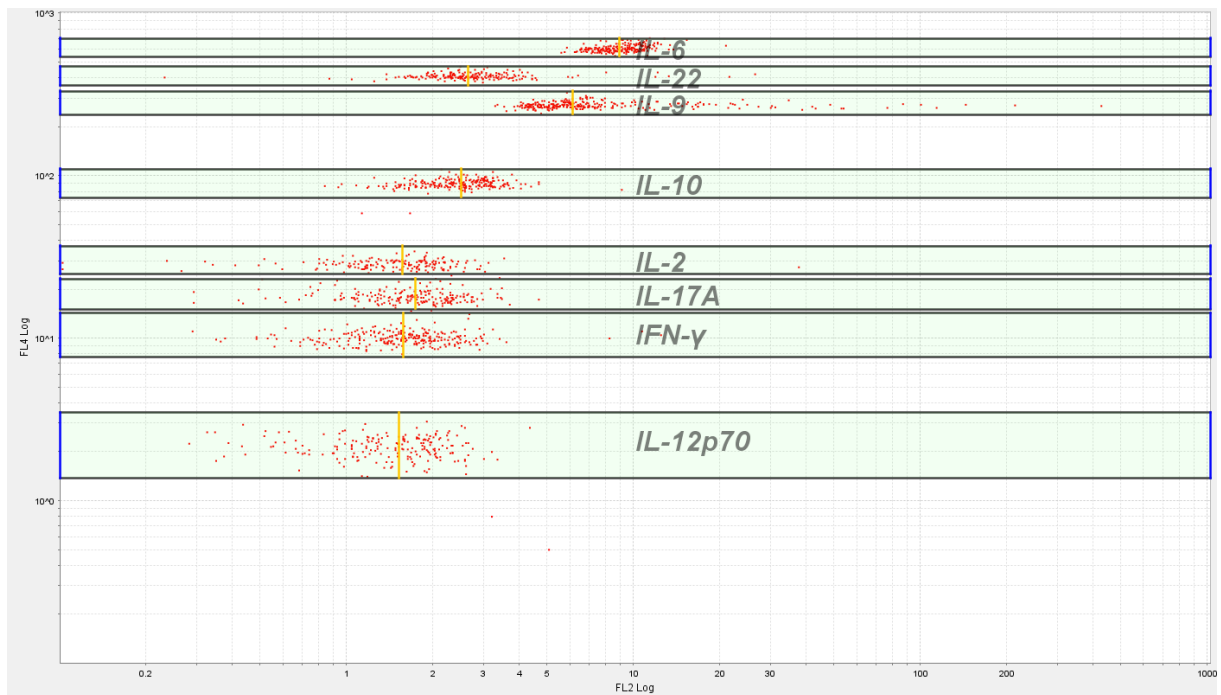
Slika 7. „Clustergram“ prikazuje ekspresiju 84 gena u analiziranim uzorcima koji su označeni oznakama CRO 01 – CRO 06. CRO 01, CRO 02 i CRO 03 su uzorci u kojima sam analizirala gensku ekspresiju u akutnoj fazi infekcije, dok su CRO 04, CRO 05 i CRO 06 uzorci u kojima sam analizirala gensku ekspresiju u kroničnoj infekciji HIV-om-1. Boje simboliziraju jačinu genske ekspresije. Zelena označava minimalnu, a crvena maksimalnu gensku ekspresiju.

#### **4.1.2. Usporedba ekspresije Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina u akutnoj i kroničnoj infekciji HIV-om-1**

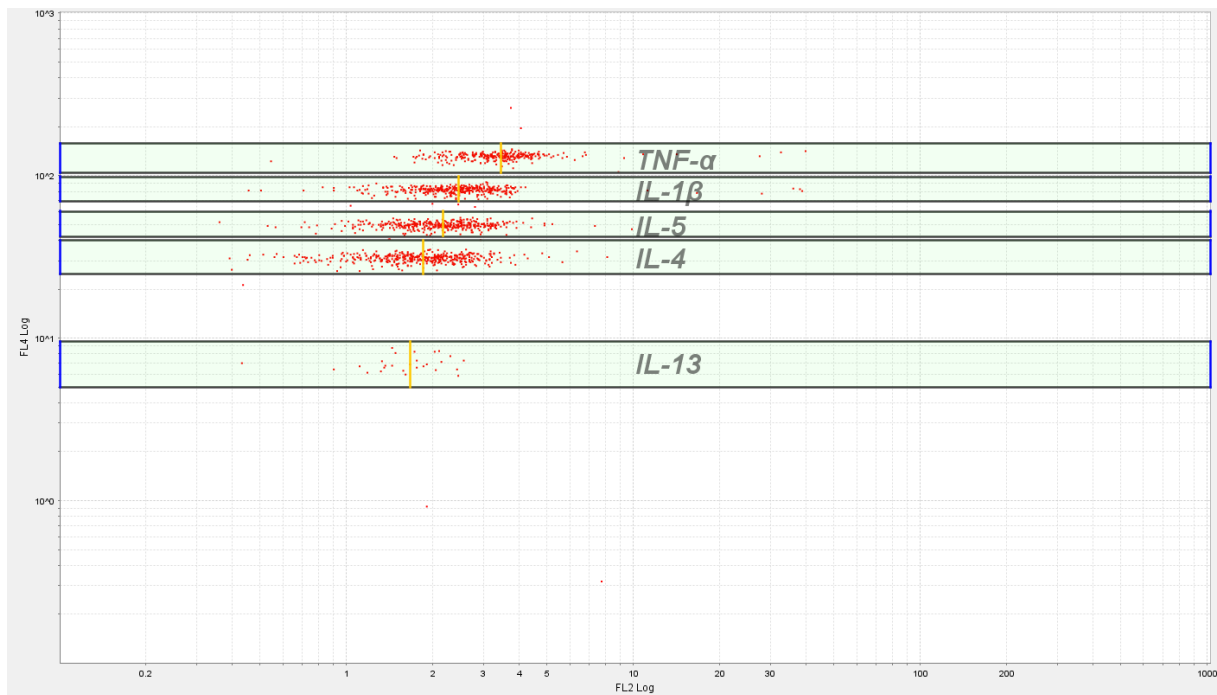
U uzorcima plazme 34 HIV-om zaražene osobe odredila sam koncentracije 13 citokina u tri vremenske točke. U prvoj vremenskoj točki svi ispitanici su bili u akutnoj fazi infekcije HIV-om-1. Medijan viremije iznosio je 224 500 kopija HIV-1 RNA/mL plazme (interkvartilni raspon od 74 808-883 000 kopija HIV-1 RNA/mL plazme). Medijan apsolutnog broja CD4+ limfocita T u prvoj točki iznosio je 396 stanica/ $\mu$ L krvi (interkvartilni raspon 269-466 stanica/ $\mu$ l). Koncentracije citokina u plazmi HIV-om zaraženih osoba mjerila sam i u drugoj vremenskoj točki, odnosno u uzorcima plazme prikupljenim 6 mjeseci od datuma prvog uzorka. U tom periodu viremija se smanjila i medijan je iznosio 52 kopija HIV-1 RNA/mL plazme (interkvartilni raspon od 0-30 214 kopija HIV-1 RNA/mL plazme). Medijan apsolutnog broja CD4+ limfocita T iznosio je 569 stanica / $\mu$ l krvi (interkvartilni raspon 395-700 stanica/ $\mu$ l). Treća vremenska točka je 6 mjeseci poslije druge, odnosno godinu dana od prve točke. Medijan viremije iznosio je 31 kopija HIV-1 RNA/mL plazme (interkvartilni raspon od 0-541 kopija HIV-1 RNA/mL plazme). Medijan apsolutnog broja CD4+ limfocita T u trećoj točki iznosio je 593 stanica / $\mu$ l krvi (interkvartilni raspon 457-734 stanica/ $\mu$ l). Koncentracije 13 citokina odredila sam i u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika (N=22). Slike 8, 9 i 10 prikazuju postupak određivanja koncentracija citokina u plazmi pomoću FlowCytomix Pro software-a za jednog ispitanika.



Slika 8. Dvije populacije fluorescentnih kuglica različitih veličina s vezanim specifičnim protutijelima za pojedini citokin. Na x-osi je prikazano usmjereno (FS), a na y-osi bočno raspršenje svjetlosti (SS) promatrano pri valnoj duljini od 700 nm. Usmjereno raspršenje svjetlosti proporcionalno je veličini promatrane populacije, populacija A je veća od populacije B. Populaciju A čine fluorescentne kuglice kojima sam u plazmi ispitanika detektirala prisutnost 8 citokina: IL-12(p70), IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-2, IL-10, IL-9, IL-22 i IL-6. Populacija B su fluorescentne kuglice za detekciju 5 citokina: IL-4, IL-5, IL-1 $\beta$ , IL-13 i TNF- $\alpha$ .



Slika 9. Analiza citokinskih populacija IL-12(p70), IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-2, IL-10, IL-9, IL-22 i IL-6 pomoću FlowCytomix Pro software-a. Na x-osi je prikazana emisija fikoeritrina pri valnoj duljini od 595 nm, a na y-osi emisija crvene svjetlosti pri valnoj duljini od 700 nm



Slika 10. Analiza citokinskih populacija IL-4, IL-5, IL-1 $\beta$ , IL-13 i TNF- $\alpha$  pomoću FlowCytomix Pro software-a. Na x-osi je prikazana emisija fikoeritrina pri valnoj duljini od 595 nm, a na y-osi emisija crvene svjetlosti pri valnoj duljini od 700 nm

Dobivene koncentracije citokina u plazmi 34 HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji HIV-om-1 prikazane su u Tablici 6. U Tablici 7. su prikazane koncentracije citokina u plazmi 34 HIV-om zaraženih osoba određene u drugoj vremenskoj točki, odnosno 6 mjeseci nakon akutne infekcije HIV-om-1. Koncentracije citokina određene u plazmi 34 HIV-om zaraženih osoba 12 mjeseci od akutne infekcije HIV-om-1 prikazane su u Tablici 8. Tablica 9. prikazuje dobivene koncentracije citokina u plazmi kontrolne skupine koju čine 22 HIV-negativne osobe.

Tablica 6. Koncentracija citokina u plazmi 34 HIV-om zaraženih osoba u prvoj vremenskoj točki (akutna infekcija, T1)

Citokin	Medijan (pg/mL)	Donja kvartila (pg/mL)	Gornja kvartila (pg/mL)	Minimum (pg/mL)	Maksimum (pg/mL)
IL-12(p70)	3,7	0,3	11,1	0,0	117,3
IFN- $\gamma$	16,7	0,0	34,2	0,0	1154,8
IL-17A	30,5	0,0	100,8	0,0	1191,1
IL-2	34,1	0,0	113,6	0,0	626,2
IL-10	12,1	3,8	29,5	0,0	520,5
IL-9	29,6	0,0	220,6	0,0	2596,1
IL-22	127,6	0,0	215	0,0	2155,1
IL-6	1,9	0,0	5,1	0,0	66,2
IL-13	67,1	2,4	115	0,0	547,5
IL-4	77,6	0,0	252,4	0,0	535,2
IL-5	18,2	7,9	37,8	0,0	529,2
IL-1 $\beta$	38,0	12,7	54,4	0,0	789,6
TNF- $\alpha$	5,4	0,0	36,2	0,0	573,5



Tablica 7. Koncentracija citokina u plazmi 34 HIV-om zaraženih osoba u drugoj vremenskoj točki, 6 mjeseci od akutne faze infekcije HIV-om-1 (T2)

Citokin	Medijan (pg/mL)	Donja kvartila (pg/mL)	Gornja kvartila (pg/mL)	Minimum (pg/mL)	Maksimum (pg/mL)
IL-12(p70)	3,9	0,1	11,1	0,0	107,6
IFN- $\gamma$	0,0	0,0	21,8	0,0	1176,5
IL-17A	18,2	4,4	74,2	0,0	831,2
IL-2	32,0	10,2	179,6	0,0	668,5
IL-10	11,2	4,9	23,5	0,0	453,8
IL-9	0,6	0,0	39,1	0,0	561,7
IL-22	141,9	0,0	223,7	0,0	2009,2
IL-6	0,7	0,0	3,1	0,0	69,6
IL-13	98,5	28,6	121,7	0,0	589,7
IL-4	63,6	0,0	164,8	0,0	482,7
IL-5	21,1	3,9	32,9	0,0	572,1
IL-1 $\beta$	32,4	13,4	79,0	0,0	836,0
TNF- $\alpha$	8,1	0,0	16,2	0,0	673,8

Tablica 8. Koncentracija citokina u plazmi HIV-om zaraženih osoba u trećoj vremenskoj točki, 12 mjeseci od akutne faze infekcije HIV-om-1 (T3)

Citokin	Medijan (pg/mL)	Donja kvartila (pg/mL)	Gornja kvartila (pg/mL)	Minimum (pg/mL)	Maksimum (pg/mL)
IL-12(p70)	3,4	1,4	15,1	0,0	115,2
IFN- $\gamma$	9,2	0,0	31,3	0,0	558,4
IL-17A	20,3	1,7	131,1	0,0	625,9
IL-2	47,9	29,7	255,6	0,0	794,3
IL-10	12,1	5,5	23,8	0,0	243,0
IL-9	5,9	0,0	42,0	0,0	659,0
IL-22	156,5	35,8	263,5	0,0	1426,5
IL-6	1,1	0,0	5,8	0,0	35,6
IL-13	42,5	22,2	136,9	0,0	371,9
IL-4	45,8	0,0	150,4	0,0	607,9
IL-5	19,8	12,3	30,5	0,0	309,0
IL-1 $\beta$	39,3	21,8	78,8	0,0	476,6
TNF- $\alpha$	11,3	1,7	23,4	0,0	339,5

Tablica 9. Koncentracija citokina u plazmi kontrolne skupine koju čine 22 HIV-negativne osobe

Citokin	Medijan (pg/mL)	Donja kvartila (pg/mL)	Gornja kvartila (pg/mL)	Minimum (pg/mL)	Maksimum (pg/mL)
IL-12(p70)	0,3	0,0	5,4	0,0	42,7
IFN- $\gamma$	1,2	0,0	107,0	0,0	404,1
IL-17A	13,1	0,0	123,4	0,0	186,0
IL-2	3,0	0,0	118,5	0,0	336,1
IL-10	0,5	0,0	10,6	0,0	227,5
IL-9	0,3	0,0	46,3	0,0	141,0
IL-22	0,0	0,0	72,5	0,0	1254,6
IL-6	0,0	0,0	0,7	0,0	22,6
IL-13	0,0	0,0	119,7	0,0	249,8
IL-4	0,3	0,0	82,3	0,0	278,6
IL-5	20,7	11,1	86,0	0,0	477,5
IL-1 $\beta$	17,6	0,0	74,9	0,0	284,2
TNF- $\alpha$	0,0	0,0	5,3	0,0	879,2

Usporedila sam dobivene koncentracije citokina između skupina kako bi utvrdila moguće statistički značajne razlike. Rezultate koncentracija citokina u HIV-om zaraženih ispitanika analizirane za svaku od tri vremenske točke u odnosu na rezultate kontrolne skupine. Također sam napravila i statističku analizu rezultata za HIV-om zaražene ispitanike uspoređujući koncentracije između svake od tri vremenske točke (T1 s T2; T1 s T3 i T2 s T3). Utvrdila sam statistički značajno povećanje koncentracija citokina IL-10, IL-4 i TNF- $\alpha$  u akutnoj HIV-

infekciji (T1) u odnosu na kontrolu ( $P = 0,008$ ;  $P = 0,019$ ;  $P = 0,041$ ). Uspoređujući rezultate HIV-om zaraženih ispitanika u drugoj vremenskoj točki s onima kontrolne skupine dokazala sam statistički značajno povećanje koncentracija slijedećih citokina, IL-10, IL-22 i TNF- $\alpha$  ( $P = 0,01$ ;  $P = 0,02$ ;  $P = 0,037$ ). Koncentracije citokina IL-2, IL-10, IL-22, IL-6, IL-13 i TNF- $\alpha$  statistički su značajno povećane u HIV-om zaraženih ispitanika u trećoj točki mjerenja u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $P = 0,028$ ;  $P = 0,003$ ;  $P = 0,014$ ;  $P = 0,046$ ;  $P = 0,037$ ;  $P = 0,007$ ).  $P$  -vrijednosti su prikazane u Tablici 10. Uspoređujući koncentracije citokina unutar skupine HIV-om zaraženih ispitanika između svake od tri vremenske točke jedino statistički značajno smanjenje dokazala sam za IL-9 između prve dvije vremenske točke ( $P = 0,04$ ) (Tablica 11).

Tablica 10. *P* -vrijednosti između skupine 34 HIV-om zaraženih ispitanika za sve tri točke mjerenja (T1, T2 i T3) i kontrole za svaki pojedini citokin. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba godinu dana nakon T1. Kontrolu čine uzorci plazme 22 HIV-negativne osobe

Citokin	<i>P</i> -vrijednost (T1, kontrola; Fisher`s exact test)	<i>P</i> -vrijednost (T2, kontrola; Fisher`s exact test)	<i>P</i> -vrijednost (T3, kontrola; Fisher`s exact test)
IL-12(p70)	0,098	0,141	0,054
IFN- $\gamma$	0,503	0,619	0,740
IL-17A	0,298	0,342	0,299
IL-2	0,360	0,187	0,028
IL-10	0,008	0,010	0,003
IL-9	0,112	0,840	0,541
IL-22	0,051	0,020	0,014
IL-6	0,083	0,209	0,046
IL-13	0,100	0,074	0,037
IL-4	0,019	0,120	0,073
IL-5	0,352	0,369	0,557
IL-1 $\beta$	0,189	0,222	0,126
TNF- $\alpha$	0,041	0,037	0,007

Crvenom bojom označene su *P* -vrijednosti <0,05

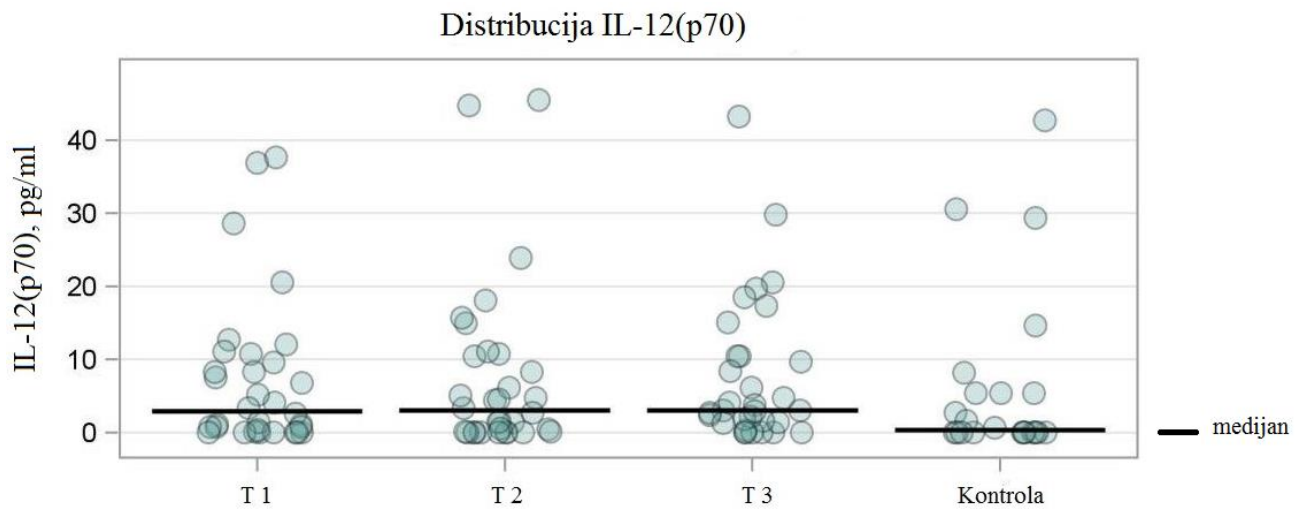
Tablica 11. *P* -vrijednosti unutar skupine HIV-om zaraženih ispitanika između svake od tri točke mjerenja (T1, T2 i T3) za svaki pojedini citokin. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba godinu dana nakon T1.

Citokin	<i>P</i> -vrijednost (T1, T2; Wilcoxon signed rank test)	<i>P</i> -vrijednost (T1, T3; Wilcoxon signed rank test)	<i>P</i> -vrijednost (T2, T3; Wilcoxon signed rank test)
IL-12(p70)	0,949	0,720	0,759
IFN- $\gamma$	0,133	0,167	0,496
IL-17A	0,153	0,229	0,725
IL-2	0,462	0,398	0,208
IL-10	0,645	0,365	0,860
IL-9	0,040	0,172	0,956
IL-22	0,539	0,954	0,565
IL-6	0,104	0,479	0,536
IL-13	0,431	0,979	0,578
IL-4	0,527	0,208	0,852
IL-5	0,763	0,914	0,648
IL-1 $\beta$	1,000	0,794	0,681
TNF- $\alpha$	0,761	0,759	0,808

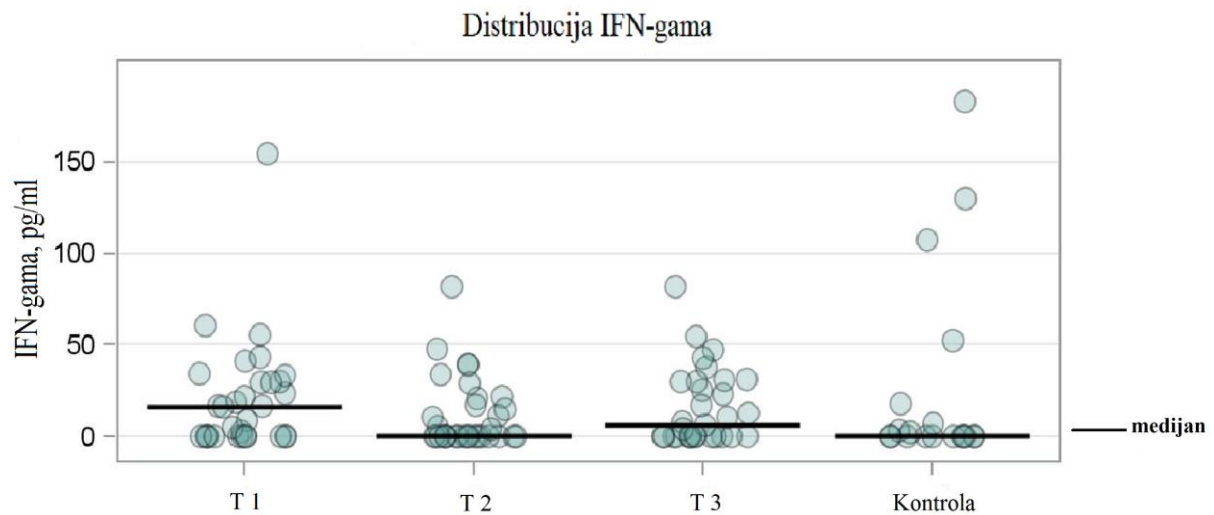
Crvenom bojom označene su *P* -vrijednosti <0,05

Slike 11 – 23 prikazuju pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijana za svaki od 13 ispitivanih citokina u sve tri točke mjerenja (akutna infekcija HIV-om-1, 6 mjeseci nakon

akutne faze infekcije HIV-om-1, godinu dana nakon akutne faze infekcije HIV-om-1), kao i u kontrolnoj skupini koju čine 22 HIV-negativne osobe.

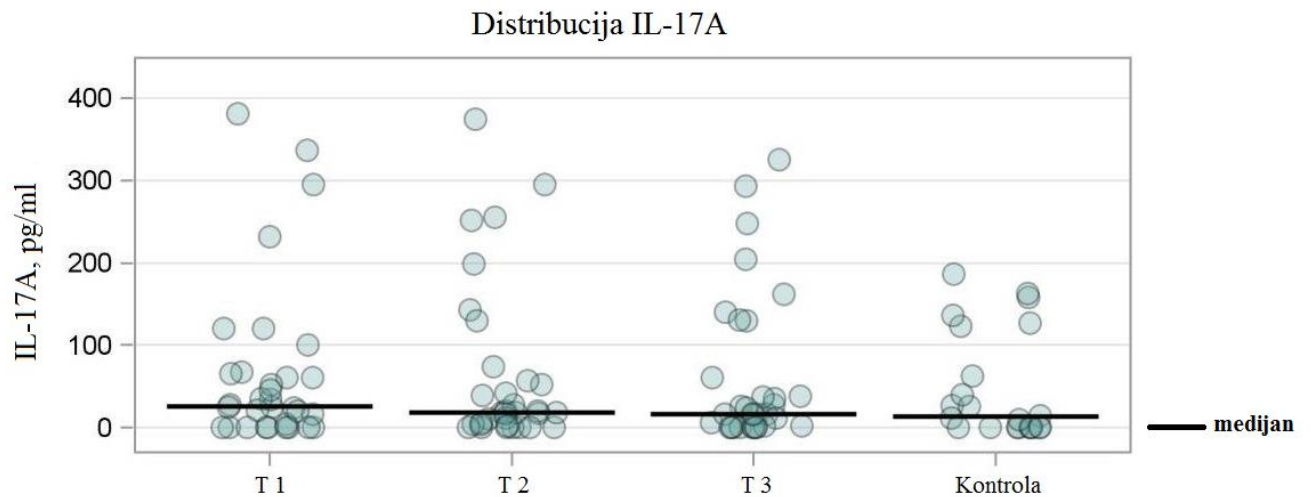


Slika 11. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-12(p70) u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-12(p70), dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.

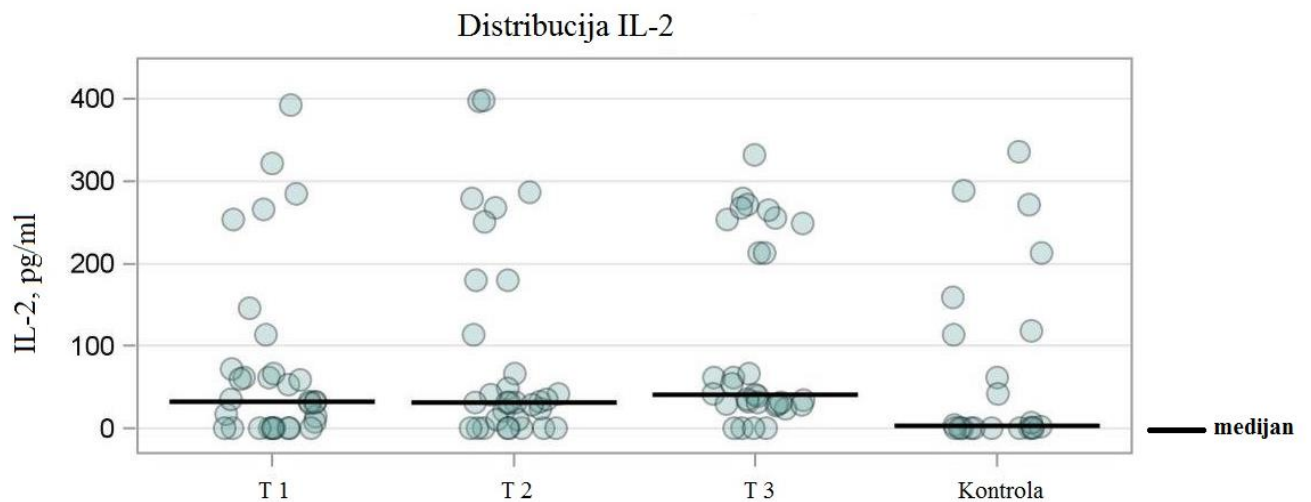


Slika 12. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IFN- $\gamma$  u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IFN- $\gamma$ , dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.

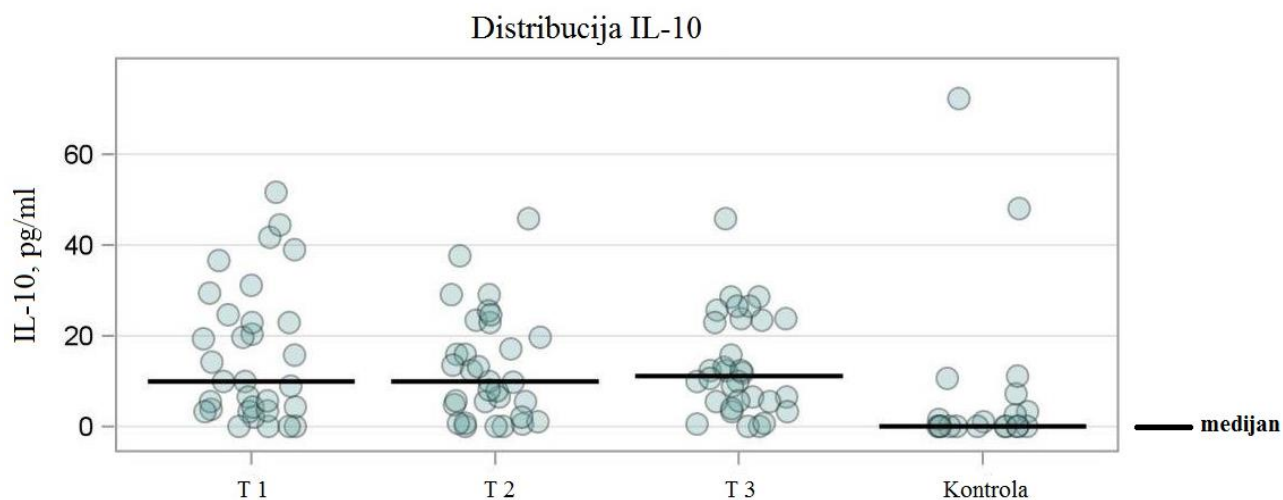




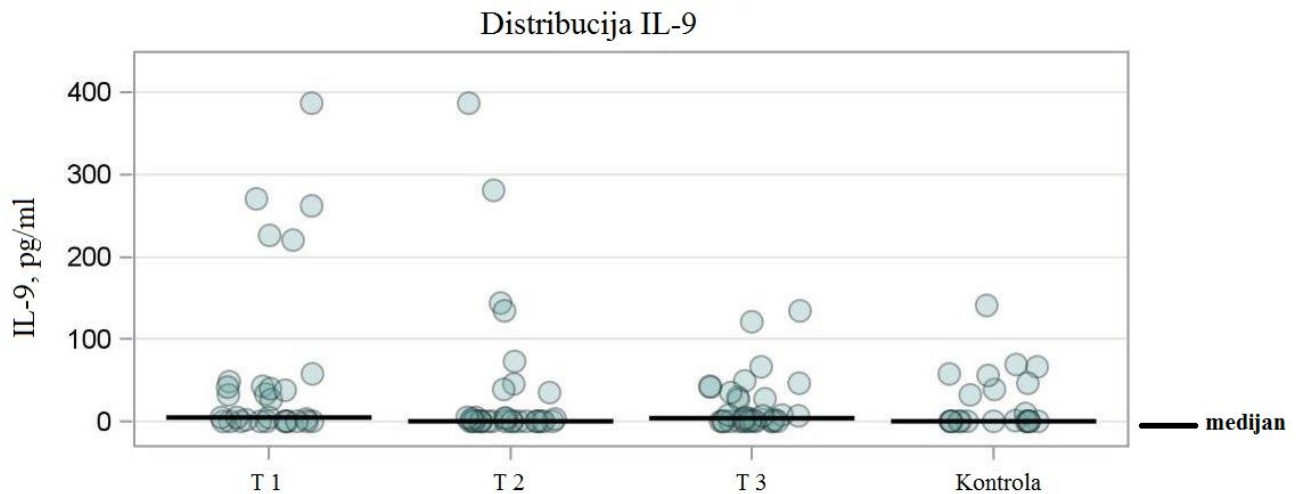
Slika 13. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-17A u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-17A, dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.



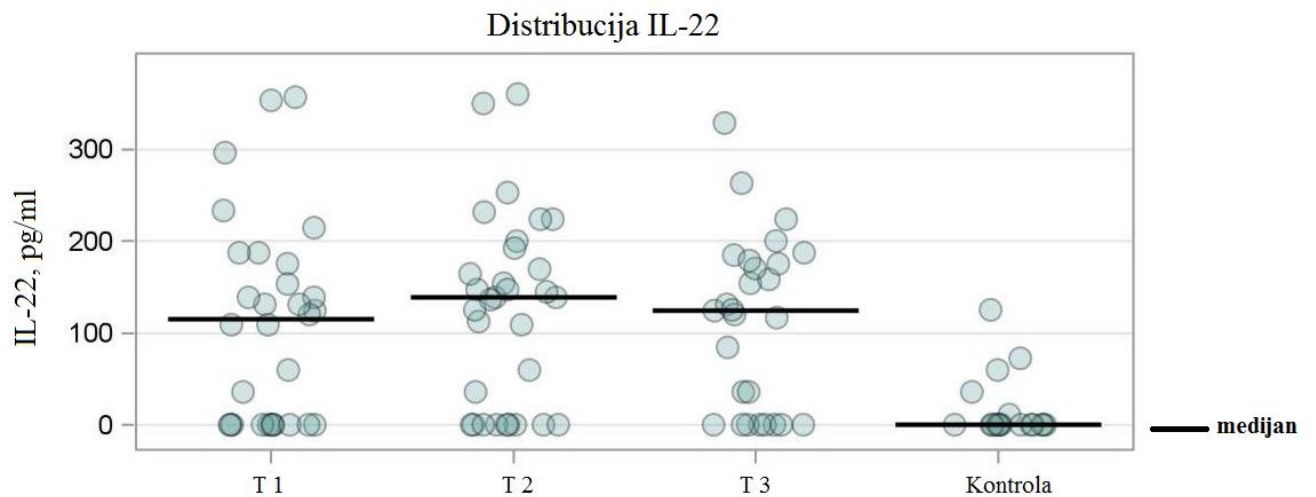
Slika 14. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-2 u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-2, dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.



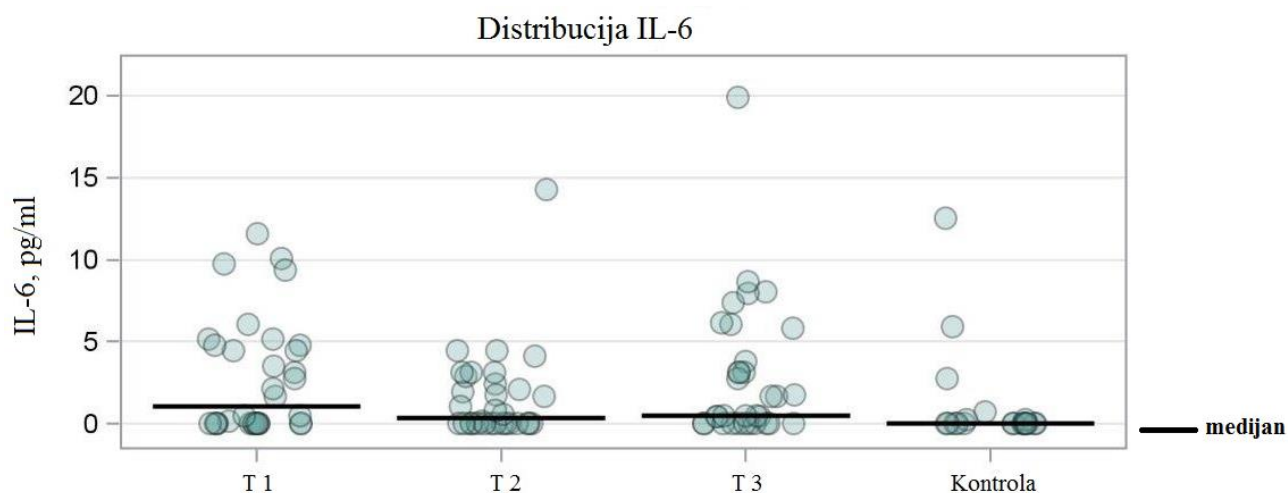
Slika 15. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-10 u HIV-pozitivnih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-10, dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.



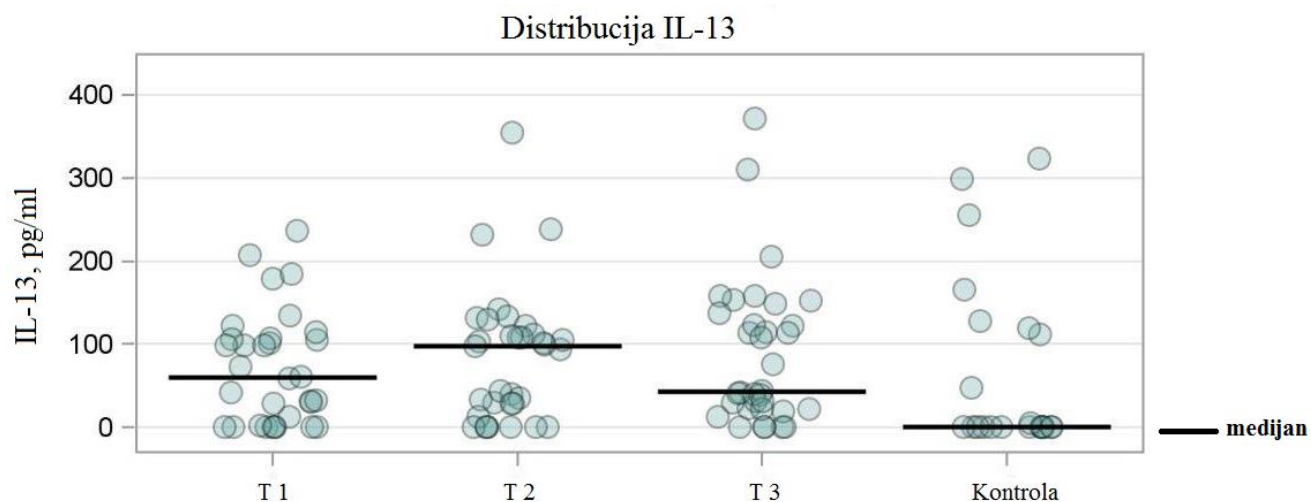
Slika 16. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-9 u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-9, dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.



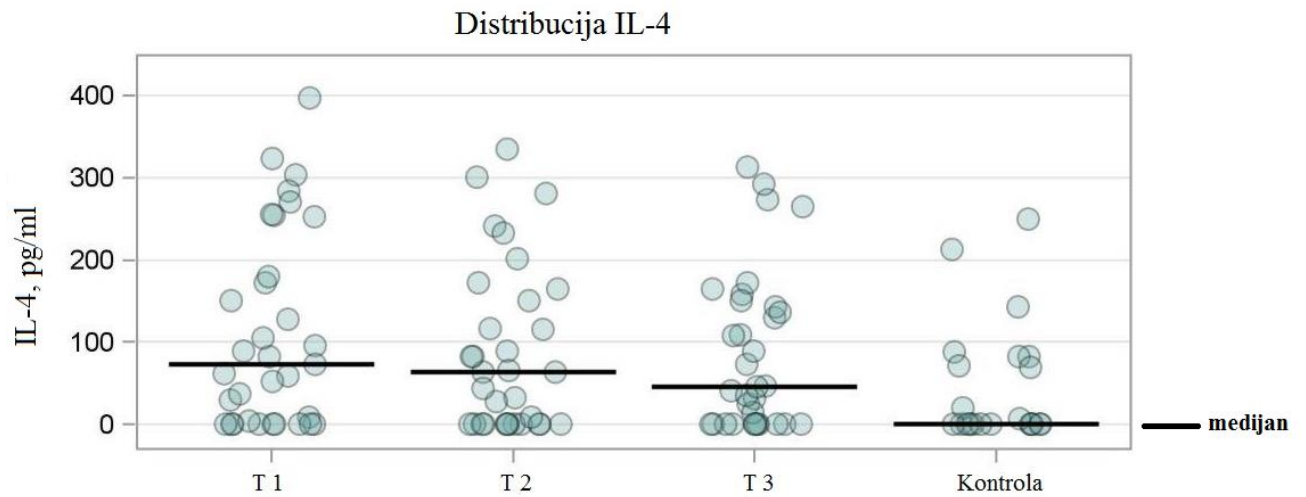
Slika 17. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-22 u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-22, dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.



Slika 18. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-6 u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-6, dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.

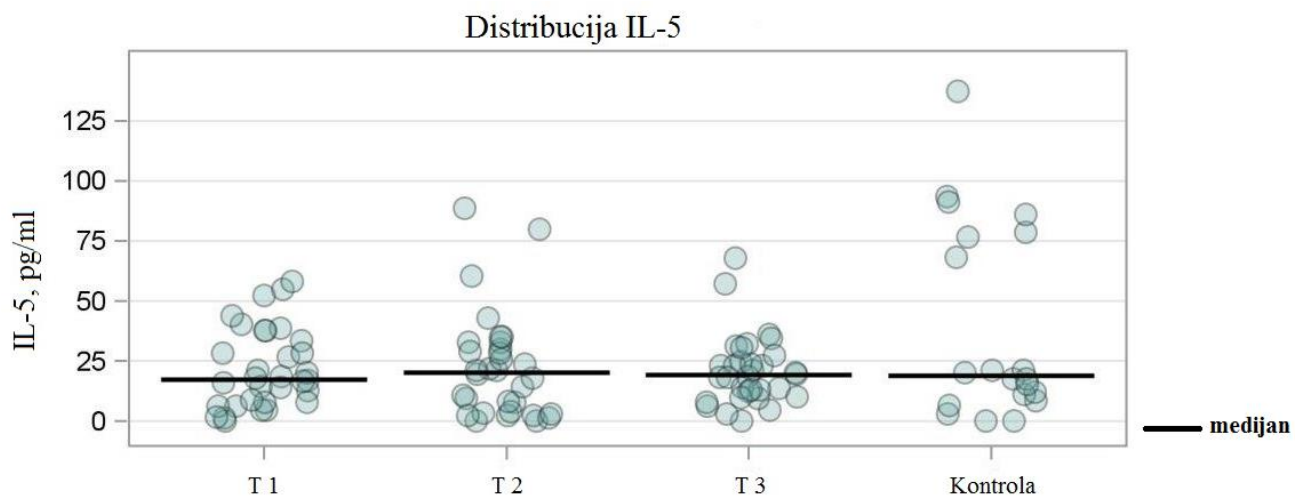


Slika 19. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-13 u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-13, dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.

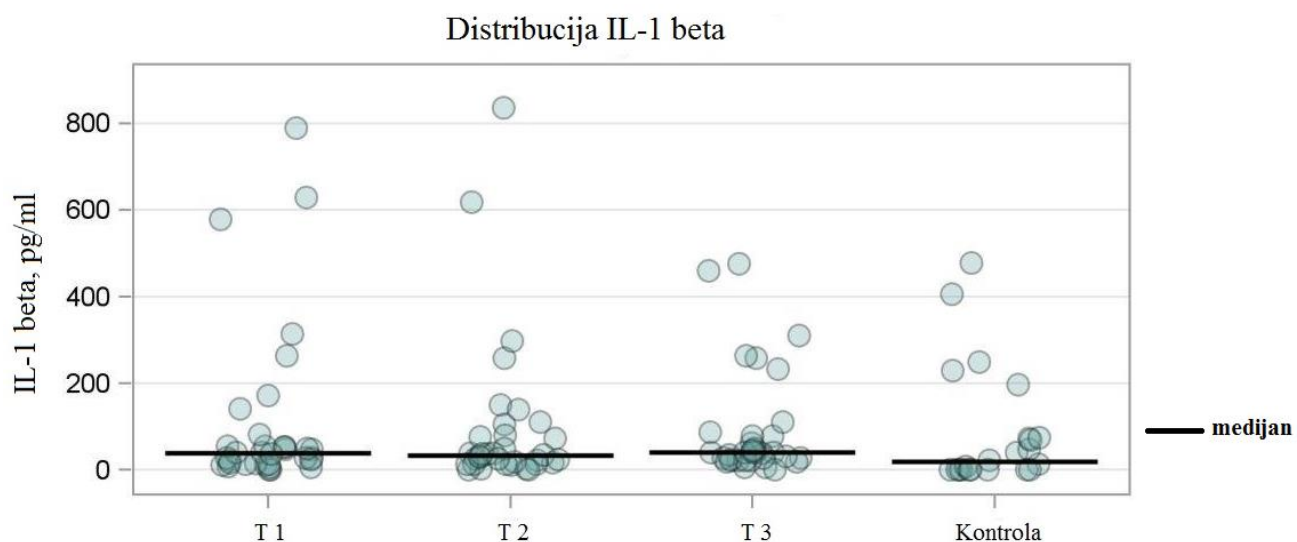


Slika 20. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-4 u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-4, dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.

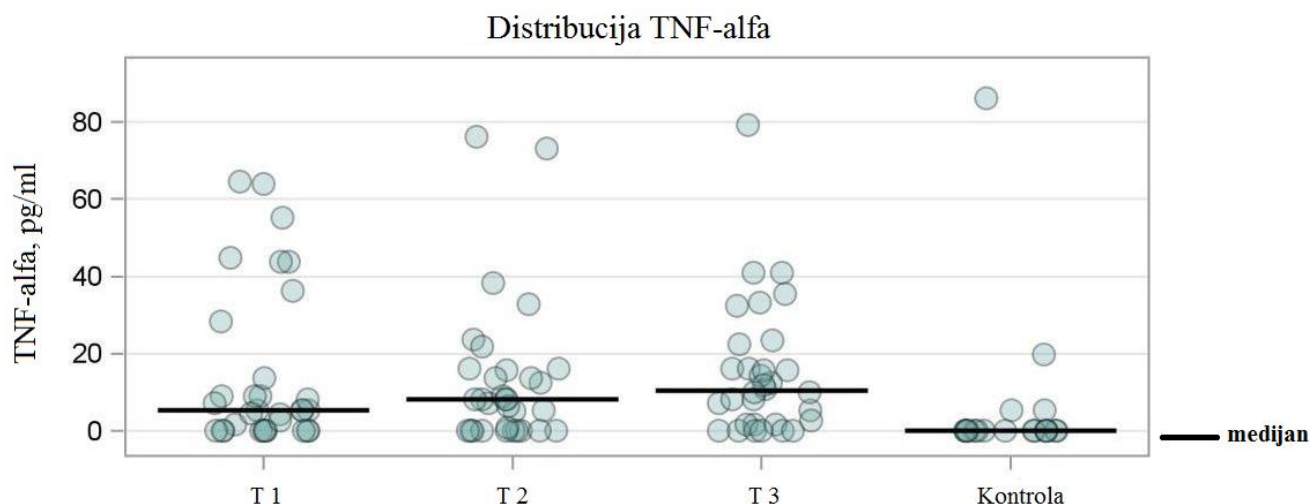




Slika 21. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-5 u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-5, dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.



Slika 22. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za IL-1 $\beta$  u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju IL-1 $\beta$ , dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.



Slika 23. Pojedinačne vrijednosti koncentracija i medijan za TNF- $\alpha$  u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke i u kontrolnoj skupini. Kružići prikazuju pojedinačnu koncentraciju TNF- $\alpha$ , dok je medijan prikazan horizontalnom crnom linijom. T1 označava prvu vremensku točku u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba u akutnoj infekciji. T2 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T1. T3 je vremenska točka u kojoj je prikupljena plazma HIV-om zaraženih osoba šest mjeseci od T2, odnosno godinu dana nakon T1.

#### 4.1.3. Ekspresija aktivacijskih biljega HLA-DR i CD38 na limfocitima T u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1

Protočnom citometrijom pune krvi HIV-om zaraženih ispitanika odredila sam postotak limfocita T koji ekspimiraju aktivacijski biljeg HLA-DR i CD8+ limfocita T s ekspresijom biljega CD38 u iste tri vremenske točke u kojima sam analizirala ekspresiju Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina u akutnoj i kroničnoj HIV-infekciji (Tablica 12). Usporedila sam dobivene vrijednosti za tri vremenske točke međusobno. Ekspresija aktivacijskog biljega HLA-DR na limfocitima T značajno je smanjena u drugoj i trećoj u odnosu na prvu vremensku točku što ukazuje na smanjenje aktivacije imunskog sustava napredovanjem HIV-infekcije (Wilcoxon Two-Sample test,  $P < 0,001$ ;  $P < 0,001$ ). Razlika ekspresija aktivacijskog biljega HLA-DR na limfocitima T u uzorcima krvi HIV-om zaraženih ispitanika između druge i treće točke mjerenja nije statistički značajna (Wilcoxon Two-Sample test,  $P$

=0,199). Napredovanjem infekcije HIV-om-1 iz akutne u kroničnu fazu dolazi do smanjenja ekspresije aktivacijskog biljega CD38 na CD8+ limfocitima T u drugoj i trećoj točki mjerenja u odnosu na prvu (Wilcoxon Two-Sample test,  $P = 0,0013$ ;  $P < 0,001$ ), kao i između druge i treće točke (Wilcoxon Two-Sample test,  $P = 0,033$ ).

Tablica 12. Postotci CD3+HLA-DR+ i CD8+CD38+ limfocita T u HIV-om zaraženih ispitanika mjereni u tri vremenske točke

Vremenske točke	Broj ispitanika	Subpopulacija limfocita T	Medijan	Donja kvartila	Gornja kvartila
T1 (akutna HIV-infekcija)	34	CD3+HLA-DR+	15,8	10,2	27,5
	15	CD8+CD38+	27,0	20,0	43,0
T2 (6 mjeseci nakon T1)	34	CD3+HLA-DR+	5,2	3,0	10,0
	16	CD8+CD38+	15,5	8,0	20,0
T3 (12 mjeseci nakon T1)	34	CD3+HLA-DR+	4,4	2,5	7,7
	20	CD8+CD38+	6,0	5,0	11,5

Legenda: **CD3+HLA-DR+** (limfociti T koji ekspiriraju aktivacijski biljeg HLA-DR), **CD8+CD38+** (citotoksični limfociti koji ekspiriraju aktivacijski biljeg CD38)

## **4.2 Longitudinalna analiza učinka dugotrajne supresije virusne replikacije na ekspresiju Th1, Th2, Th9, Th17 i Th22 citokina**

U uzorcima plazme 80 HIV-om zaraženih osoba mjerila sam koncentracije 13 citokina u dvije vremenske točke, prije započinjanja liječenja antiretrovirusnim lijekovima i nakon minimalno 2 godine kontinuirane virusne supresije. U prvoj vremenskoj točki svi ispitanici su imali mjerljivu viremiju. Medijan viremije iznosio je 80 650 kopija HIV-1 RNA/mL plazme (interkvartilni raspon od 27 057-363 000 kopija HIV-1 RNA/mL plazme). Medijan apsolutnog broja CD4+ limfocita T u prvoj točki iznosio je 237 stanica / $\mu$ l krvi (interkvartilni raspon 64-306 stanica/ $\mu$ l). U drugoj vremenskoj točki u svih ispitanika virusna replikacija bila je suprimirana i viremija je bila nemjerljiva. Medijan apsolutnog broja CD4+ limfocita T iznosio je 579 stanica/ $\mu$ L krvi (interkvartilni raspon 446-792 stanica/ $\mu$ l). Koncentracije 13 citokina odredila sam u HIV-om zaraženih osoba u obje vremenske točke kao i u kontrolnoj skupini ispitanika (N=22). Dobivene koncentracije u pojedinoj vremenskoj točki su prikazane u Tablici 13. i Tablici 14.

Tablica 13. Koncentracije citokina u plazmi 80 HIV-om zaraženih osoba u prvoj vremenskoj točki (prije započinjanja liječenja antiretrovirusnim lijekovima)

Citokin	Medijan (pg/mL)	Donja kvartila (pg/mL)	Gornja kvartila (pg/mL)	Minimum (pg/mL)	Maksimum (pg/mL)
IL-12(p70)	0,0	0,0	1,1	0,0	168,2
IFN- $\gamma$	0,9	0,0	23,5	0,0	966,7
IL-17A	0,0	0,0	5,7	0,0	296,5
IL-2	0,0	0,0	15,9	0,0	571,6
IL-10	0,0	0,0	7,3	0,0	377,0
IL-9	0,0	0,0	2,0	0,0	508,7
IL-22	0,0	0,0	67,1	0,0	1815,8
IL-6	0,2	0,0	4,5	0,0	266,6
IL-13	0,0	0,0	9,6	0,0	482,2
IL-4	0,0	0,0	9,8	0,0	409,4
IL-5	18,3	7,7	93,9	0,0	442,4
IL-1 $\beta$	0,0	0,0	23,6	0,0	753,7
TNF- $\alpha$	0,0	0,0	0,4	0,0	479,4

Tablica 14. Koncentracije citokina u plazmi 80 HIV-om zaraženih osoba u drugoj vremenskoj točki (nakon minimalno dvije godine kontinuirane virusne supresije)

Citokin	Medijan (pg/mL)	Donja kvartila (pg/mL)	Gornja kvartila (pg/mL)	Minimum (pg/mL)	Maksimum (pg/mL)
IL-12(p70)	0,0	0,0	1,3	0,0	56,2
IFN- $\gamma$	2,2	0,0	15,0	0,0	766,5
IL-17A	0,0	0,0	8,8	0,0	238,1
IL-2	0,0	0,0	17,4	0,0	437,6
IL-10	0,0	0,0	2,8	0,0	938,9
IL-9	0,0	0,0	28,6	0,0	471,9
IL-22	0,0	0,0	149,0	0,0	1453,9
IL-6	0,0	0,0	2,1	0,0	40,9
IL-13	0,0	0,0	15,1	0,0	531,8
IL-4	0,0	0,0	9,9	0,0	335,1
IL-5	17,1	5,5	61,2	0,0	537,9
IL-1 $\beta$	0,0	0,0	30,1	0,0	974,4
TNF- $\alpha$	0,0	0,0	6,4	0,0	879,2

Koncentracije citokina u plazmi kontrolne skupine prikazani su u Tablici 9.

Usporedila sam koncentracije citokina u plazmi HIV-om zaraženih osoba između prve vremenske točke (T1), odnosno druge vremenske točke (T2) i kontrolne skupine, kao i u HIV-om zaraženih osoba između dviju vremenskih točaka kako bi istražila postoji li statistički

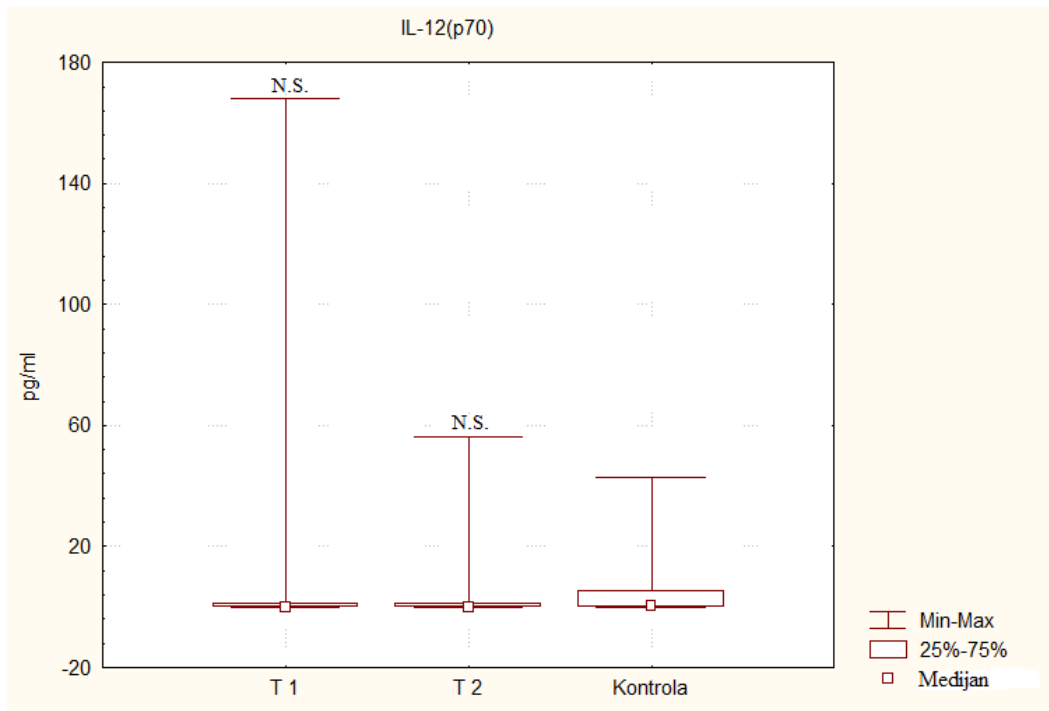
značajna razlika među skupinama. Od 13 ispitivanih citokina samo je koncentracija IL-17A značajno snižena u HIV-om zaraženih osoba prije započinjanja terapije u odnosu na kontrolnu skupinu (Fisher`s exact test,  $P = 0,03$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15.  $P$  -vrijednosti između ispitivanih skupina (T1, T2 i kontrola) za svaki pojedini citokin. T1 je prva vremenska točka u kojoj su prikupljeni uzorci plazme u 80 HIV-om zaraženih osoba prije započinjanja antiretrovirusne terapije. T2 je druga vremenska točka u kojoj su prikupljeni uzorci plazme u 80 HIV-om zaraženih osoba nakon minimalno dvije godine kontinuirane supresije virusne replikacije. Kontrolnu skupinu čine 22 HIV-negativne osobe. Crvenom bojom označene su  $P$  -vrijednosti  $< 0,05$

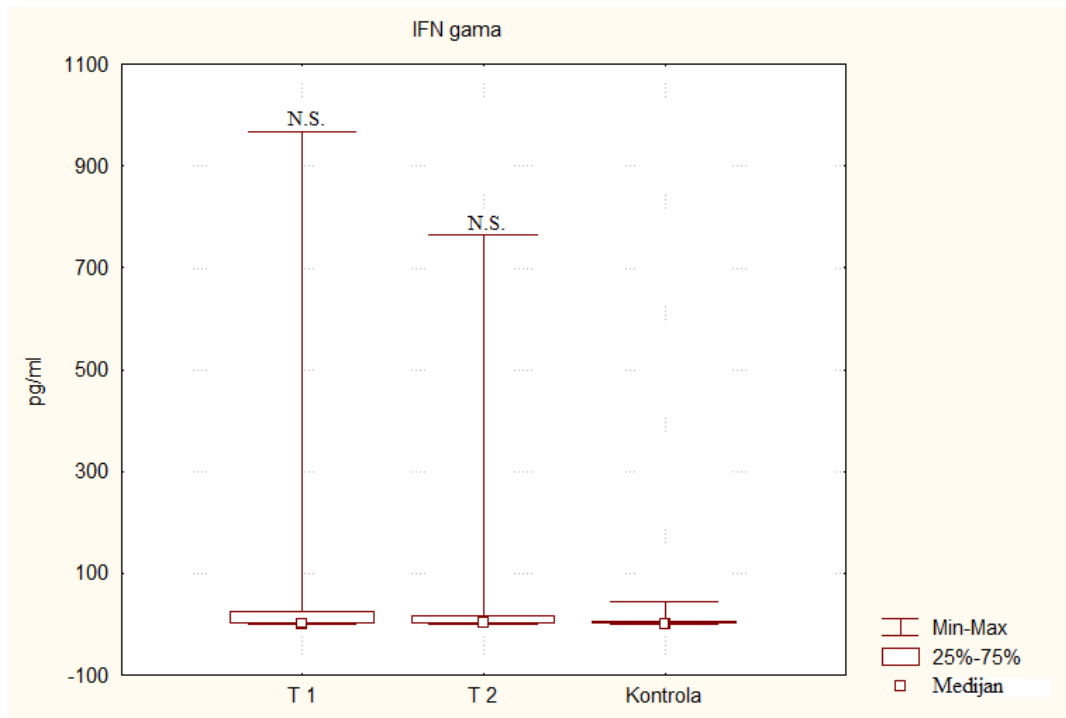
Citokin	$P$ -vrijednost (T1, kontrola; Fisher`s exact test)	$P$ -vrijednost (T2, kontrola; Fisher`s exact test)	$P$ -vrijednost (T1,T2; Wilcoxon signed rank test)
IL-12(p70)	0,219	0,201	0,746
IFN- $\gamma$	0,976	0,767	0,924
IL-17A	0,028	0,053	0,989
IL-2	0,137	0,315	0,700
IL-10	0,618	0,236	0,942
IL-9	0,130	0,629	0,063
IL-22	0,332	0,733	0,416
IL-6	0,133	0,300	0,540
IL-13	0,368	0,715	0,384
IL-4	0,246	0,382	0,603
IL-5	0,769	0,502	0,898
IL-1 $\beta$	0,082	0,230	0,470
TNF- $\alpha$	0,512	0,746	0,445



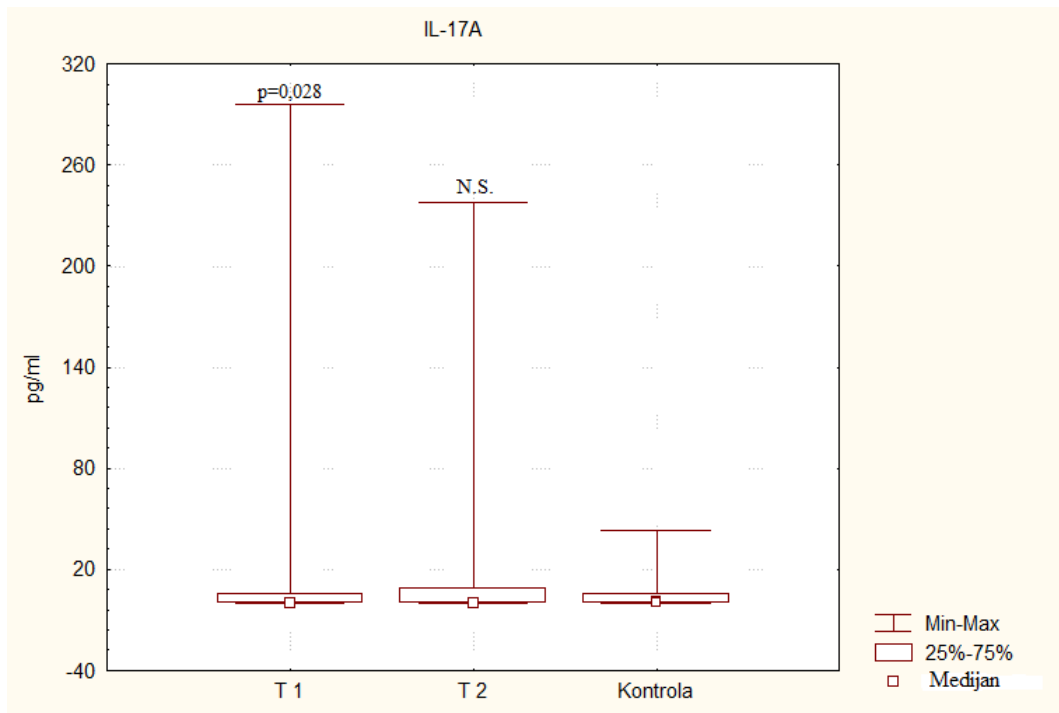
Koncentracije 13 ispitivanih citokina određene u plazmi HIV-negativne kontrolne skupine, te u plazmi HIV-pozitivnih osoba u dvije vremenske točke, prije započinjanja antiretrovirusne terapije i nakon minimalno dvije godine kontinuirane supresije virusne replikacije prikazani su grafikonima „kutija i brkovi“ (box and whiskers plots) (Slika 24 do Slika 36).



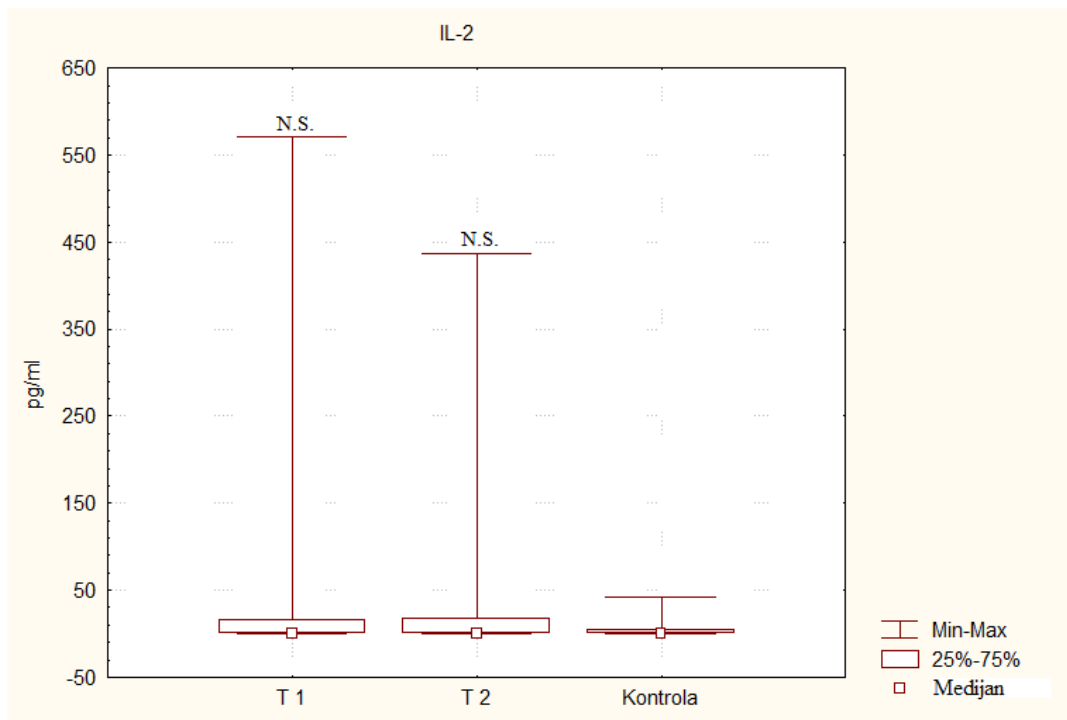
Slika 24. Koncentracija IL-12 u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P=0,75$ ).



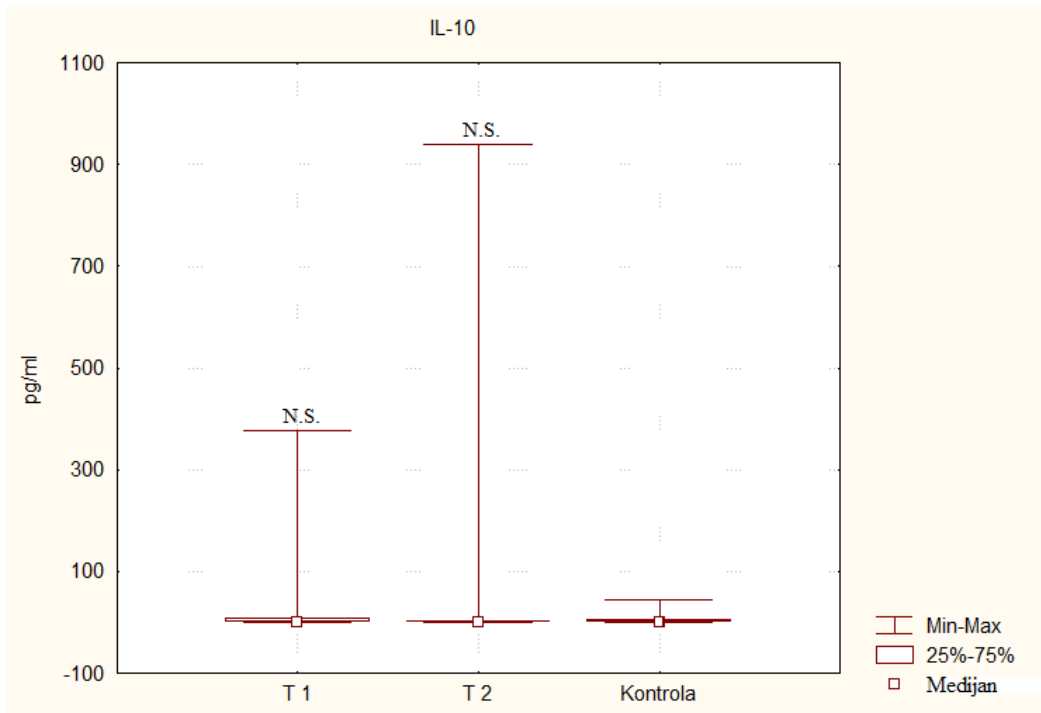
Slika 25. Koncentracija IFN- $\gamma$  u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,92$ ).



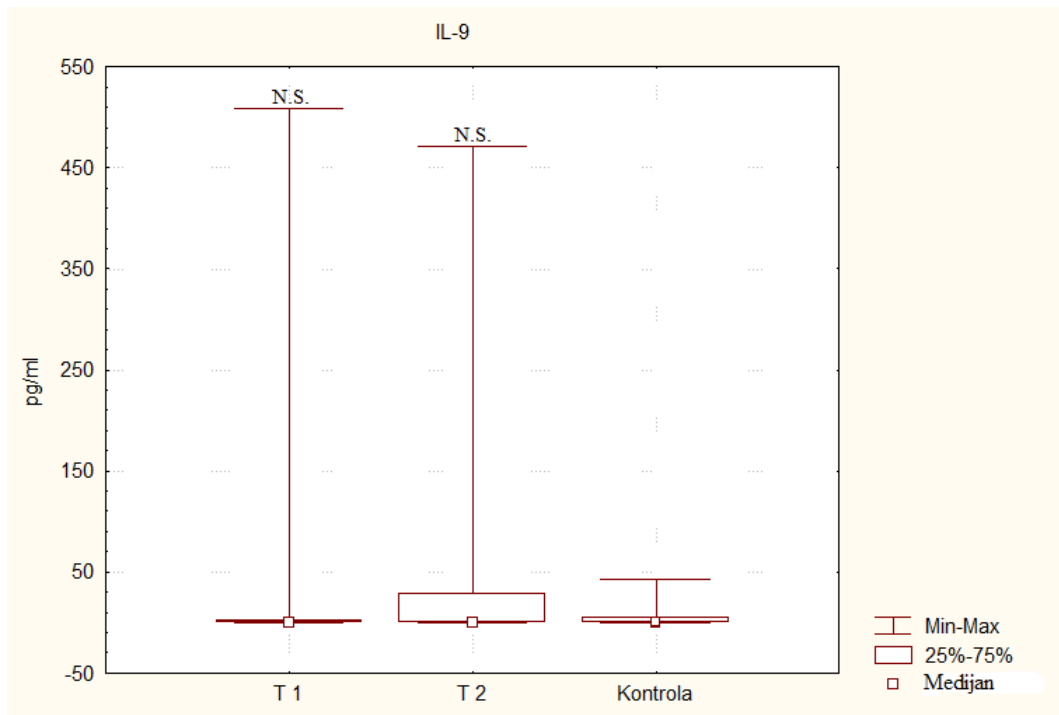
Slika 26. Koncentracija IL-17A u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika je statistički značajna između grupe T1 i kontrolne skupine ( $P = 0,028$ ). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,92$ ).



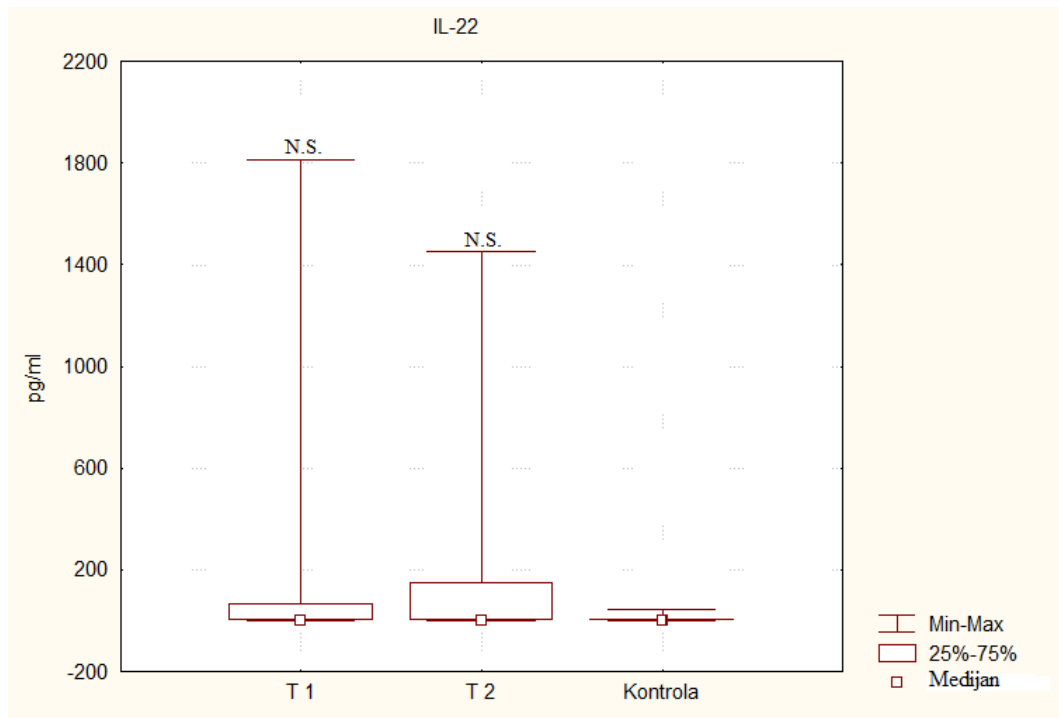
Slika 27. Koncentracija IL-2 u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,70$ ).



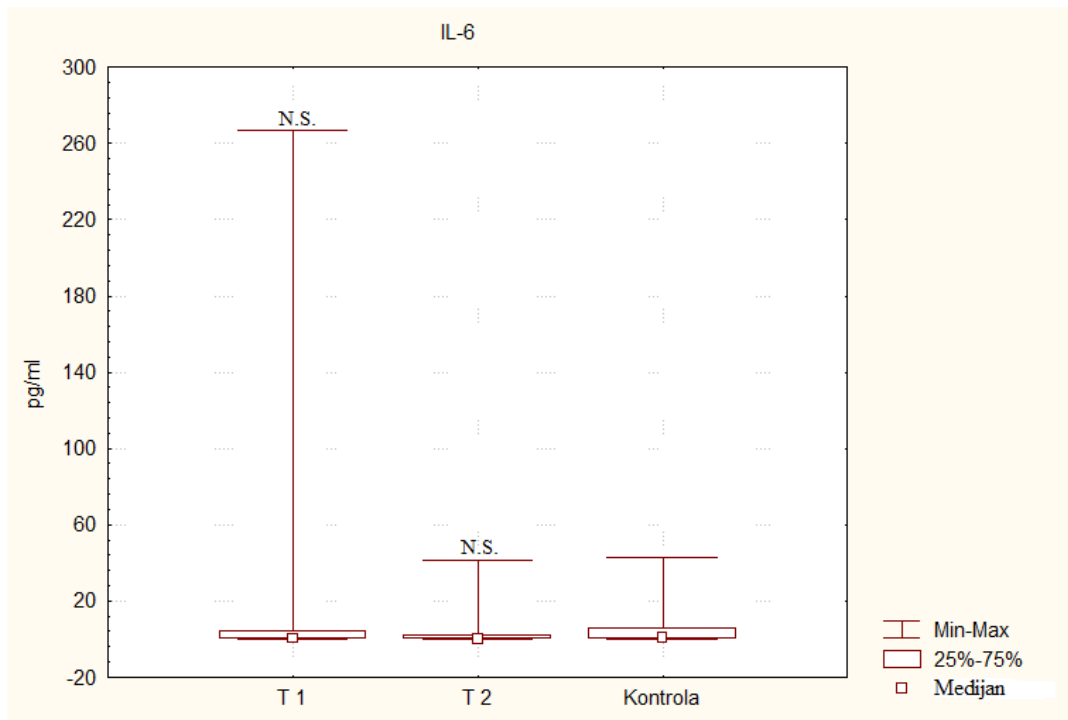
Slika 28. Koncentracija IL-10 u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,94$ ).



Slika 29. Koncentracija IL-9 u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,06$ ).

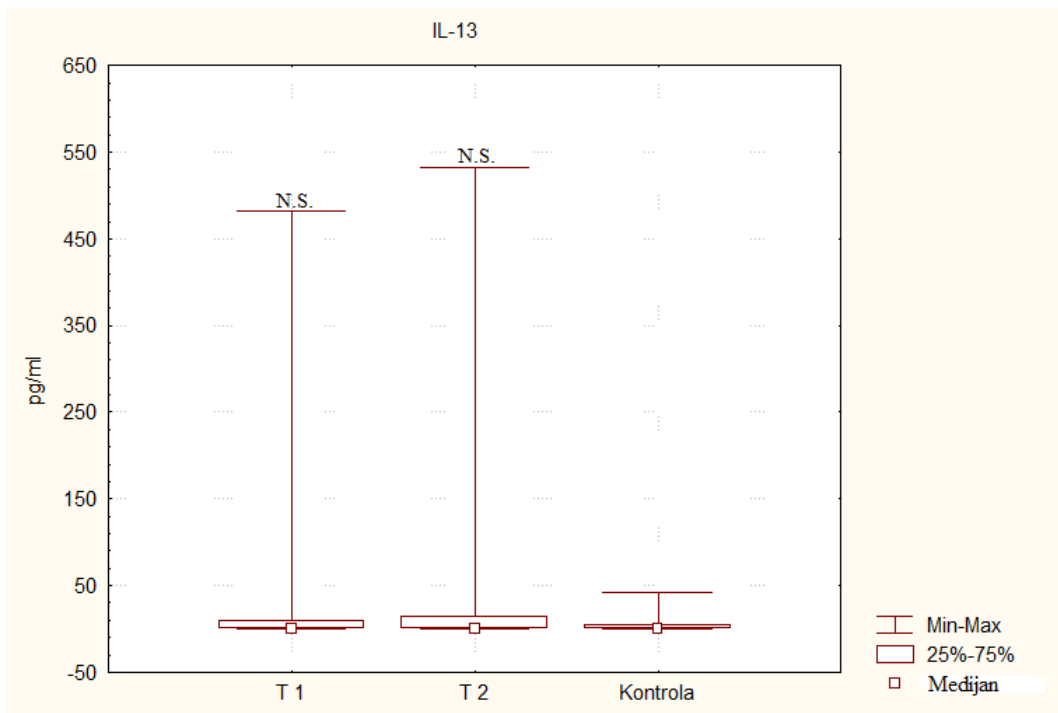


Slika 30. Koncentracija IL-22 u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,41$ ).

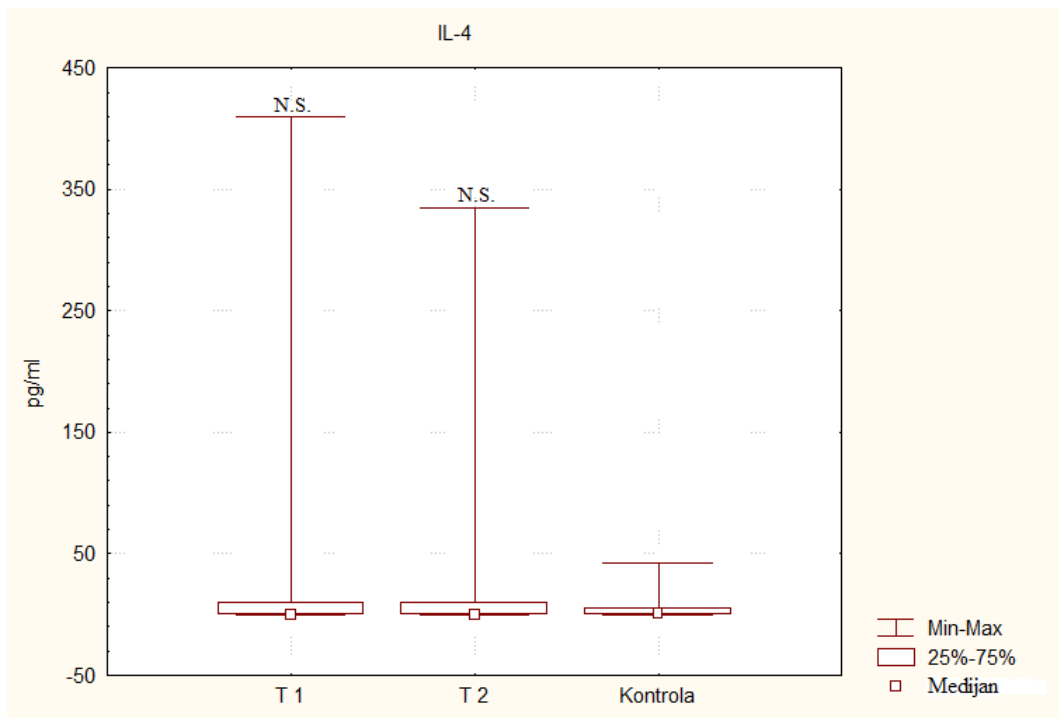


Slika 31. Koncentracija IL-6 u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P=0,54$ ).

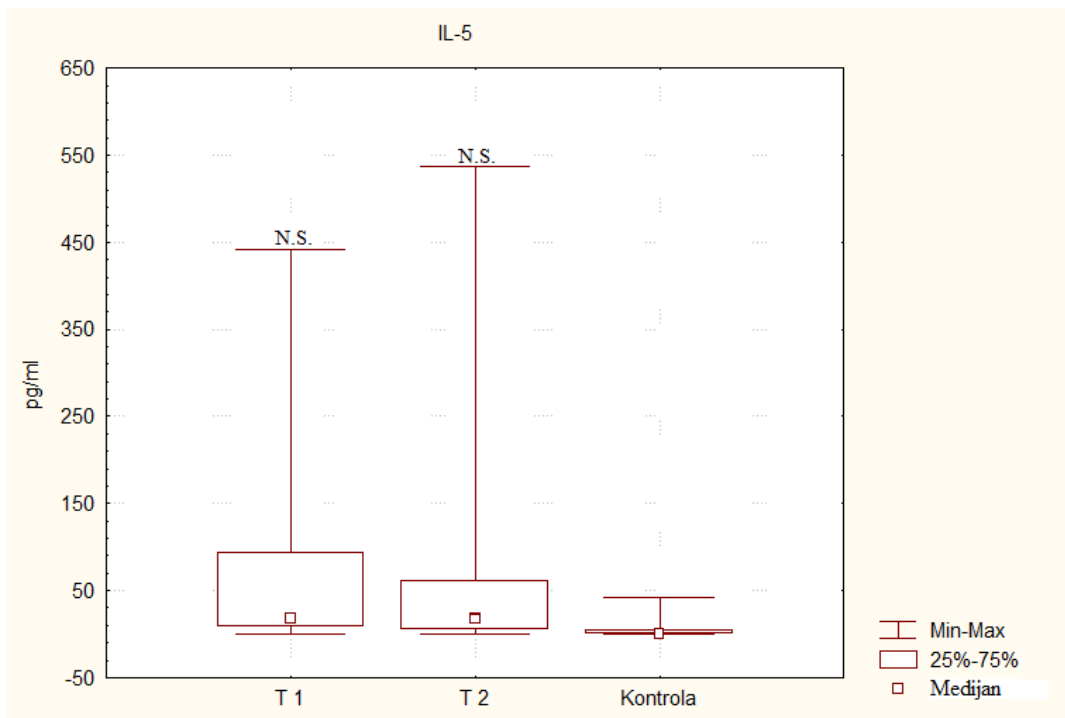




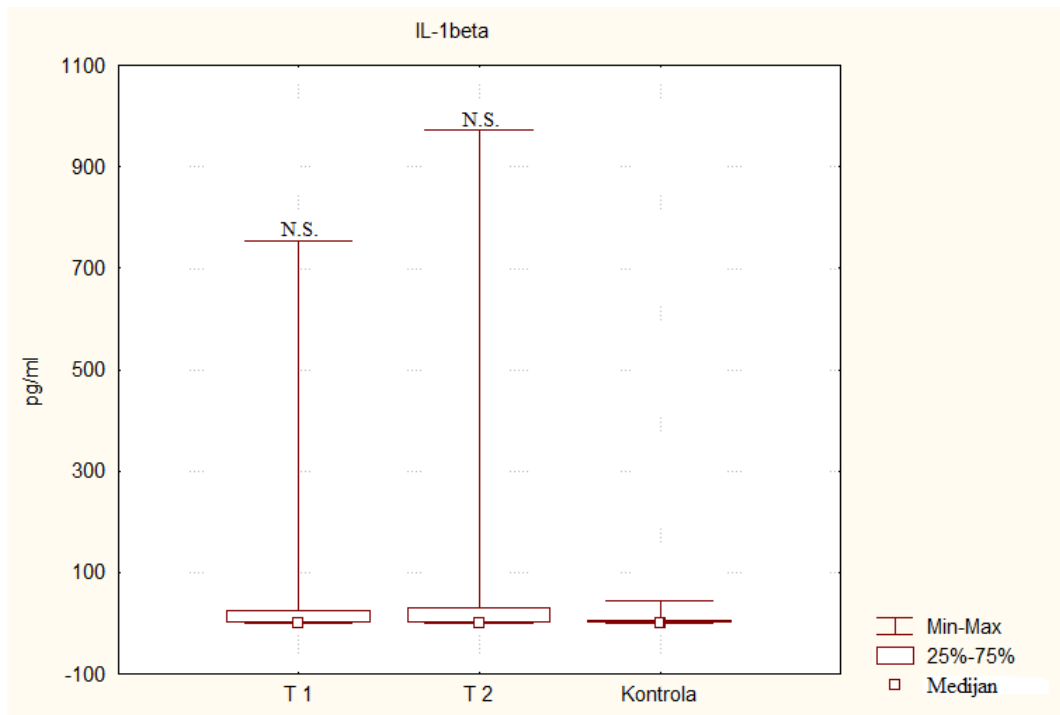
Slika 32. Koncentracija IL-13 u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,38$ ).



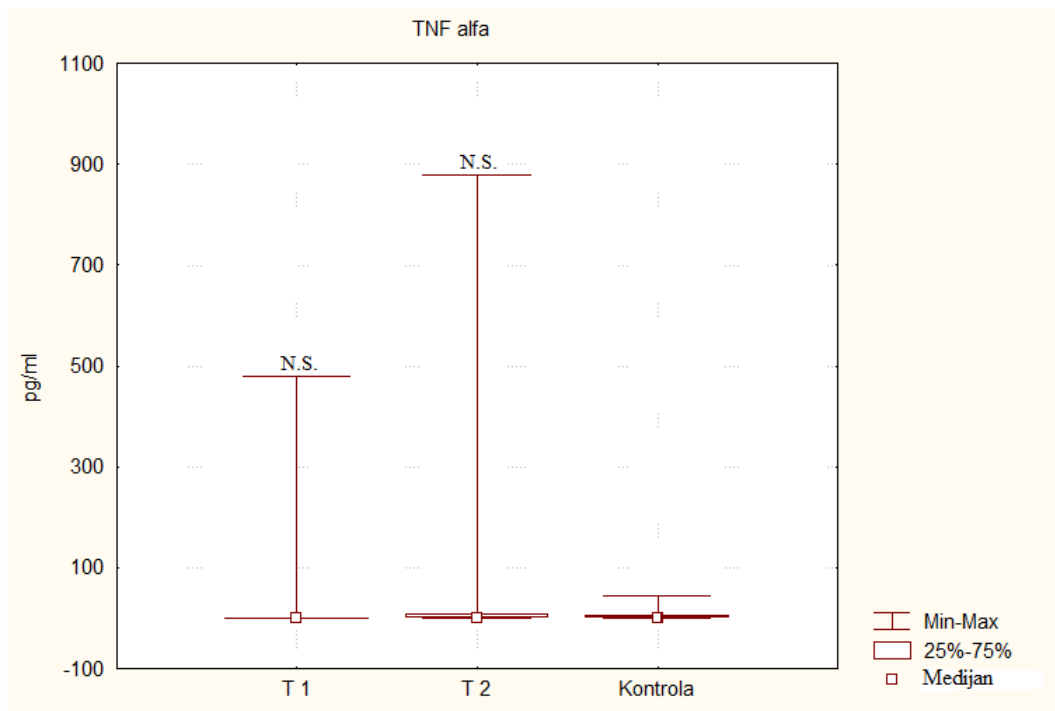
Slika 33. Koncentracija IL-4 u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,60$ ).



Slika 34. Koncentracija IL-5 u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,89$ ).



Slika 35. Koncentracija IL-1 $\beta$  u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,47$ ).



Slika 36. Koncentracija TNF- $\alpha$  u plazmi HIV-om zaraženih osoba u prvoj točki prije započinjanja terapije (T1) i drugoj točki pri nemjerljivoj viremiji u periodu duljem od 2 godine (T2) u odnosu na kontrolnu skupinu koju čine 22 HIV-negativne osobe (Fisher`s exact test, N.S.= nije statistički značajno). Razlika nije statistički značajna između grupa T1 i T2 (Wilcoxon signed rank test,  $P = 0,44$ ).

#### 4.2.1. Ekspresija aktivacijskih biljega HLA-DR i CD38 na limfocitima T u infekciji HIV-om-1 tijekom dugotrajne supresije virusne replikacije

Protočnom citometrijom pune krvi HIV-om zaraženih ispitanika odredila sam postotak limfocita T koji ekspiriraju aktivacijski biljeg HLA-DR i postotak CD8+ limfocita T s ekspresijom biljega CD38 u dvije vremenske točke, prije započinjanja liječenja antiretrovirusnim lijekovima i nakon minimalno 2 godine kontinuirane virusne supresije. Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 16 pokazali su da u infekciji HIV-om-1 dolazi do smanjenja ekspresije oba aktivacijska biljega HLA-DR i CD38 tijekom dugotrajne supresije virusne replikacije (Wilcoxon Two-Sample test,  $P < 0,001$ ;  $P < 0,001$ ).

Tablica 16. Postotci CD3+HLA-DR+ i CD8+CD38+ limfocita T u HIV-om zaraženih ispitanika prije antiretrovirusne terapije i tijekom supresije virusne replikacije u periodu dužem od 2 godine

Uzorak	Broj ispitanika	Limfocitna subpopulacija	Medijan	Donja kvartila	Gornja kvartila
Prije terapije	80	CD3+HLA-DR+	10,0	6,7	16,9
	80	CD8+CD38+	19,0	17,0	26,0
Dugotrajna supresija virusne replikacije	80	CD3+HLA-DR+	2,9	1,9	4,5
	9	CD8+CD38+	5,0	4,0	8,0

Legenda: **CD3+HLA-DR+** (limfociti T koji ekspimiraju aktivacijski biljeg HLA-DR), **CD8+CD38+** (citotoksični limfociti koji ekspimiraju aktivacijski biljeg CD38)

## 5. RASPRAVA

Citokini imaju važnu ulogu u održavanju homeostaze imunskog sustava. Posreduju u međustaničnoj komunikaciji, te svojim djelovanjem mogu aktivirati i regulirati imunski odgovor. Zbog uloge citokina u patogenezi mnogih bolesti uključujući i infekciju HIV-om-1 poznavanje njihovih ekspresijskih profila u pojedinoj fazi infekcije od iznimne je važnosti. Događaji u ranoj fazi infekcije HIV-om-1 utječu kasnije na brzinu napredovanja bolesti, a upravo u akutnoj fazi infekcije HIV-om-1 porast viremije prati i porast koncentracija citokina.

U ovom istraživanju po prvi puta je napravljena opsežna analiza ekspresije 84 gena koji kodiraju sintezu citokina iz porodica interleukina, interferona, čimbenika rasta, porodice TGF- $\beta$  i TNF- $\alpha$  u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1. Dobiveni rezultati ukazuju na pojačanu transkripcijsku aktivnost 13 citokinskih gena, dok je smanjenja ekspresija jednog gena u kroničnoj u odnosu na akutnu fazu infekcije HIV-om-1. Na proteinskoj razini i u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1 dokazala sam porast koncentracija citokina u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Unutar skupine HIV-om zaraženih ispitanika između faza infekcije HIV-om-1 koncentracije citokina nisu se značajno mijenjale, osim u slučaju smanjenja ekspresije IL-9 između akutne i kronične faze HIV-infekcije. Dugotrajna supresija virusne replikacije nije utjecala na citokinske profile između uzoraka prikupljenih prije početka antiretrovirusne terapije i nakon minimalno dvije godine kontinuirane virusne supresije. Od 13 ispitivanih citokina samo je koncentracija IL-17A snižena u HIV-om zaraženih osoba u odnosu na kontrolnu skupinu. Dostupni su brojni literaturni podaci o citokinskoj imunosti u infekciji HIV-om-1, no većina istraživačkih skupina je analizirala ekspresiju citokina na proteinskoj razini. Također, istraživanja su uključivala uglavnom ekspresiju Th1, Th2 i Th17 citokina, dok su ostale citokinske populacije većinom zanemarene. Uspoređivanje rezultata dobivenih u ovom istraživanju s dostupnim literaturnim podacima je otežano i zbog različitih metodologija koje su korištene u analizi citokinske imunosti u infekciji HIV-om-1.

Williams i suradnici su u svom istraživanju iz 2013. godine koristili istu metodu analize citokina koja je korištena i u ovom istraživanju. Metoda uključuje istovremenu analizu više citokina uz pomoć kuglica s vezanim specifičnim antitijelom za pojedini citokin. Williams i suradnici su analizirali ekspresiju sedam Th1, Th2 i Th17 citokina u serumu 25 HIV-om zaraženih ispitanika i to IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Ispitanici u vrijeme

prikupljanja uzoraka krvi nisu bili na antiretrovirusnoj terapiji. Rezultati istraživanja pokazali su povećane koncentracije IL-6 i IL-10 u HIV-om zaraženih ispitanika i odnosu na kontrolnu skupinu. Ekspresijski profili ostalih ispitivanih citokina nisu se značajno razlikovali između dviju skupina. U HIV-om zaraženih ispitanika koncentracija IL-17A bila je nešto niža od onih određenih u kontrolnoj skupini, no razlika nije bila statistički značajna. Ako ove rezultate usporedimo s rezultatima našeg istraživanja i to u HIV-om zaraženih ispitanika prije započinjanja antiretrovirusne terapije kao što je bila i ispitivana skupina u istraživanju Williams i suradnika možemo uočiti smanjenje koncentracija IL-17A u odnosu na kontrolnu skupinu (Williams i sur., 2013). U našem istraživanju razlika koncentracija ovog citokina između HIV-om zaraženih ispitanika i kontrole statistički je značajna ( $p=0,028$ ). Promjena ekspresija IL-6 i IL-10 između HIV-om zaraženih ispitanika koji nisu na antiretrovirusnoj terapiji i kontrolne skupine dviju ispitivanih skupina nije bila statistički značajna.

Ovo smanjenje koncentracija IL-17A u infekciji s HIV-1 u skladu je s podacima o iscrpljivanju Th17 stanica tijekom infekcije HIV-om-1. El Hed i suradnici su 2010. godine istraživali učinak HIV-a na populaciju Th17 stanica. Ispitanici su bili HIV-om zaražene osobe podijeljene u skupine ovisno o njihovom terapijskom statusu. Dvadeset šest ispitanika od ukupno trideset devet koji su uzimali antiretrovirusnu terapiju imali su viremiju nižu od 50 kopija HIV-1 RNA/mL krvi. Iz periferne krvi izolirani su CD4+ limfociti T memorijskog fenotipa koji ekspimiraju CD45RO i CCR6 ili CCR5, te je metodom protočne citometrije određen postotak stanica koje stvaraju IL-17. U skupini HIV-om zaraženih osoba koje nisu uzimale antiretrovirusnu terapiju udio limfocita T koji luče IL-17 nije se značajno razlikovao od rezultata u kontrolnoj skupini. Za razliku od njih, u skupini HIV-om zaraženih ispitanika na terapiji neovisno o tome imaju li mjerljivu viremiju ili ne, primjećen je značajno smanjenje populacije limfocita T koji stvaraju IL-17 u odnosu na kontrolnu skupinu (El Hed i sur., 2010). U našem istraživanju HIV-om zaraženi ispitanici koji su bili na antiretrovirusnoj terapiji, te su imali nemjerljivu viremiju dulju od dvije godine nisu pokazali značajnije smanjenje ekspresije IL-17 u odnosu na kontrolnu skupinu. Promatramo li koncentracije IL-17 u HIV-om zaraženih ispitanika prije i tijekom više od dvije godine kontinuirane antiretrovirusne terapije primjećuje se da unatoč nemjerljivoj viremiji u ispitanika na terapiji ne dolazi do povećanja ekspresije IL-17. Odnosno, možemo zaključiti da ne dolazi do obnove populacije Th17 stanica, glavnog izvora IL-17 unatoč višegodišnjoj supresiji virusne replikacije. Ovo saznanje u skladu je s rezultatima istraživačke skupine Alvarez i suradnika iz 2012. godine. Iz periferne krvi izolirali su mononuklearne stanice, te su uspostavili kulturu



CD4+ limfocita T koje su zarazili HIV-om-1. Četiri dana od infekcije stanice su isprane i obrađene inhibitorom reverzne transkriptaze. Postotak IL-17A+ stanica nije dosegao razinu one u nezaražene kontrole. Broj Th17 stanica u kulturi koja je obrađena lijekom nije se značajnije razlikovao od njihovog broja u virusom-zaražene neobrađene kulture. Ovaj podatak pokazuje da primjena antiretrovirusne terapije nakon uspostave infekcije HIV-om-1 nije učinkovita u obnovi Th17 odgovora (Alvarez i sur., 2012). Ovakav tip *in vitro* istraživanja ne daje realnu sliku onog što se događa tijekom infekcije HIV-om-1 *in vivo*. Treba uzeti u obzir utjecaj međureakcije virusa i domaćina. Stanice u kulturi su izdvojena populacija, nedostaje međustanična komunikacija s ostalim tipovima stanica, nisu okružene istim okolišnim čimbenicima kao stanice u organizmu. Osim toga, Alvarez i suradnici su kulturu stanica obradili inhibitorom reverne transkriptaze tako da su stanice bile direktno u doticaju s lijekom, dok se u organizmu lijek metabolizira i ne djeluje u istoj koncentraciji na sve stanice.

Utjecajem infekcije HIV-om-1 na populaciju Th17 stanica bavila se i istraživačka skupina Ndhlovu i suradnika. U istraživanje su uključena HIV-om zaražena djeca od kojih su neka imala mjerljivu viremiju u plazmi, a u ostalih je dokazana supresija virusne replikacije. Iz periferne krvi izolirane su mononuklearne stanice koje su zatim stimulirane s anti-CD3 i anti-CD28 monoklonskim protutijelima na proizvodnju IL-17. Prisutnost IL-17 određena je primjenom ELISpot metode. Dobiveni rezultati pokazali su da je u HIV-om zaražene djece s mjerljivom viremijom došlo do smanjenja broja Th17 stanica u usporedbi s kontrolom, dok je u ispitanika sa supresijom virusne replikacije njihov broj bio veći (Ndhlovu i sur., 2008). Ovi rezultati Ndhlovu i suradnika u suprotnosti su s rezultatima našeg istraživanja jer smo mi pokazali da unatoč virusnoj supresiji ne dolazi do obnove populacije Th17 stanica. Mogući uzrok ovom neslaganju rezultata našeg istraživanja i istraživanja Ndhlovu i suradnika je drugačija metodologija. Oni su stanice stimulirali monoklonskim protutijelima na proizvodnju IL-17 dok smo u našem istraživanju odredili koncentraciju citokina u plazmi što daje realniju sliku onoga što se događa s citokinskim populacijama tijekom infekcije HIV-om-1. HIV-om zaraženi ispitanici u našem istraživanju bili su na kontinuiranoj antiretrovirusnoj terapiji, dok Ndhlovu i suradnici u svom znanstvenom radu ne iznose podatak o terapiji. Također, potrebno je uzeti u obzir i činjenicu da je naše istraživanje provedeno samo na odraslim osobama, dok su Ndhlovu i suradnici istraživali Th17 stanice u HIV-om zaraženoj djeci. Imunosni sustav djeteta se još razvija i postoje razlike u zastupljenosti limfocitnih populacija s obzirom na dob pa i taj podatak može utjecati na dobivene rezultate istraživanja.

Uspoređujući citokinske profile HIV-om zaraženih osoba u akutnoj u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika vidljiv je porast koncentracija citokina IL-10, IL-4 i TNF- $\alpha$ . Rezultate slične ovom istraživanju objavila je 2006. godine istraživačka skupina Norris i suradnika. Kako bi istražili povezanost sekrecije citokina i replikacije HIV-1 u najranijoj točki HIV-infekcije ispitanici su bili donori plazme kod kojih je u jednom trenutku otkrivena prisutnost HIV-1 RNA u plazmi. Viremija i koncentracije pet izabranih citokina koji uključuju IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 i IL-13 uspoređeni su s istim parametrima u skupini ispitanika kojima je otkrivena simptomatska primarna infekcija HIV-om-1, te u HIV-1 seronegativne kontrole. Koncentracija citokina iz prethodno smrznutih plazmi određena je metodom ELISA. U akutnoj infekciji HIV-om-1 došlo je do naglog porasta koncentracija IL-10, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . U fazi infekcije HIV-om-1 prije serokonverzije sva tri citokina pokazala su korelaciju s viremijom (Norris i sur., 2006). Istovremeno naši rezultati ne upućuju na korelaciju koncentracija IL-10 i TNF- $\alpha$  s viremijom. Usporedimo li rezultate u akutnoj infekciji HIV-om-1s onima dobivenim 6 mjeseci odnosno godinu dana poslije vidimo da je koncentracija IL-10 i TNF- $\alpha$  konstantna, a u istom periodu medijan viremije je dramatično smanjen sa 224 500 kopija HIV-1 RNA/mL plazme u akutnoj infekciji HIV-om-1 na svega 31 kopiju u kroničnoj infekciji. Mogući uzrok različitost podataka našeg istraživanja i onog Norris i suradnika leži u činjenici da su njihovi ispitanici bili donori plazme kod kojih se provodi testiranje na HIV prilikom svakog dolaska, te su ih tako mogli „uhvatiti“ u najranijoj fazi infekcije HIV-om-1 prije pojave simptoma bolesti. Budući da su plazme naših HIV-om zaraženih ispitanika prikupljane u akutnoj fazi infekcije, ali ipak nešto kasnije u infekciji od Norris i suradnika moguće je da upravo u tom kratkom periodu postoji korelacija između koncentracija IL-10 i TNF- $\alpha$ , te viremije koju smo mi „propustili“ uočiti.

Stacey i suradnici su u znanstvenom radu objavljenom 2009. godine prikazali promijene citokinskih profila u „eclipse“ fazi akutne infekcije HIV-om-1 i fazi naglog porasta viremije. Proveli su analizu kinetike ekspresije 30 citokina i kemokina u plazmi HIV-om zaraženih ispitanika prikupljajući uzorke svaka 2 do 5 dana. Koncentracije citokina/kemokina izmjerili su korištenjem Luminex tehnologije čiji princip rada je vrlo sličan onom korištenom u našem istraživanju. Citokini kod kojih je najranije uočen porast koncentracija bili su IFN- $\alpha$ , IL-15, TNF- $\alpha$ , IP-10 i MCP-1. Zatim je slijedio porast IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 i IFN- $\gamma$ , dok je porast IL-4, IL-5, IL-12 i IL-22 uslijedio nešto kasnije. Ovim istraživanjem Stacey i suradnici su ukazali na postojanje tzv. citokinske oluje u akutnoj infekciji HIV-om-1, odnosno da u vremenski kratkom periodu dolazi do porasta koncentracija mnogih citokina (Stacey i sur.,

2009). S druge strane, u našem istraživanju od 13 ispitivanih citokina samo u tri je došlo do porasta koncentracija u akutnoj infekciji HIV-om-1 u odnosu na kontrolnu skupinu. Budući da su uzorci plazme HIV-om zaraženih ispitanika prikupljeni u akutnoj HIV-infekciji, ali ne tako rano kao u istraživanju Stacey i suradnika, a porast citokina dolazi u valovima, odnosno koncentracije nekih citokina tek prolazno porastu i ne zadržavaju povišenu razinu dulji period moguće je da je u trenutku uzimanja uzoraka već došlo do njihovog pada, te stoga nismo uočili mogući porast koncentracija još nekog od njih.

Istraživanje Stylianou i suradnika iz 1999. godine pokazalo je da napredovanjem infekcije HIV-om-1 prema AIDS-u dolazi do porasta koncentracija IL-10. Osim određivanja koncentracija IL-10 istražili su i promjenu koncentracija TNF- $\alpha$  tijekom napredovanja infekcije HIV-om-1. Koncentracije ova dva citokina mjerene su u serumu HIV-om zaraženih osoba u različitim fazama infekcija HIV-om-1. Svi ispitanici, neovisno o fazi infekcije imali su povišene koncentracije IL-10, s time da je najveći porast zabilježen u onih kod kojih je bolest najviše uznapredovala i kod kojih je već dokazana pojava oportunističkih infekcija, naročito s *Mycobacterium avium*. Budući IL-10 utječe na smanjenje lučenja TNF- $\alpha$ , a istovremeno TNF- $\alpha$  potiče oslobađanje IL-10 iz različitih stanica smatra se da je njihova ravnoteža od značajne važnosti za patogenezu infekcije HIV-om-1 (van der Poll i sur., 1994; Fauci, 1996). U HIV-om zaraženim osobama u istraživanju Stylianou i suradnika u svim fazama HIV-infekcije zabilježen je porast koncentracija TNF- $\alpha$ , također u skupini ispitanika u kojih je bolest najviše uznapredovala. Primjenom antiretrovirusne terapije došlo je do smanjenja koncentracija oba citokina, ali ne na razine zabilježene u kontrolnoj HIV-negativnoj skupini ispitanika (Stylianou i sur., 1998). U našem istraživanju također smo dokazali povišene koncentracije i IL-10 i TNF- $\alpha$  u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1, no njihove koncentracije nisu se mijenjale između dvije faze infekcije kao u istraživanju Stylianou i suradnika. Razlog leži u tome što su Stylianou i suradnici pratili HIV-om zaražene osobe kod kojih je došlo do porasta viremije, odnosno napredovanja infekcije. U slučaju naših HIV-om zaraženih osoba došlo je do smanjenja viremije između akutne i kronične infekcije HIV-om-1 pa njen utjecaj na porast IL-10 i TNF- $\alpha$  nismo mogli uočiti.

Krajem 80-tih i početkom 90-tih godina prošlog stoljeća intenzivno se proučavao utjecaj TNF- $\alpha$  na replikaciju HIV-a. Duh i suradnici su 1989. godine u svom istraživanju provedenom *in vitro* pokazali da TNF- $\alpha$  uzrokuje transkripcijsku aktivaciju ugrađenog HIV provirusa tako što se stanični transkripcijski faktori vežu na NF- $\kappa$ B slijed koja se nalazi unutar

LTR-ova virusnog genoma (Duh i sur., 1989). Iste je godine istraživačka skupina Folks i suradnika došla do istog zaključka da TNF- $\alpha$  potiče ekspresiju HIV-a u kronično zaraženim kulturama limfocita T (Folks i sur., 1989). Iako se iz spomenutih istraživanja uočava aktivacijska uloga TNF- $\alpha$  u infekciji HIV-om-1, važno je napomenuti da su ona provedena na latentno zaraženim stanicama i nisu istražili utjecaj TNF- $\alpha$  na svježe zaražene stanice. S druge strane, istraživačka skupina Lane i suradnika je 1999. godine iznijela dokaze o supresivnoj ulozi TNF- $\alpha$  na HIV-1 replikaciju u kulturi ljudskih mononuklearnih fagocita. Pokazali su da TNF- $\alpha$  povećavajući ekspresiju CCR5 liganda RANTES-a koji je jak supresor ulaska virusa u stanicu, time i virusne replikacije, te smanjujući površinsku ekspresiju kemokinskog receptora CCR5 uzrokuje smanjenje virusne replikacije (Lane i sur., 1999). Rezultate istraživanja Lane i suradnika možemo usporediti s našima jer smo u plazmi HIV-om zaraženih osoba dokazali povišene koncentracije TNF- $\alpha$  u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1 u odnosu na kontrolu. Istovremeno je došlo do smanjenja viremije što može upućivati na supresivnu ulogu TNF- $\alpha$ , učinak koji su uočili i Lane i suradnici. IL-10 čije povišene koncentracije smo dokazali također u akutnoj i kroničnoj infekciji HIV-om-1 u odnosu na zdrave kontrole glavni je imunomodulatorni citokin. Primarno je protuupalni citokin i uzrokuje smanjenje ekspresije molekula MHC klase II na monocitima i makrofagima, te ograničava proizvodnju proupalnih citokina, uključujući IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ . Istovremeno IL-10 potiče proliferaciju limfocita B i njihovo sazrijevanje u plazma stanice (Kwon i sur., 2010).

Istraživačka skupina Clerici i suradnika testirala je hipotezu da IL-10 sudjeluje u imunskoj disfunkciji povezanoj s HIV-om. Pokazali su da je njegova ekspresija povišena u mononuklearnim stanicama periferne krvi HIV-om zaraženih osoba nakon stimulacije s mitogenom u odnosu na HIV-negativnu kontrolu. Povišenje koncentracija IL-10 povezano je i s napredovanjem infekcije HIV-om-1 i smanjenjem ekspresije IL-2 (Clerici i sur., 1994; Clerici i sur., 1996). Polimorfizam gena koji kodira za IL-10 utječe na napredovanje infekcije HIV-om-1. Shin i suradnici su pokazali da osobe kod kojih je u IL-10 promotoru na poziciji -592 došlo do transverzije citozina u adenin imaju niže koncentracije tog citokina, imaju veći rizik od zaraze HIV-om, te jednom kad se zaraze infekcija brže napreduje prema AIDS-u u odnosu na osobe koje su C homozigoti za taj alel. Ukoliko je u promotoru gena za IL-10 na poziciji -1082 došlo do tranzicije adenina u gvanin osobe imaju višu koncentraciju tog citokina, u slučaju zaraze s HIV-1 broj CD4+ limfocita T polakše se smanjuje i infekcija HIV-om-1 sporije napreduje. Ovi podaci ukazuju da IL-10 ima zaštitnu ulogu u infekciji HIV-om-1

smanjujući brzinu napredovanja bolesti (Edwards-Smith i sur., 1999; Shin i sur., 2000; Erikstrup i sur., 2007).

Clerici i Shearer su 1993. godine iznijeli hipotezu da je promjena iz Th1 u Th2 citokinski profil ključna u imunopatogenezi infekcije HIV-om-1. Glavni citokini koje luče Th1 stanice su IFN- $\gamma$  i IL-2, te potiču stanicama posredovan efektorski odgovor. Th2 stanice oslobađaju IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10, citokine koji utječu na razvoj limfocita B i potiču humoralnu imunost. Clerici i Shearer su svoje istraživanje proveli *in vitro* na mononuklearnim stanicama periferne krvi HIV-om zaraženih osoba, te su pratili koncentracije IL-2 i IL-4. U svom su znanstvenom članku iznijeli hipotezu da je Th1 odgovor imunoprotektivan, može spriječiti infekciju HIV-om-1 i napredovanje prema AIDS-u. Osim toga, smatraju da bilo koji imunostimulans koji uzrokuje promjenu Th1 u Th2 citokinski profil služi kao kofaktor za razvoj AIDS-a (Clerici i Shearer, 1993). Do sličnih saznanja došli su i Sindhu i suradnici. Oni su u svoje istraživanje uključili 60 HIV-om zaraženih osoba, te su ih podijelili u 2 grupe ovisno o tome imaju li ili ne neku oportunističku infekciju. Svi pacijenti su primali antiretrovirusnu terapiju. Koncentracije citokina u plazmi odredili su metodom ELISA. Zanimala ih je ekspresija Th1 i Th2 citokina i to IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 i IL-10. Razina Th1 citokina u HIV-om zaraženih osoba bila je niža, dok je koncentracija Th2 citokina u serumu bila povišena u odnosu na HIV-negativnu kontrolnu skupinu ispitanika. Osim na proteinskoj razini, napravili su i analizu ekspresije gena koji kodiraju za Th1, odnosno Th2 citokine. Dobiveni rezultati mRNA ekspresije odgovarali su rezultatima dobivenim analizom citokina u serumu (Sindhu i sur., 2006). Do suprotnih podataka došla je istraživačka skupina Fakoya i suradnika. Oni su potvrdili da infekcija HIV-om-1 mijenja i Th1 i Th2 citokinske profile, no ne uzrokuje njihovu polarizaciju (Fakoya i sur., 1997).

U našem istraživanju u akutnoj infekciji HIV-om-1 dokazali smo povišene koncentracije IL-4, IL-10 i TNF- $\alpha$ . Analiza uzoraka plazme HIV-om zaraženih ispitanika koji su prikupljeni 6 mjeseci od uzorka iz akutne infekcije HIV-om-1 pokazala je i dalje povišene koncentracije IL-10 i TNF- $\alpha$ , te povišene koncentracije IL-22. I u uzorcima prikupljenim godinu dana od uzoraka iz akutne infekcije HIV-om-1 zadržala se povišena razina IL-10, TNF- $\alpha$  i IL-22, no došlo je do porasta koncentracija IL-2, IL-6 i IL-13. Iz ovih podataka možemo vidjeti da Th2 citokini dominiraju još od akutne faze infekcije HIV-om-1, odnosno iz naših podataka se vidi da nije došlo do prijelaza iz Th1 u Th2 citokinski profil. Zanimljivo je da je u kroničnoj infekciji porasla koncentracija IL-22. O ulozi ovog citokina u infekciji HIV-om-1 malo se

zna. Smatra se da je IL-22 važana za održavanje cjelovitosti crijevne mukoze, te da u kroničnoj infekciji HIV-om-1 dolazi do iscrpljivanja Th22 stanica koje luče ovaj citokin (Kim i sur., 2012). Istraživanje skupine Arias i suradnika pokazalo je moguću povezanost između ekspresije IL-10 i IL-22. U *in vitro* istraživanju pokazali su da su povišene koncentracije IL-10, IL-22 i reaktivnog proteina C u indijskoj kohorti HIV-om zaraženih ispitanika povezane s niskom replikacijom HIV-1 subtipa C (Arias i sur., 2010). Jako se malo zna o interakciji IL-10 i IL-22, no istraživanje skupine Nagalakshmi i suradnika pokazalo je da IL-22 inducira fosforilaciju STAT1 i STAT3 u staničnoj liniji epitela crijeva, te da inducira ekspresiju IL-10 mRNA i proizvodnju proteina (Nagalakshmi i sur., 2004).

U našem istraživanju u kroničnoj infekciji HIV-om-1 došlo je do porasta IL-13. Njegovu ulogu u infekciji HIV-om-1 istražili su Bailer i suradnici koji su mjerili koncentracije IL-13 i IFN- $\gamma$  u uznapredovaloj infekciji. Iz krvi HIV-om zaraženih osoba i HIV-negativne kontrole izolirali su mononuklearne stanice koje su stimulirali monoklonskim protutijelima anti-CD3/anti-CD28. Rezultati su pokazali smanjenje koncentracija IL-13 i IFN- $\gamma$  u HIV-om zaraženih ispitanika s apsolutnim brojem CD4 manjim od 500 stanica po mililitru odnosno s uznapredovalom HIV-infekcijom. Sekrecija oba citokina pokazuje je vrlo stabilna u nedostatku kliničkih promjena u napredovanju bolesti. No, u pacijenata koji započinju antiretrovirusnu terapiju dolazi do promjene u sekreciji IL-13 i IFN- $\gamma$ . U HIV-om zaraženih ispitanika padom viremije, došlo je do povećanja koncentracija IL-13 i IFN- $\gamma$  (Bailer i sur., 1999). Ovaj rezultat može se usporediti s onim dobivenim u našem istraživanju. Povišena koncentracija IL-13 u odnosu na kontrolnu skupinu otkrivena je u uzorcima plazme HIV-om zaraženih ispitanika prikupljenih godinu dana od akutne infekcije HIV-om-1. Vidljiva je negativna korelacija razine IL-13 i viremije što je u skladu s rezultatima Bailer i suradnika.

IL-6 ima široki spektar djelovanja od stimulacije limfocita B, diferencijacije monocita i indukcije stanica koje stvaraju IL-4. Lučenje IL-6 je povišeno u serumu HIV-om zaraženih osoba, naročito u kasnijim fazama infekcije HIV-om-1 u usporedbi s HIV-negativnom kontrolnom skupinom. Stimulacija s mitogenom, odnosno lipopolisaharidom, CD4+ limfocita T i monocita izoliranih iz HIV-om zaraženih osoba uzrokuje povećano lučenje IL-6 (Cayota i sur., 1992; Baqui i sur., 2000). U našem istraživanju do povišenja koncentracija IL-6 u HIV-om zaraženih ispitanika došlo je u kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1 što se slaže s literaturnim podacima.

Jedini citokin kod kojeg je došlo do smanjenja koncentracija između akutne i kronične faze HIV-infekcije je IL-9. Literaturni podaci o utjecaju ovog citokina na HIV-infekciju su vrlo oskudni. Jedini znanstveni rad u kojem je istraživana uloga IL-9 u HIV-om zaraženih osoba je onaj istraživačke skupine Guzman-Fulgencio i suradnika iz 2011. godine, no oni su određivali citokinski profil u ispitanika koinficiranih virusom hepatitisa C (HCV) kako bi vidjeli što se događa s ekspresijom citokina pod utjecajem anti-HCV terapije. Pokazali su da ispitanici s povišenim koncentracijama IL-9 i IL-6 imaju manju vjerojatnost postizanja SVR-a (Guzman-Fulgencio i sur., 2011).

Uspoređujući ekspresiju gena koji kodiraju sintezu citokina između akutne i kronične faze infekcije HIV-om-1 vidljivo je da je u kroničnoj infekciji pojačana transkripcija 13 gena, te je snižena ekspresija samo jednog. Pojačana je ekspresija gena koji kodiraju sintezu interleukina, čimbenika rasta, pojedinih članova superporodice TNF. Ovi rezultati pokazuju da u infekciji HIV-om-1 dolazi do značajnih promjena u genskoj ekspresiji između dviju faza infekcije. Zanimljivo je da pojačano eksprimirani geni kodiraju sintezu drugih citokina od onih čiju smo povećanu koncentraciju otkrili na proteinskoj razini. Razlog može biti u samim uzorcima jer smo za analizu genske ekspresije koristili svježe prikupljene pune krvi, dok smo za određivanje koncentracija koristili plazme koje su dulje vrijeme bile pohranjene na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Kronična aktivacija imunskog sustava smatra se ključnim čimbenikom u iscrpljivanju  $\text{CD4}^+$  limfocita T i napredovanju infekcije HIV-om-1 prema AIDS-u. Analiza uzoraka krvi HIV-om zaraženih osoba u kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1 pokazala je povećanu ekspresiju aktivacijskih biljega CD38 i HLA-DR na  $\text{CD4}^+$  i  $\text{CD8}^+$  limfocitima T. Različita istraživanja pokazala su prognostičku važnost ova dva biljega u brzini napredovanja infekcije HIV-om-1. Ekspresija CD38 i HLA-DR na limfocitima T pokazuje bolju korelaciju s napredovanjem infekcije u odnosu na viremiju (Giorgi i sur., 1999; Giorgi i sur., 2002; Hazenberg i sur., 2003; Deeks i sur., 2004; Wilson i sur., 2004; Appay i Sauce, 2008).

U našem istraživanju došlo je do smanjenja ekspresije aktivacijskih biljega CD38 na  $\text{CD8}^+$  limfocitima T i HLA-DR na limfocitima T između akutne i kronične faze, kao i između uzoraka HIV-om zaraženih osoba prije započinjanja antiretrovirusne terapije i nakon minimalno dvije godine kontinuirane supresije virusne replikacije. To se može objasniti činjenicom da je u tom periodu došlo do porasta apsolutnog broja  $\text{CD4}^+$  limfocita T i smanjenja viremije, odnosno u HIV-om zaraženih ispitanika uključenih u istraživanje nije došlo do napredovanja infekcije. Ovo sveobuhvatno istraživanje daje nova saznanja o

dogadajima u infekciji HIV-om-1 na genskoj i proteinskoj razini. Pokazali smo da dolazi do promjena citokinskih profila napredovanjem infekcije iz akutne u kroničnu fazu. Kako bi još bolje istražili utjecaj citokina na infekciju HIV-om-1 bilo bi zanimljivo u neko slijedeće istraživanje uključiti i druge kategorije ispitanika, od elitnih kontrolora, preko HIV-om zaraženih ispitanika u kojih je došlo do reaktivacije nekih drugih latentnih virusa (npr. virusi iz porodice *Herpesviridae*), do HIV-om zaraženih osoba s uznapredovalim stadijem AIDS-a.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Infekcija HIV-om-1 uzrokuje promjenu citokinskih profila na razini gena i proteina
2. Ekspresija gena koji kodiraju sintezu različitih skupina citokina (interleukini, interferoni, čimbenici rasta, porodica TGF- $\beta$ , porodica TNF- $\alpha$ ) u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije HIV-om-1 je različita
3. U kroničnoj infekciji HIV-om-1 vidljiva je hiperaktivacija imunskog sustava kroz pojačanu ekspresiju 13 citokinskih gena u odnosu na akutnu fazu infekcije
4. Napredovanjem infekcije HIV-om-1 iz akutne u kroničnu fazu ne dolazi do promjene iz Th1 u Th2 citokinski profil
5. U skupini HIV-om zaraženih ispitanika prelaskom iz akutne u kroničnu fazu infekcije značajno se smanjuje koncentracija IL-9
6. Koncentracija IL-17A značajno je snižena u HIV-om zaraženih osoba prije primjene antiretrovirusne terapije u odnosu na kontrolnu HIV-negativnu skupinu ispitanika
7. Primjena antiretrovirusne terapije uzrokuje supresiju virusne replikacije
8. Primjena antiretrovirusne terapije uzrokuje smanjenje hiperaktivacije imunskog sustava u HIV-om zaraženih ispitanika s dugotrajnom supresijom virusne replikacije što je vidljivo iz smanjenja ekspresije aktivacijskih biljega CD38 na CD8<sup>+</sup> limfocitima T i HLA-DR na limfocitima T

## 7. LITERATURA

Abbas AK, Lichtman AH (2007) Cytokines. U: Abbas AK, Lichtman AH (ed.) Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Elsevier Saunders, 243-273

Abbas W, Dichamp I, Herbein G (2012) The HIV-1 Nef protein interacts with two components of the 40S small ribosomal subunit, the RPS10 protein and the 18S rRNA. *Virology Journal* 9:103

Abraham L, Fackler OT (2012) HIV-1 Nef: a multifaceted modulator of T cell receptor signaling. *Cell Communication and Signaling* 10:39

Akdis M, Palomares O, van de Veen W, van Splunter M, Akdis CA (2012) Th17 and Th22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129(6):1438-1449

Allen SJ, Crown SE, Handel TM (2007) Chemokine: receptor structure, interactions and antagonism. *Annual Review of Immunology* 25:787-820

Altfeld M, Fadda L, Frleta D, Bhardway N (2011) DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nature Reviews Immunology* 11(3):176-186

Altfeld M, Kalife ET, Qi Y, Streeck H, Lichterfeld M, Johnston MN, Burgett N, Swartz ME, Yang A, Alter G, Yu XG, Meier A, Rockstroh JK, Allen TM, Jessen H, Rosenberg ES, Carrington M, Walker BD (2006) HLA alleles associated with delayed progression to AIDS contribute strongly to the initial CD8<sup>+</sup> T cell response against HIV-1. *Public Library of Science Medicine* 3(10):e403

Alvarez Y, Tuen M, Nadas A, Hioe CE (2012) In vitro restoration of Th17 response during HIV infection with an antiretroviral drug and Th17 differentiation cytokines. *AIDS Research and Human Retroviruses* 28(8):823-34

Appay V, Sauce D (2008) Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *Journal of Pathology* 214:231-241

Arias JF, Heyer LN, von Bredow B, Weisgrau KL, Moldt B, Burton DR, Rakasz EG, Evans DT (2014) Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent

cell-mediated cytotoxicity. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 111(17):6425-6430

Arias JF, Nishikara R, Bala M, Ikuta K (2010) High systemic levels of interleukin-10, interleukin-22 and C-reactive protein in Indian patients are associated with low *in vitro* replication of HIV-1 subtype C viruses. *Retrovirology* 7:15

Arrildt KT, Josepj SB, Swanstrom R (2012) The HIV-1 Env protein: A coat of many colors. *Current HIV/AIDS Reports* 9(1):52-63

Autran B, Carcelaint G, Gorochov G, Blanc C, Renaud M, Durali M, Mathez D, Calvez V, Leibowitch J, Katlama C, Debre P (1999) Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy. *Immunological Letters* 66(1-3):207-11

Bailer RT, Holloway A, Sun J, Margolick JB, Martin M, Kostman J, Montaner LJ (1999) IL-13 and IFN- $\gamma$  secretion by activated T cells in HIV-1 infection associated with viral suppression and a lack of disease progression. *Journal of Immunology* 162:7534-7542

Baqui A, Jabra-Rizk M, Kelley J, Zhang M, Falkler WJ, Meiller T (2000) Enhanced interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by LPS stimulated human monocytes isolated from HIV+ patients. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 22:401-421

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Brun-Vezinet 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* 220:868-71

Batisse J, Guerrero SX, Bernacchi S, Richert L, Godet J, Goldschmidt V, Mely Y, Marquet R, de Rocquigny H, Paillart J-C (2013) APOBEC3G impairs the multimerization of the HIV-1 Vif protein in living cells. *Journal of Virology* 87(11):6492-6506

Baum LL (2010) Role of humoral immunity in host defense against HIV. *Current HIV/AIDS Reports* 7(1):11-18

Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (2014a) Innate immune recognition: setting the stage for T-cell responses. U: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (ed.) *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious disease*. Philadelphia, Elsevier Saunders, chapter 6

Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (2014b) Human immunodeficiency virus entry and dissemination. U: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (ed.) Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious disease. Philadelphia, Elsevier Saunders, chapter 123

Benjamin J, Ganser-Pornillos BK, Tivol WF, Sundquist WI, Jensen GJ (2005) Three-dimensional structure of HIV-1 virus-like particles by electron cryotomography. *Journal of Molecular Biology* 346:577-588

Borrow P, Shattock RJ, Vyakarnam A, EUROPRISE Working Group (2010) Innate immunity against HIV: a priority target for HIV prevention research. *Retrovirology* 7:84

Brenchley JM, Douek DC (2008) The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis. *Current Opinion in HIV and AIDS* 3(3):356-361

Brenchley JM, Price DA, Douek DC (2006a) HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature Immunology* 7(3):235-239

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC (2006b) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine* 12(12):1365-71

Broussard SR, Staprans SI, White R, Whitehead EM, Feinberg MB, Allan JS (2001) Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected african green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *Journal of Virology* 75:2262-2275

Carrington M, Alter G (2012) Innate immune control of HIV. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a007070

Catalfamo M, Le Saout C, Lane HC (2012) The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 23:207-214

Cayota A, Vuillier F, Scott-Algara D, Feuillie V, Dighiero G (1992) Impaired proliferative capacity and abnormal cytokine profile of naive and memory CD4+ T cells from HIV-seropositive patients. *Clinical and Experimental Immunology* 88:478-483

- Chang JJ, Altfeld M (2010) Innate immune activation in primary HIV-1 infection. *Journal of Infectious Diseases* 202(2):S297-S301
- Chang JJ, Lacas A, Lindsay RJ, Doyle EH, Axten KL, Pereyra F, Rosenberg ES, Walker BD, Allen TM, Altfeld M (2012) Differential regulation of TLR pathways in acute and chronic HIV-1 infection. *AIDS* 26(5):533-541
- Clerici M, Balotta C, Salvaggio A, Riva C, Trabattoni D, Papagno L, Berlusconi A, Rusconi S, Villa ML, Moroni M, Galli M (1996) Human immunodeficiency virus (HIV) phenotype and interleukin-2/interleukin-10 ratio are associated markers of protection and progression in HIV individuals. *Blood* 88(2):574-579
- Clerici M, Shearer GM (1993) A Th1→Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunology Today* 14:107-111
- Clerici M, Wynn TA, Berzofsky JA, Blatt SP, Hendrix CW, Sher A, Coffman RL, Shearer GM (1994) Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *Journal of Clinical Investigations* 93(2):768-75
- Coffin J, Swanstrom R (2013) HIV pathogenesis: Dynamics and genetics of viral populations and infected cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3:a012526
- Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima K, Varmus H, Vogt P (1986) What to call the AIDS virus? *Nature* 321:10.
- Cohen MS, Gay CL, Busch MP, Hecht FM (2010) The detection of acute HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases* 202(2):S270-277
- Costin JM (2007) Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virology Journal* 4:100
- Craigie R, Bushman FD (2012) HIV DNA integration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a006890
- Das AT, Harwig A, Berkhaut B (2011) The HIV-1 Tat protein has a versatile role in activating viral transcription. *Journal of Virology* 85:9506-9516

Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, Hunt P, Martin JN, Kahn JO, Levy J, McGrath MS, Hecht FM (2004) Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes. *Blood* 104(4):942-7

Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM (2011) The production of effectors. U: Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM (ed.) *Roitt's essential immunology*. Chichester, Wiley-Blackwell, 226-262

Dion ML, Bordi R, Zeidan J, Asaad R, Boulassel MR, Routy JP, Lederman MM, Cheynier R (2007) Slow disease progression and robust therapy-mediated CD4+ T-cell recovery are associated with efficient thymopoiesis during HIV-1 infection. *Blood* 109(7):2912-20

Doisne JM, Urrutia A, Lacabaratz-Porret C, Goujard C, Meyer L, Chaix ML, Sinet M, Venet A (2004) CD8+ T cells specific for EBV, cytomegalovirus and influenza virus are activated during primary HIV infection. *Journal of Immunology* 173(4):2410-8

Dube M, Bego MG, Paquay C, Cohen EA (2010) Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* 7:114

Duh EJ, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS, Rabson AB (1989) Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 86:5974-5978

Dumas F, Preira P, Salome L (2014) Membrane organisation of virus and target cell plays a role in HIV entry. *Biochimie* 107:22-27

Dyer WB, Zaunders JJ, Yuan FF, Wang B, Learmont JC, Geczy AF, Saksena NK, McPhee DA, Gorry PR, Sullivan JS (2008) Mechanisms of HIV non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HIV-1 infection. *Retrovirology* 5:112

Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE (1999) Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology* 30:526

El Hed A, Khaitan A, Kozhaya L, Manel N, Daskalakis D, Borkowsky W, Valentine F, Littman DR, Unutmaz D (2010) Human Th17 cells are susceptible to HIV and are perturbed during infection. *Journal of Infectious Diseases* 201(6):843-854

El Hed A, Unutmaz D (2010) Th17 cells and HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS* 5(2): 146-150

Erikstrup C, Kallestrup P, Zinyama-Gutsire, Gomo E (2007) Reduced mortality and CD4 cell loss among carriers of the interleukin-10 – 1082G allele in a Zimbabwean cohort of HIV-1-infected adults. *AIDS* 21:2283-2291

Fakoya A, Matear P, Filley E, Rook GAW, Stanford J, Gilson RJC, Beecham N, Weller IVD, Vyakarnam A (1997) HIV infection alters the production of both type 1 and 2 cytokines but does not induce a polarized type 1 or 2 state. *AIDS* 11:1445-1452

Ferrari G, Korber B, Goonetilleke N, Liu MKP, Turnbull EL, Salazar-Gonzalez JF, Hawkins N, Self S, Watson S, Betts MR, Gay C, McGhee K, Pellegrino P, Williams I, Tomaras GD, Haynes BF, Gray CM, Borrow P, Roederer M, McMichael AJ, Weinhold KJ (2011) Relationship between functional profile of HIV-1 specific CD8 T cells and epitope variability with the selection of escape mutants in acute HIV-1 infection. *Public Library of Science Pathogens* 7(2):e1001273

Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, Heldebrant C, Smith R, Conrad A, Kleinman SH, Busch MP (2003) Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 17(13):1871-1879

Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR (2012) *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 9th edition, Elsevier

Flammer JR, Dobrovolska J, Kennedy MA, Chinenov Y, Glass CK, Ivashkiv LB, Rogatsky I (2010) The type I interferon signaling pathway is a target for glucocorticoid inhibition. *Molecular and Cellular Biology* 30(19):4564-4574

Folks TM, Clouse KA, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci AS (1989) Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically

infected T-cell clone. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 86:2365-2368

Fun A, Wensing AMJ, Verheyen J, Nijhuis M (2012) Human immunodeficiency virus gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology* 9:63

Gaardbo JC, Hartling HJ, Gerstoft J, Nielsen SD (2011) Incomplete immune recovery in HIV infection: mechanisms, relevance for clinical care and possible solutions. *Clinical and Developmental Immunology*, Article ID 670957

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503

Garg H, Viard M, Jacobs A, Blumenthal R (2011) Targeting HIV-1 gp41-induced fusion and pathogenesis for anti-viral therapy. *Current Topics in Medical Chemistry* 11(24):2947-2958

Genovese L, Nebuloni M, Alfano M (2013) Cell-mediated immunity in elite controllers naturally controlling HIV viral load. *Frontiers in Immunology* 4(86)

Giese S, Marsh M (2014) Tetherin can restrict cell-free and cell-cell transmission of HIV from primary macrophages to T cells. *Public Library of Science Pathogens* 10(7):e1004189

Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R (1999) Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *Journal of Infectious Diseases* 179(4):859-70

Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, Yamashita TE, Mellors JW, Hultin LE, Jamieson BD, Margolick JB, Rinaldo CR, Phair JP, Detels R (2002) Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *Journal of Acquired Immune deficiency Syndromes* 29(4):346-55

Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, Gansov VV, Keele BF, Learn GH, Turnbull EL, Salazar MG, Weinhold KJ, Moore S, Letvin N, Haynes BF, Cohen MS, Hraber P, Bhattacharya T, Borrow P, Perelson AS, Hahn BH, Shaw GM, Korber BT, McMichael AJ (2009) The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the



control of acute viremia in HIV-1 infection. *Journal of Experimental Medicine* 206(6):1253-1272

Graw F, Regoes RR (2014) Predicting the impact of CD8+ T cell polyfunctionality on HIV disease progression. *Journal of Virology* 88(17):10134-10145

Gray ES, Madiga MC, Hermanus T, Moore PL, Wibmer CK, Tumba NL, Werner L, Mlisana K, Sibeko S, Williamson C, Abdool Karim SS, Morris L (2011) The neutralization breadth of HIV-1 develops incrementally over four years and is associated with CD4+ T cell decline and high viral load during acute infection. *Journal of Virology* 85(10):4828-4840

Haas A, Zimmermann K, Oxenius A (2011) Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. *Journal of Virology* 85(23):12102-12113

Hazenberg MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, Hamann D, Prins M, Miedma F (2003) Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 17(13):1881-8

Hehlgans T, Pfeffer K (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the game. *Immunology* 115(1):1-20

Hill M, Tachedjian G, Mak J (2005) The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Current HIV Research* 3(1):73-85

Hsue PY, Deeks SG, Hunt PW (2012) Immunologic basis of cardiovascular disease in HIV-infected adults. *Journal of Infectious Diseases* 205(3):S375-S382

Hu W-S, Hughes SH (2012) HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a006882

Iwasaki A (2012) Innate immune recognition of HIV-1. *Immunity* 37:389-398

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2005) Failures of host defense mechanisms. U: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (ed.) *Immunobiology*. New York, Garland Science

Kaplan MH (2013) Th9 cells: differentiation and disease. *Immunological Reviews* 252(1):104-115

Karn J, Stoltzfus CM (2012) Regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4:a006916

Kassu A, Marcus RA, D'Souza MB, Kelly-McKnight EA, Golden-Mason L, Akkina R, Fontenot AP, Wilson CC, Palmer BE (2010) Regulation of virus-specific CD4+ T cell function by multiple costimulatory receptors during chronic HIV infection. *Journal of Immunology* 185(5):3007-3018

Katsikis PD, Mueller YM, Villinger F (2011) The cytokine network of acute HIV infection: A promising target for vaccines and therapy to reduce viral set point?. *Public Library of Science Pathogens* 7(8):e1002055

Keating SM, Golub ET, Nowicki M, Young M, Anastos K, Crystal H, Cohen MH, Zhang J, Greenblatt RM, Desai S, Wu S, Landay AL, Gange SJ, Norris PJ (2011) The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women. *AIDS* 25(15):1823-32

Keating SM, Jacobs ES, Norris PJ (2013) Soluble mediators of inflammation in HIV and their implications for therapeutics and vaccine development. *Cytokine Growth Factor Review* 23(0):193-206

Kim CJ, Nazli A, Rojas OL, Chege D, Alidina Z, Huibner S, Mujib S, Benko E, Kovacs C, Shin LYY, Grin A, Kandel G, Loutfy M, Ostrowski M, Gommerman JL, Kaushic C, Kaul R (2012) A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal Immunology* 5:670-680

Kindt T, Goldsby R, Osborne B (2006) *Cytokines*. U: Kindt T, Goldsby R, Osborne B (ed.) *Kuby immunology*. New York, W. H. Freeman & Company, 277-299

Kogan M, Rappaport J (2011) HIV-1 accessory protein Vpr: Relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* 8:25

Koppensteiner H, Brack-Werner R, Schindler M (2012) Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type 1 infection. *Retrovirology* 9:82

Kuller LH, Tracy R, Bellosso W, De Wit S, Drummond F, Clifford Lane H, Ledergerber B, Lundgren J, Neuhaus J, Nixon D, Paton NI, Neaton JD (2008) Inflammatory and coagulation

biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *Public Library of Science Medicine* 5(10):e203

Lacy P, Stow JL (2011) Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood* 118(1)

Lane BR, Markovitz DM, Woodford NL, Rochford R, Strier RM, Coffey MJ (1999) TNF- $\alpha$  inhibits HIV-1 replication in peripheral blood monocyte and alveolar macrophages by inducing the production of RANTES and decreasing C-C chemokine receptor 5 (CCR5) expression. *Journal of Immunology* 163:3653-3661

Lee SK, Potempa M, Swanstrom R (2012) The Choreography of HIV-1 proteolytic processing and virion assembly. *Journal of Biological Chemistry* 287(49):40867-40874

Leonard WJ (2012) Type I cytokines and interferons and their receptors. U: Paul WE (ed.) *Fundamental Immunology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, a Walter Kluwer business, 601-638

Loftin LM, Kienzle M, Y Y, Collman RG (2010) R5X4 HIV-1 coreceptor use in primary target cells: implications for coreceptor entry blocking strategies. *Journal of Translational Medicine* 9(1):S3

Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4+ T cells: Differentiation and function. *Clinical and Developmental Immunology*, Article ID 925135

Maartens G, Celum C, Lewin SR (2014) HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. *Lancet* 384:258-71

Malim MH, Bieniasz PD (2012) HIV restriction factors and mechanisms of evasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a006940

McCoy LE, Weiss RA (2013) Neutralizing antibodies to HIV-1 induced by immunization. *Journal of Experimental Medicine* 210(2):209-223

McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* 10:11-23

McNatt MW, Zang T, Bieniasz PD (2013) Vpu binds directly to Tetherin and displaces it from nascent virions. *Public Library of Science Pathogens* 9(4): e1003299

Melikyan GB (2014) HIV entry: a game of hide-and-fuse? *Current Opinion in Virology* 4:1-7

Melki M-H, Saidi H, Dufour A, Olivo-Marin J-C, Gougeon M-L (2010) Escape of HIV-1-infected dendritic cells from TRAIL-mediated NK cell cytotoxicity during NK-DC cross-talk – A pivotal role of HMGB1. *Public Library of Science Pathogens* 6(4):e1000862

Mocroft A, Phillips AN, Gatell J, Ledergerber B, Fisher M, Clumeck N, Losso M, Lazzarin A, Fatkenheuer G, Lundgren JD (2007) Normalisation of CD4 counts in patients with HIV-1 infection and maximum virological suppression who are taking combination antiretroviral therapy: an observational cohort study. *Lancet* 370:407-413

Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR (2010) Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 7:54

Murphy KP (2012) Failures of host defense mechanisms. U: Murphy KP (ed.) *Janeway's Immunobiology*. New York, Garland Science, 543-562

Nagalakshmi ML, Rascle A, Zurawski S, Menon S, de Waal Malefyt R (2004) Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. *International Immunopharmacology* 4(5):679-691

Ndhlovu LC, Chapman JM, Jha AR, Snyder-Cappione JE, Pagan M, Leal FE, Boland BS, Norris PJ, Rosenberg MG, Nixon DF (2008) Suppression of HIV-1 plasma viral load below detection preserves IL-17 producing T cells in HIV-1 infection. *AIDS* 22(8): 990-992

Norris PJ, Pappalardo BL, Custer B, Spotts G, Hecht FM, Busch MP (2006) Elevation in IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  from the earliest point of HIV type 1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 22(8):757-762

O`Shea JJ, Murray PJ (2008) Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28(4):477-487

Overbaugh J, Morris L (2012) The antibody response against HIV-1. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2:a007039

Page EE, Greathead L, Metcalf R, Clark SA, Hart M, Fuchs D, Pantelidis P, Gotch F, Pozniak A, Nelson M, Boasso A, Gazzard B, Kelleher P (2014) Loss of Th22 cells is associated with increased immune activation and IDO-1 activity in HIV-1 infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 67(3):227-35

Paiardini M, Muller-Trutwin M (2013) HIV-associated chronic immune activation. *Immunological Reviews* 254(1):78-101

Pakker NG, Notermans DW, De Boer RJ, Roos MTL, De Wolf F, Hill A, Leonard JM, Danner SA, Miedema F, Schellekens PTA (1998) Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nature Medicine* 4:208-214

Peeters M, D`Arc M, Delaporte E (2014) Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Reviews* 16:23-34

Piantadosi A, Panteleeff D, Blish CA, Baeten JM, Jaoko W, McClelland RS, Overbaugh J (2009) Breadth of neutralizing antibody response to human immunodeficiency virus type 1 is affected by factors early in infection but does not influence disease progression. *Journal of Virology* 83(19):10269-10274

Pitha PM (2011) Innate antiviral response: role in HIV-1 infection. *Viruses* 3:1179-1203

Porichis F, Kaufmann DE (2011) HIV-specific CD4 T cells and immune control of viral replication. *Current Opinion in HIV and AIDS* 6(3):174-180

Ramirez J-M, Brembilla NC, Sorg O, Chicheportiche R, Matthes , Dayer J-M, Saurat J-H, Roosnek E, Chizzolini C (2010) Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *European Journal of Immunology* 40:2450-2459

Ratner L, Gallo RC, Wong-Staal F (1985) HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus. *Nature* 313:636-7

Rehr M, Cahenzli J, Haas A, Price DA, Gostick E, Huber M, Karrer U, Oxenius A (2008) Emergence of polyfunctional CD8+ T cells after prolonged suppression of human immunodeficiency virus replication by antiretroviral therapy. *Journal of Virology* 82(7):3391-3404

Reuter MA, Pombo C, Betts MR (2012) Cytokine production and dysregulation in HIV pathogenesis: Lessons for development of therapeutics and vaccines. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 23:181-191

Roberts L, Passmore JAS, Williamson C, Little F, Bebell LM, Mlisana K, Burgers WA, Abdool Karim Q, Abdool Karim SS (2010) Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS* 24(6):819-831

Robinson HL (2013) Non-neutralizing antibodies in prevention of HIV infection. *Expert Opinion on Biological Therapy* 13(2):197-207

Santos AF, Soares MA (2010) HIV genetic diversity and drug resistance. *Viruses* 2:503-531

Sarih M, Maataoui WE, Benslimane A (1996) Analysis of apoptosis and a Th1/Th2 phenotype in HIV-infected patients. *Immunology Letters* 50(3):125-9

Schiralli Lester GM, Henderson AJ (2012) Mechanisms of HIV transcriptional regulation and their contribution to latency. *Molecular Biology International* vol.2012, ID 614120

Schuitmaker H, van't Wout AB, Lusso P (2010) Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *Journal of Translational Medicine* 9:S5

Seth N, Kaufmann D, Lahey T, Rosenberg ES, Wucherpfening KW (2005) Expansion and contraction of HIV-specific CD4 T cells with short burst of viremia, but physical loss of the majority of these cells with sustained viral replication. *Journal of Immunology* 175(10):6948-6958

Sharma SK, Soneja M (2011) HIV & immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). *Indian Journal of Medical Research* 134(6):866-877

Sharp PM, Hahn BH (2011) Origins of HIV and AIDS pandemic. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine* 1:a006841

Shetty N, Tang JW, Andrews J (2009) Infectious diseases: Pathogenesis, prevention and case studies. Wiley-Blackwell, chapter 18

Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, O'Brien TR, Vlahov D, Buchbinder S, Giorgi J, Rinaldo C, Donfield S, Wiloughby A, O'Brien SJ, Smith MW (2000)

Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL-10. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 97(26):14467-14472

Shiner EK, Holbrook BC, Alexander-Miller MA (2014) CD4+ T cell subset differentiation and avidity setpoint are dictated by the interplay of cytokine and antigen mediated signals. *Public Library of Science ONE* 9(6):e100175

Siewe B, Landay A (2011) Key concepts in the early immunology of HIV-1 infection. *Current Infectious Disease Reports* 14:102-109

Sindhu S, Toma E, Cordeiro P, Ahmad R, Morisset R, Menezes J (2006) Relationship of in vivo and ex vivo levels of Th1 and Th2 cytokines with viremia in HAART patients with and without opportunistic infections. *Journal of Medical Virology* 78:431-439

Sodora DL, Silvestri G (2008) Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS* 22:439-446

Soghoian DZ, Jessen H, Flanders M, Sierra-Davidson K, Cutler S, Pertel T, Ranasinghe S, Lindqvist M, Davis I, Lane K, Rychert J, Rosenberg ES, Piechocka-Trocha A, Brass AL, Brenchley JM, Walker BD, Streeck H (2012) HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Science Translational Medicine* 4(123):123ra25

Stacey AR, Norris PJ, Qin L, Haygreen EA, Taylor E, Heitman J, Lebedeva M, DeCamp A, Li D, Grove D, Self SG, Borrow P (2009) Induction of a striking systemic cytokine cascade prior peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infection. *Journal of Virology* 83(8):3719-3733

Sterjovski J, Churchill MJ, Roche M, Ellett A, Farrugia W, Wesselingh SL, Cunningham AL, Ramsland PA, Gorry PR (2011) CD4-binding site alterations in CCR5-using HIV-1 envelopes influencing gp120-CD4 interactions and fusogenicity. *Virology* 410:418-428

Streeck H, Nixon DF (2010) T cell immunity in acute HIV-1 infection. *Journal of Infectious Diseases* 202(S2):S302-S306

Stylianou E, Aukrust P, Kvale D, Muller F, Froland SS (1998) IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression – down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clinical & Experimental Immunology* 116:115-120

Sumpter B, Dunham R, Gordon S, Engram J, Hennessy M, Kinter A, Paiardini M, Cervasi B, Klatt N, McClure H, Milush JM, Staprans S, Sodora DL, Silvestri G (2007) Correlates of preserved CD4(+) T cell homeostasis during natural, nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection of sooty mangabeys: implications for AIDS pathogenesis. *Journal of Immunology* 178(3):1680-91

Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ (2013) Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type-1 inteferon pathway. *Science* 339(6121)

Tan C, Gery I (2012) The unique features of Th9 cells and their products. *Critical Reviews in Immunology* 32(1):1-10

Taniguchi I, Mabuchi N, Ohno M (2014) HIV-1 Rev protein specifies the viral RNA export pathway by suppressing TAP/NXF1 recruitment. *Nucleic Acid Research* 42(10):6645-6658

Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG (2012) Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(1):16-32

Towers GJ, Noursadeghi M (2014) Interactions between HIV-1 and the cell-autonomous innate immune system. *Cell Host & Microbe* 16:10-17

Vallabhapurapu S, Karin M (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual Review of Immunology* 27:693-733

Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Kaptue L, Ndembu N, Gurtler L, Devare Sushil, Brennan CA (2011) Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of Virology* 85:1403-1407

Volberding PA, Deeks SG (2010) Antiretroviral therapy and management of HIV infection. *Lancet* 367:49-62

Wilén CB, Tilton JC, Doms RW (2012a) HIV: Cell binding and entry. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine* 2:a006866

Wilén CB, Tilton JC, Doms RW (2012b) Molecular mechanisms of HIV entry. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 726:223-42

Williams A, Steffens F, Reinecke C, Meyer D (2013) The Th1/Th2/Th17 cytokine profile of HIV-infected individuals: A multivariate cytokinomics approach. *Cytokine* 61:521-526



Wilson CM, Ellenberg JH, Douglas SD, Moscicki AB, Holland CA (2004) CD8+CD38+ T cells but not HIV type 1 RNA viral load predict CD4+ T cell loss in a predominantly minority female HIV+ adolescent population. *AIDS Research and Human Retroviruses* 20(3):263-9

Wilson EMP, Sereti I (2013) Immune restoration after antiretroviral therapy: the pitfalls of hasty or incomplete repairs. *Immunological Reviews* 254(1):343-354

Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, Muyembe JJ, Kabongo JMM, Kalengayi RM, van Marck E, Gilbert MTP, Wolinsky SM (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455(7213):661-664

Wu Y (2004) HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* 1:13

Zeng M, Haase AT, Schacker TW (2012) Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells. *Trends in Immunology* 33(6):306-14

Zhu J, Gaiha GD, John SP, Pertel T, Chin CR, Gao G, Qu H, Walker BD, Elledge SJ, Brass AL (2012) Reactivation of latent HIV-1 by inhibition of BRD4. *Cell Reports* 2(4):807-816

Zhu J, Paul WE (2010) Peripheral CD4 T cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological Reviews* 238(1):247-262

## 8. PRILOZI

### Prilog 1. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

KRATICA/SIMBOL	Englesko nazivlje	Hrvatsko nazivlje
ADCC	antibody-dependant cellular cytotoxicity	stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima
ADIPOQ	adiponectin	adiponektin
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	sindrom stečene imunodeficijencije
AMP	adenosine monophosphate	adenozin monofosfat
APOBEC	apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like	enzim odgovoran za uređivanje glasničke RNA apolipoproteina
BMP	bone morphogenetic protein	koštani morfogenetski protein
CCR	chemokine co-receptor	kemokinski koreceptor
CD	cluster of differentiation	diferencijacijski antigen
CNTF	ciliary neurotrophic factor	cilijarni neurotrofni čimbenik
CpG	cytosine-phosphate-guanin	citozin-fosfat-gvanin
CRF	circulating recombinant form	cirkulirajuća rekombinantna forma
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte-associated poetin	protein pridružen citotoksičnom limfocitu T
DC	dendritic cell	dendritička stanica
DNA	deoxyribonucleic acid	deoksiribonukleinska kiselina
EBAF	endometrial bleeding associated factor	čimbenik povezan s endometrijskim krvarenjem
Env	envelope	ovojnica
FAM	family with sequence similarity	porodica sličnih sekvenci
Gag	group antigen	grupni antigen

GALT	gut-associated lymphoid tissue	limfatičko tkivo pridruženo crijevu
GAS	GMP-AMP synthase	enzim sintaza za GMP-AMP
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor	čimbenik stimulacije kolonija granulocita
GDF	growth differentiation factor	čimbenik rasta i diferencijacije
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor	čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga
GMP	guanosine monophosphate	gvanozin monofosfat
GTP	guanosine triphosphate	gvanozin trifosfat
HAART	highly active antiretroviral therapy	vrlo aktivna antiretrovirusna terapija
HIV	human immunodeficiency virus	virus ljudske imunodeficijencije
HLA	human leukocyte antigen	humani leukocitni antigen
HTLV-III	human T-cell leukemia virus III	ljudskim virusom leukemije limfocita T tipa III
IFN	interferon	interferon
Ig	immunoglobulin	imunoglobulin
IL	interleukin	interleukin
INH	inhibin	inhibin
INR	immunological nonresponder	imunosni nonresponder
IRF	interferon regulatory factor	protein koji regulira transkripciju interferona
IRIS	immune reconstitution inflammatory syndrome	upalni sindrom povezan s imunološkom rekonstitucijom
ISGF	interferon-stimulated gene factor	transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju interferonima potaknutih gena

ISRE	interferon-stimulated response element	element interferonima stimuliranog odgovora
JAK	janus kinase	janus kinaza
KIR	killer immunoglobulin-like receptor	imunoglobulinu nalik receptor na površini NK stanica
LAV	fr. lymphadénopathie associée virus	virus udružen s limfadenopatijom
LIF	leukemia inhibitory factor	čimbenik inhibicije leukemije
LPS	lipopolysaccharide	lipopolisaharid
LT	lymphotoxin	limfotoksin
LTR	long terminal repeat	dugi ponavljajući krajevi
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor	čimbenik stimulacije kolonija makrofaga
MHC	major histocompatibility complex	glavni kompleks tkivne srodnosti
MHC	major histocompatibility complex	glavni sustav tkivne podudarnosti
MSTN	myostatin	miostatin
nAb	neutralizing antibody	neutralizacijsko protutijelo
NEF	negative regulatory factor	negativni regulatorni faktor
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activate B cells	nuklearni faktor pojačivač lakog lanca kapa aktiviranih limfocita B
NK	natural killer	urođenoubilačke stanice
NODAL	nodal growth differentiation factor	čimbenik rasta i diferencijacije u embriogenezi
ORF	open reading frame	otvoreni okvir čitanja
OSM	oncostatin M	onkostatin M
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	molekularni uzorak specifičan za patogen

PBMC	peripheral blood mononuclear cell	mononuklearne stanice periferne krvi
PCR	polymerase chain reaction	lančana reakcija polimerazom
PDGF	platelet-derived growth factor	trombocitni čimbenik rasta
Pol	polymerase	polimeraza
PRR	pattern recognition receptor	receptor koji prepoznaje specifičan uzorak
PTEF-b	positive transcriptional factor B	pozitivni transkripcijski elongacijski faktor
REV	regulator of virion protein expression	regulator ekspresije proteina viriona
RIG	retinoic acid-inducible gene	gen čija je transkripcija potaknuta retinoičnom kiselinom
RLR	retinoic acid-inducible gene 1-like receptor	receptor za protein nastao transkripcijom gena pod utjecajem retinoične kiseline
RNA	ribonucleic acid	ribonukleinska kiselina
S	serine	serin
SIV	simian immunodeficiency virus	virus imunodeficijencije majmuna
SPP	secreted phosphoprotein	izlučen fosfoprotein
STAT	signal transducer and activator of transcription	prijenosnik signala i aktivator transkripcije
STING	stimulator of interferon gene	stimulator gena za interferon
TAR	transactivation-responsive region	regija odgovorna za transaktivaciju
TAT	trans-activator of transcription	transaktivator transkripcije
TCR	T-cell receptor	T-stanični receptor
Tfh	follicular helper T cell	folikularni pomoćnički limfocit T

TGF	transforming growth factor	transformirajući čimbenik rasta
Th	helper T lymphocytes	pomoćnički limfociti T
THPO	thrombopoietin	trombopoetin
TLR	toll-like receptor	receptor nalik toll-u
TNF	tumor necrosis factor	čimbenik tumorske nekroze
TNFRSF	tumor necrosis factor receptor superfamily	superporodica receptora čimbenika tumorske nekroze
TNFSF	tumor necrosis factor superfamily	superporodica čimbenika tumorske nekroze
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	TNF-povezan apoptoza-inducirajući ligand
Treg	regulatory T cell	regulatorni limfocit T
TXLNA	alpha-taxilin	taksilin alfa
VEGF	vascular endothelial growth factor	čimbenik rasta žilnog endotela
VIF	viral infectivity factor	faktor virusne infektivnosti
VPR	viral protein R	virusni protein R
VPU	viral protein unique	jedinstveni virusni protein
W	tryptophan	triptofan

## Prilog 2. POPIS CITOKINA I NJIHOVA ULOGA

Citokin	Hrvatski naziv	Funkcija
<b>Interleukini</b>		
IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$	Interleukin 1 alfa, Interleukin 1 beta	kostimulacija aktivacije limfocita T, proliferacija i sazrijevanje limfocita B, pireksija, izlučivanje proteina akutne faze
IL-1Ra	Interleukin 1 receptor antagonist	inhibicija aktivnosti IL-1 $\alpha$ i IL-1 $\beta$
IL-2	Interleukin 2	proliferacija i diferencijacija limfocita T, pojačavanje citotoksičnosti NK stanica
IL-3	Interleukin 3	rast i diferencijacija hematopoietskih prekursora, rast mastocita
IL-4	Interleukin 4	indukcija Th2 stanica, stimulacija proliferacije aktiviranih limfocita B i T, pojačavanje makrofagne fagocitoze
IL-5	Interleukin 5	proliferacija eozinofila, rast i sazrijevanje limfocita B
IL-6	Interleukin 6	diferencijacija limfocita B, izlučivanje proteina akutne faze
IL-7	Interleukin 7	proliferacija limfocita B i T, aktivacija zrelih limfocita T
IL-8	Interleukin 8	kemotaksija i aktivacija neutrofila
IL-9	Interleukin 9	proliferacija timocita, pojačavanje rasta mastocita
IL-10	Interleukin 10	inhibicija lučenja IL-2, inhibicija diferencijacije Th1 stanica, pojačavanje diferencijacije limfocita B
IL-11	Interleukin 11	diferencijacija megakariocita, izlučivanje proteina akutne faze
IL-12	Interleukin 12	diferencijacija Th1 stanica, pojačavanje citotoksičnosti NK stanica i CD8 <sup>+</sup> limfocita T
IL-13	Interleukin 13	koaktivacija proliferacije limfocita B, pojačavanje ekspresije MHC klase II na limfocitima B i monocitima
TXLNA (IL-14)	Taksilin alfa (interleukin 14)	kontrola rasta i proliferacije limfocita B
IL-15	Interleukin 15	proliferacija limfocita T, NK stanica, aktiviranih limfocita B
IL-16	Interleukin 16	kemotaksija limfocita T, monocita i eozinofila
IL-17	Interleukin 17	proliferacija limfocita T, stimulacija lučenja citokina IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8
IL-18	Interleukin 18	pojačavanje citotoksičnosti NK stanica, koaktivacija Th1 stanica
IL-19	Interleukin 19	modulacija aktivnosti Th1 stanica
IL-20	Interleukin 20	regulacija upalnog odgovora u koži
IL-21	Interleukin 21	regulacija hematopoeze, diferencijacija NK stanica, aktivacija limfocita B
IL-22	Interleukin 22	inhibicija Th2 stanica da luče IL-4
IL-23	Interleukin 23	preživljavanje Th17 stanica, poticanje sinteze proupalnih citokina
IL-24	Interleukin 24	poticanje sinteze IL-1, IL-6, TNF
IL-25	Interleukin 25	poticanje sinteze IL-4, IL-5, IL-13
IL-27	Interleukin 27	pojačanje sinteze IL-8 i IL-10

<b>Interferoni</b>		
IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$	Interferon alfa, interferon beta	inhibicija virusne replikacije, poticanje ekspresije MHC klase I
IFN- $\gamma$	Interferon gama	inhibicija virusne replikacije, inhibicija proliferacije Th2 stanica, aktivacija makrofaga
<b>Čimbenici rasta</b>		
CNTF, ciliary neurotrophic factor	Cilijarni neurotrofni čimbenik	poticanje sinteze neurotransmitora, faktor preživljavanja neurona
M-CSF, macrophage colony-stimulating factor	Čimbenik stimulacije kolonija makrofaga	proliferacija makrofagnog prekursora
GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor	Čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga	stimulacija rasta prekursora monocita, neutrofila, eozinofila i bazofila, aktivacija makrofaga
G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor	Čimbenik stimulacije kolonija granulocita	stimulacija rasta prekursora granulocita
VEGF-A, vascular endothelial growth factor A	Čimbenik rasta žilnog endotela, tip A	kemotaksija makrofaga i granulocita, angiogeneza
VEGF-D, vascular endothelial growth factor D	Čimbenik rasta žilnog endotela, tip D	regulacija angiogeneze
EBAF, endometrial bleeding associated factor	Čimbenik povezan s endometrijskim krvarenjem	abnormalno krvarenje endometrija
LIF, leukemia inhibitory factor	Čimbenik inhibicije leukemije	izlučivanje proteina akutne faze
NODAL, nodal growth differentiation factor	Čimbenik rasta i diferencijacije u embriogenezi	diferencijacija stanica u ranoj embriogenezi
OSM, oncostatin M	Onkostatin M	regulator rasta, inhibicija proliferacije više tumorskih staničnih linija
PDGF, platelet-derived growth factor	Trombocitni čimbenik rasta	poticanje proliferacije fibroblasta
TGF- $\alpha$ , transforming growth factor alpha	Transformirajući čimbenik rasta alfa	čimbenik rasta koji ima ulogu liganda za EGFR
THPO, thrombopoietin	Trombopoetin	proliferacija i sazrijevanje megakariocita
<b>Porodica TGF-<math>\beta</math></b>		
BMP1, bone morphogenetic protein 1	Koštani morfogogenetski protein 1	razvoj kosti i hrskavice
BMP2, bone morphogenetic protein 2	Koštani morfogogenetski protein 2	razvoj kosti i hrskavice
BMP3, bone morphogenetic protein 3	Koštani morfogogenetski protein 3	razvoj kosti
BMP4, bone morphogenetic protein 4	Koštani morfogogenetski protein 4	razvoj kosti i hrskavice



BMP5, bone morphogenetic protein 5	Koštani morfogogenetski protein 5	razvoj kosti i hrskavice
BMP6, bone morphogenetic protein 6	Koštani morfogogenetski protein 6	razvoj kosti i hrskavice
BMP7, bone morphogenetic protein 7	Koštani morfogogenetski protein 7	razvoj kosti i hrskavice, regulacija kalcija
GDF2, growth differentiation factor 2	Čimbenik rasta i diferencijacije 2	inhibicija angiogeneze
GDF5, growth differentiation factor 5	Čimbenik rasta i diferencijacije 5	razvoj kostura i zglobova
GDF9, growth differentiation factor 9	Čimbenik rasta i diferencijacije 9	razvoj primarnih folikula u jajniku, diferencijacija i sazrijevanje oocita
INH- $\alpha$ , inhibin alpha	Inhibin alfa	inhibira hipofizno lučenje folitropina
INH- $\beta$ A, inhibin beta A subunit	Inhibin beta, podjedinica A	inhibira hipofizno lučenje folitropina
MSTN, myostatin	Miostatin	negativna regulacija rasta mišića kostura
TGFB1, transforming growth factor beta 1	Transformirajući čimbenik rasta beta 1	kontrola staničnog rasta, proliferacije i apoptoze
TGFB2, transforming growth factor beta 2	Transformirajući čimbenik rasta beta 2	suprimirajući učinak na rast limfocita T ovisan o IL-2
TGFB3, transforming growth factor beta 3	Transformirajući čimbenik rasta beta 3	stanična diferencijacija, embriogeneza
<b>Porodica TNF</b>		
CD40LG, CD40 ligand	CD40 ligand	međureakcija s receptorom CD40 ključna za proliferaciju limfocita B, ekspresiju aktivacijskih biljega, stvaranje imunoglobulina
CD70, cluster of differentiation 70	diferencijacijski klaster 70	proliferacija kostimuliranih limfocita T, regulacija aktivnosti limfocita B
FASLG, Fas ligand	Fas ligand	veže se na Fas receptor koji prenosi apoptotski signal u stanicu
LTA, lymphotoxin alpha (TNF- $\beta$ , tumor necrosis factor beta)	Limfotoksin alfa (čimbenik tumorske nekroze beta)	sudjelovanje u mnogim upalnim, imunostimulirajućim i antivirusnim odgovorima, uloga u oblikovanju sekundarnih limfatičkih organa tijekom razvoja
LTB, lymphotoxin beta	Limfotoksin beta	poticanje upalnog odgovora, normalan razvoj limfnog tkiva
TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha	Čimbenik tumorske nekroze alfa	ključna uloga u razvoju upale i citotoksičnom djelovanju imunocita
TNFRSF11B, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	Superporodica receptora čimbenika tumorske nekroze, član 11b	inhibicija aktivacije osteoklasta
TNFSF10, tumor necrosis factor superfamily, member 10	Superporodica čimbenika tumorske nekroze, član 10	poticanje apoptoze u promijenjenim i tumorskim stanicama
TNFSF11, tumor necrosis factor superfamily, member 11	Superporodica čimbenika tumorske nekroze, član 11	diferencijacija i aktivacija osteoklasta, povećanje sposobnosti dendritičkih stanica da stimuliraju proliferaciju naivnih limfocita T

TNFSF12, tumor necrosis factor superfamily, member 12	Superporodica čimbenika tumorske nekroze, član 12	poticanje apoptoze, proliferacija i migracija endotelnih stanica, regulacija angiogeneze
TNFSF13, tumor necrosis factor superfamily, member 13	Superporodica čimbenika tumorske nekroze, član 13	razvoj limfocita B, poticanje apoptoze
TNFSF13B, tumor necrosis factor superfamily, member 13B	Superporodica čimbenika tumorske nekroze, član 13B	proliferacija, diferencijacija i aktivacija limfocita B
TNFSF14, tumor necrosis factor superfamily, member 14	Superporodica čimbenika tumorske nekroze, član 14	poticanje proliferacije limfocita T, apoptoze različitih tumorskih stanica
TNFSF4, tumor necrosis factor superfamily, member 4	Superporodica čimbenika tumorske nekroze, član 4	sudjelovanje u interakciji između limfocita T i antigen prezentirajućih stanica, adhezija aktiviranih limfocita T na žilne endotelne stanice
<b>Ostali citokini</b>		
ADIPOQ, adiponectin	Adiponektin	sudjelovanje u metaboličkim i hormonskim procesima, regulacija razine glukoze
FAM3B, family with sequence similarity 3, member B	Porodica sličnih sekvenci 3, član B	poticanje apoptoze alfa i beta stanica gušterače
SPP1, secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	Izlučen fosfoprotein 1 (osteopontin)	povećanje ekspresije IFN- $\gamma$ i IL-12

## 9. ŽIVOTOPIS

**Lana Gorenc** rođena je 16. listopada 1982. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu. Studij biologije, smjer molekularna biologija, na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2001. godine. Diplomirala je 2006. godine. Diplomski rad naslovljen „Polimorfizam monoaminooksidaze tipa B u zdravih muškaraca i žena“ izradila je u Laboratoriju za molekularnu neurofarmakologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr.sc. Nele Pivac.

Od 2007. do 2009. godine radila je kao Istraživač – molekularni biolog u PLIVA Hrvatska, Istraživanje i razvoj u Laboratoriju za molekularnu biologiju.

Od srpnja 2009. godine radi kao znanstveni novak u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu na znanstveno-istraživačkom projektu „Imunološka rekonstitucija i rezistencija na antiretrovirusne lijekove u HIV-bolesnika u Hrvatskoj“ pod vodstvom dr.sc. Snježane Židovec Lepej, znanstvene savjetnice. Iste godine upisuje Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Suradnica je na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Infectomics study of human liver non-parenchymal cells in chronic hepatitis C“, glavni istraživač prof.dr.sc. Adriana Vince.

Glavna područja interesa u znanstvenom radu su joj HIV, imunologija infektivnih bolesti, citokinska imunost.

U svrhu usavršavanja iz područja protočne citometrije 2010. godine prisustvovala je Flow Cytometry Course koji je održan na Sveučilištu u Yorku, Velika Britanija u organizaciji Royal Microscopical Society.

Dobitnica je stipendija Bill and Melinda Gates Foundation za sudjelovanje na kongresima: HIV Biology and Pathogenesis održanog 2010. godine u Santa Fe, New Mexico, SAD i Frontiers in HIV Pathogenesis, Therapy and Eradication održanog 2012. godine u Whistler, British Columbia, Kanada.

Članica je International Society for Infectious Diseases i European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

## **Znanstveni radovi**

### *Radovi u časopisima citiranim u Current Contents*

1. Kurelac I, Lepej SZ, Grgic I, Gorenec L, Papic N, Dusek D, Barsi B, Vince A. Chemokine CXCL10 at week 4 of treatment predicts sustained virological response in patients with chronic hepatitis C. J Interferon Cytokine Res. 2012; 32(8):386-91
2. Cavcic A, Tesovic G, Gorenec L, Grgic I, Benic B, Lepej SZ. Concentration gradient of CXCL10 and CXCL11 between the cerebrospinal fluid and plasma in children with enteroviral aseptic meningitis. Eur J Paediatr Neurol 2011; 15(6):502-7

### *Sažeci u časopisima citiranim u Current Contents*

1. Grgic I, Baca Vrakela I, Planinic A, Gorenec L, Zidovec Lepej S. Distribution of surveillance drug resistance mutations in different HIV-1 subtypes in newly-diagnosed untreated HIV patients in Croatia. Antiviral Therapy 2011; No. 120, XX International conference on HIV and Hepatitis virus drug resistance and curative strategies, 11.-17. lipanj 2011., Sheraton Hacienda del Mar, Los Cabos, Meksiko.
2. Grgic I, Gorenec L, Planinic A, Zidovec Lepej S. Late presentation to care remains a problem in Croatian nationwide cohort. STI & AIDS World Congress, 14.-17. srpanj 2013. Beč, Austrija

### *Sažeci u ostalim časopisima*

1. Gorenec L, Grgić I, Planinić A, Židovec Lepej S, Vince A, Begovac J. Učestalost neodređenih rezultata QuantiFERON-tb Gold testa u HIV-om zaraženih osoba. 3. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem. 2011., Opatija, Hrvatska
2. Grgić I, Židovec Lepej S, Žunec R, Planinić A, Gorenec L, Vince A, Begovac J. Detekcija HLA-B\*5701 u HIV-om zaraženih osoba i preosjetljivost na abakavir. 3. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem. 2011., Opatija, Hrvatska

3. Planinić A, Židovec Lepej S, Bolarić B, Vargović M, Grgić I, Gorenec L, Škerk V, Vince A. Detekcija DNK visokorizičnih genotipova humanih papilomavirusa standardiziranim PCR testom u stvarnom vremenu. 3. hrvatski kongres o urogenitalnim i spolno prenosivim infekcijama s međunarodnim sudjelovanjem. 2011., Opatija, Hrvatska
4. Gorenec L, Grgic I, Zidovec Lepej S. Soluble markers of cardiovascular risk in patients infected with human immunodeficiency virus: an association between monocyte chemoattractant protein 1 and tissue-type plasminogen activator concentrations and immune status. Inflammation and cardiovascular diseases summer school. 2011. Obergurgl, Austria
5. Gorenec L, Grgic I, Iscic-Bes J, Zidovec Lepej S. Multiplex bead based cytometry for analysis of soluble cardiovascular risk markers in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. Frontiers in HIV pathogenesis, therapy and eradication. 2012., Whistler, British Columbia, Kanada
6. Grgic I, Gorenec L, Planinic A, Zunec R, Zidovec Lepej S. Pharmacological screening for HLA-B\*5701 allele in HIV-1 positive individuals in Croatia. Frontiers in HIV pathogenesis, therapy and eradication. 2012., Whistler, British Columbia, Kanada
7. Planinic A, Grgic I, Gorenec L, Begovac J, Zidovec Lepej S. The prevalence and patterns of genotypic resistance to antiretroviral drugs in patients with virological failure from Croatia; 2008-2010. The 6th national HIV/AIDS congress. 2012. Sibiu, Rumunjska
8. Grgic I, Zidovec Lepej S, Planinic A, Gorenec L, Begovac J. The prevalence of HLA-B\*5701 associated with hypersensitivity to abacavir in HIV-1 positive individuals from Croatia. The 6th national HIV/AIDS congress. 2012. Sibiu, Rumunjska
9. Židovec Lepej S, Planinić A, Grgić I, Gorenec L, Begovac J. Molekularna heterogenost HIV-a u Hrvatskoj. 10. Hrvatski kongres kliničke mikrobiologije i 7. Hrvatski kongres o infektivnim bolestima CROCMID. 2013, Rovinj, Hrvatska
10. Gorenec L, Grgic I, Iscic-Bes J, Zidovec Lepej S. The expression of CD38 molecule on activated cytotoxic T-lymphocytes in HIV infection and EBV-induced infectious mononucleosis. The 6th EFIS/EJI South East European Immunology School. 2014, Timisoara, Rumunjska