

**Медицински Университет – София**  
**Медицински Факултет**  
**Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа**  
**медицина**

**СПЕЦИАЛИЗИРАНА БОЛНИЦА ЗА АКТИВНО ЛЕЧЕНИЕ ПО**  
**ИНФЕКЦИОЗНИ И ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ**  
**“ПРОФ.ИВ. КИРОВ“ЕАД – СОФИЯ**

**Усложнения на антиретровирусната терапия при ХИВ-позитивни**  
**пациенти**

**Д-р Нина Стоянова Янчева – Петрова**

Дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен  
„Доктор“

Научна специалност: Инфекциозни болести

Шифър 7.1. Медицина

**Научен ръководител**

**Проф.Д-р Татяна Червенякова, дмн**

**Съдържание:**

<b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....</b>	<b>4</b>
<b>ВЪВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>5</b>
<b>I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Антиретровирусна терапия.....</b>	<b>7</b>
1.1. Историческо развитие.....	7
1.2. Групи антиретровирусни медикаменти.....	11
1.3. Съвременни стратегии в терапията на HIV.....	20
<b>2. Витамин Д.....</b>	<b>21</b>
2.1. Структура, метаболизъм, функции.....	21
2.2. Проучвания при HIV-инфектирани пациенти.....	25
2.3. Некласически ефекти .....	30
2.4. Влияние върху имунитета.....	32
<b>3. Цитокини.....</b>	<b>33</b>
3.1. Основни характеристики.....	33
3.2. Цитокинов профил в хода на HIV – инфекция.....	33
3.3. Влияние на серумните нива на 25(OH)D върху цитокиновия профил.....	36
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....</b>	<b>39</b>
<b>III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....</b>	<b>40</b>
1. Изследвани пациенти.....	40
2. Методи	
2.1. Лабораторни методи.....	41
2.2. Методи за определяне на серумното ниво на 25(OH)D.....	42
2.3. Имунологични методи.....	43
2.4. Статистически методи.....	47
<b>IV. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>48</b>

<b>I.Оценка на влиянието на вида на провежданата антиретровирусна терапия върху основни лабораторни, някои имунологични показатели и серумни нива на 25(ОН)D.....</b>	<b>48</b>
<b>1.Възрастово разпределение на пациентите.....</b>	<b>48</b>
<b>2.Механизъм на инфектиране.....</b>	<b>50</b>
<b>3.Анализ след разделяне на пациентите по пол.....</b>	<b>50</b>
<b>4.Анализ след разделяне на пациентите по степен на имуноен дефицит.....</b>	<b>61</b>
<b>5.Анализ след разделяне на пациентите по серумни нива на 25(ОН)D.....</b>	<b>68</b>
<b>6.Анализ след разделяне на пациентите по прием и вид АРТ.....</b>	<b>72</b>
<b>7.Анализ след разделяне на пациентите и по пол, и по АРТ.....</b>	<b>84</b>
<b>8.Корелационни анализи.....</b>	<b>93</b>
<b>II. Изследване на цитокинов профил. ....</b>	<b>96</b>
<b>1. Разпределение на кръвните проби ....</b>	<b>97</b>
<b>2.Анализ на получените резултати.....</b>	<b>99</b>
<b>2.1. Анализ на данните за всички изследвани проби.....</b>	<b>99</b>
<b>2.2.Анализ на данните за пробите изследвани ex vivo.....</b>	<b>101</b>
<b>2.3.Анализ на данните за пробите, изследвани след стимулация.....</b>	<b>105</b>
<b>V.ОБСЪЖДАНЕ.....</b>	<b>112</b>
<b>VI. ИЗВОДИ.....</b>	<b>130</b>
<b>VII.ПРИНОСИ.....</b>	<b>132</b>
<b>VIII.ПУБЛИКАЦИИ                      ВЪВ                      ВРЪЗКА                      С</b>	
<b>ДИСЕРТАЦИЯТА.....</b>	<b>133</b>
<b>БИБЛИОГРАФИЯ.....</b>	<b>134</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>158</b>

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

**ART** - антиретровирусна терапия, **ARV** – антиретровирусни медикаменти

**ABC** – abacavir, **ATZ** – atazanavir, **AZT** – zidovudine

**CMV** - цитомегал вирус

**CROI** – конференция по ретровируси и опортюнистични инфекции

**ddC** - didanosine, **ddI** - didanosine, **d4T** - stavudine

**DHHS** – управление по здравеопазване на САЩ

**ELFA** - имуноензимен флуоресцентен анализ

**EFV** - efavirenz

**FI**s – фузеонни инхибитори

**FTC** - emtricitabine, **3TC** - lamivudine

**HAART** – Високоактивна антиретровирусна терапия

**HDAC** - инхибитори на хистондеацетилазата

**HIV** – Човешки имунодефицитен вирус

**IFN- $\gamma$**  – интерферон гама

**Is** – интегразни инхибитори

**IL** – интерлевкин

**MAC** - mycobacterium avium complex

**NNRTIs** – ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза

**NRTIs** – нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза

**NVP** – nevirapin

**PI**s – протеазни инхибитори

**RIA** - радиоимунологичен анализ

**RPV** - rilpivirine

**TDF** – tenofovir disoproxil fumarate, **TAF** - Tenofovir alafenamid

**TLR** - toll like рецептори

**Treg** - Т регулаторни клетки

**TNF- $\alpha$**  – туморнекротизиращ фактор алфа

**25(OH)D** – 25 – хидрокси витамин Д

## **ВЪВЕДЕНИЕ**

HIV-инфекцията продължава да бъде глобален проблем поради пандемичния си характер и невъзможност за пълно излекуване. Приблизително 35 млн. са инфектираните, като 1,34 млн. са починалите през 2013 г. Много от съвременните проучвания в тази област са стратегии за ерадикация на вируса. С тази цел се изследват различни методи като генна терапия, активиране на латентните клетки, приложение на цитокини, ранно започване на антиретровирусна терапия. До момента няма изработен терапевтичен модел за ерадикация на HIV.

В настоящето HIV инфекцията е превърната в хронично заболяване със значителна продължителност на живота на пациентите, при придържане към подходящата антиретровирусна терапия (АРТ). Дългосрочната терапия води до странични ефекти, които са резултат от натрупваща се митохондриална токсичност и оксидативен стрес. Това налага мониториране на основните лабораторни показатели и при необходимост смяна на терапевтичния режим.

Актуални проблеми са и персистиращата имунна активация и хроничното възпаление на фона на провежданата АРТ. Хроничното възпаление е причина за повишения риск от кардиоваскуларни заболявания, рак и преждевременно остаряване на HIV – инфектираните пациенти. С оглед на това се проучват различни фактори, които оказват влияние на вродения и придобития имунитет и респективно могат да повлияят хода на HIV – инфекцията. Един от тези фактори е витамин Д. По-подробно са анализирани ефектите му върху калциево-фосфорната обмяна и костния метаболизъм. Т.нар.“некласически“ ефекти на витамина са в процес на проучване при различни заболявания.

В настоящата работа си поставихме за цел да проследим и анализираме отклоненията в основни лабораторни, имунологични показатели и серумни концентрации на витамин Д, вследствие на провежданата дългосрочна

антиретровирусна терапия при HIV – инфектирани пациенти. Извършихме анализи свързани с възможното влияние на витамин Д върху биохимични и имунологични показатели на HIV – инфектирани пациенти. Резултатите от нашите анализи показваха, че дефицитът на витамин Д оказва влияние на имунната система и персистиращото хронично възпаление. Приложението му паралелно с ART терапия ще ни даде възможност да повлияем в положителна насока хода на HIV – инфекцията.

# **I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР**

## **1. АНТИРЕТРОВИРУСНА ТЕРАПИЯ**

### **1.1. Историческо развитие**

Развитието на АРТ бележи един от най-драматичните прогреси в историята на медицината. Ранните години на АРТ - от 1987 г. до 1990 г. носят голяма надежда, но не се установява съществен напредък (67,210). Резултатите от проучването Concorde за ефекта на монотерапията са негативни (46). AZT е първият антиретровирусен медикамент, тестван върху хора и одобрен за приложение през март 1987 г. Медикаментът не води до продължителен успех като монотерапия, което се установява и за следващите нуклеозидни аналози ddC, ddI, and d4T, въведени съответно между 1991 г. и 1994 г. (6,8,86). През м.септември 1995 г., резултатите от Европейско – Австралийското проучване DELTA (57) и Американското проучване ACTG 175 (77) показват, че комбинацията от два нуклеозидни аналога е по-ефективна от провежданата до момента монотерапия. В следващите няколко месеца започват и първите проучвания на нов клас антиретровирусни медикаменти (ARV) - протеазни инхибитори (PIs). Проучванията на първите три PIs - Ritonavir, Saquinavir и Indinavir, показват значителен успех, което води до бързото им одобрение (65,86). През месец февруари 1996 г., по време на 3-та Конференция по Ретровируси и Опортюнистични инфекции (CROI) във Вашингтон, Bill Cameron съобщава данни от проучването АВТ-247, които показват че добавянето на Ritonavir понижава честотата на смърт при СПИН от 38 % на 22 % (36). През м.юни 1996 г., на Световната Конференция по СПИН във Ванкувър се докладва нова комбинирана терапия за HIV, наречена високоактивна антиретровирусна терапия (highly active antiretroviral therapy - HAART). Междувременно са представени проучвания за кинетиката на HIV вируса (84, 152). Със знанията за високия търновър на вируса и значителната дневна деструкция на CD4 клетките се приема, че не е възможен живот без

провеждане на АРТ. За три години от 1994 до 1997 г., процентът на нелекуваните пациенти в Европа се понижава от 37 % на 9 %, докато процентът на пациентите на HAART нараства от 2 % на 64 % (100).

Третият клас ARV е въведен през юни 1996 г. с одобряването на първия нуклеозиден инхибитор на обратната транскриптаза (NNRTIs) - Nevirapine. За четири години между 1994 и 1998 г., заболяемостта от СПИН в Европа спада от 30.7 на 2.5/100 пациенти годишно. Значително намалява честотата на опортюнистичните инфекции CMV и MAC (131). На проведената конференция CROI през м.февруари 1998 г. е въведен нов термин - липодистрофия, състояние което е резултат от АРТ. В началото на 1999 г., в Холандия възниква нова хипотеза за причината за липодистрофия - митохондриална токсичност (32).

Съвременните терапевтични режими съществено се различават от тези при въвеждане на HAART. В настоящето има комбинирани медикаменти, съдържащи цял лекарствен режим и с еднократен прием за деня. По-новите класове медикаменти - CCR5-антагонисти и интегразни инхибитори, дават възможности за лечение както на нелекувани, така и на лекувани пациенти с изработена лекарствена резистентност. Догмата да се използват винаги два нуклеозидни инхибитора като основа на АРТ при започване на терапията, вече започва да се променя. Много от широко използваните медикаменти постепенно отпадат от терапията - HIVID, Agenerase, Fortovase, Viracept. Широко използваните през 90-те години ARV - d4T, ddI, Nelfinavir и Indinavir вече не присъстват в ръководствата за лечение на HIV - инфектирани пациенти.

Със съвременната АРТ продължителността на живота на HIV - позитивни не се различава съществено от тази на неинфектираните. Терапията обаче трябва да бъде непрекъсната. С увеличаване на познанията за АРТ, много от препоръките за провеждане на лечение се ревизират. Въпросът „кога да се започне“ все още е обект на основен дебат.

В настоящият момент има 28 одобрени ARV, групирани в зависимост от механизма си на действие в шест групи. Нови медикаменти с по-добър профил на резистентност (например Doravirine, нов NNRTI) или медикаменти с нов механизъм на действие (BMS663068 - инхибитор на прикрепването към CD4) са особено подходящи за пациенти с резистентни щамове. Модификации на съществуващи вече медикаменти целят намаляване на токсичността. Медикаментът TAF (Tenofovir alafenamid) е прекурсор на одобрения TDF (Tenofovir disoproxil fumarate), но при прекурсора се установява по-добра ефективност и липса на нефротоксичност, каквато е установена при TDF. В процес на проучване са инжекционни форми на медикаменти с дългосрочен ефект, например rilpivirine за интрамускулно приложение веднъж месечно. Инхибитори на матурацията са нов клас ARV, които са в процес на проучвания (86).

Целите на антиретровирусната терапия, определени от ръководството на US Department of Health and Human Services guidelines, включват редукция на HIV-свързаната заболяемост и смъртност, подобро качество на живот, възстановяване и запазване на имунната функция и контрол върху репликацията на HIV (86). Тези цели са достигнати, когато HIV-RNA е с пониска стойност от тази, която може да се определи с наличните диагностикуми. Днес този лимит е ниво на HIV-RNA < 20-50 copies/mL.

Антиретровирусните медикаменти одобрени до момента от US Food and Drug Administration (FDA) за лечение на пациенти с HIV са отбелязани в Таблица 1, а тези които в настоящия момент са включени в комбинирани таблетки са отбелязани в Таблица 2.

**Таблица 1. Антиретровирусни медикаменти, одобрени от FDA**

<b>NRTIs</b>	<b>PIs</b>	<b>NNRTIs</b>	<b>Fusion</b>	<b>Entry</b>	<b>Integrase</b>
--------------	------------	---------------	---------------	--------------	------------------

<b>Zidovudine</b>	<b>Saquinavir</b>	<b>Nevirapine</b>	<b>Enfuvirtide</b>	<b>Maraviroc</b>	<b>Raltegravir</b>
<b>Didanosine</b>	<b>Ritonavir</b>	<b>Delavirdine</b>		<b>Cenicriviroc</b>	<b>Dolutegravir</b>
<b>Stavudine</b>	<b>Indinavir</b>	<b>Efavirenz</b>		<b>Vicriviroc</b>	<b>Elvitegravir</b>
<b>Lamivudine</b>	<b>Nelfinavir</b>	<b>Etravirine</b>			
<b>Abacavir</b>	<b>Lopinavir/ritonavir</b>	<b>Rilpivirine</b>			
<b>Tenofovir</b>	<b>Atazanavir</b>				
<b>Emtricitabine</b>	<b>Fosamprenavir</b>				
	<b>Tipranavir</b>				
	<b>Darunavir</b>				

*Таблица 2. Одобрени комбинирани антиретровирусни препарати*

<b>Медикамент</b>	<b>Тип</b>
<b>AZT+3TC (Combivir)</b>	<b>Два NRTI</b>
<b>AZT+3TC+ABC (Trizivir)</b>	<b>Три NRTI</b>
<b>3TC+ABC (Kivexa, Epzicom)</b>	<b>Два NRTI</b>
<b>TDF+FTC (Truvada)</b>	<b>Два NRTI</b>
<b>EFV+TDF+FTC (Atripla)</b>	<b>NNRTI + два NRTI</b>
<b>TDF+FTC+RPV (Coplvera, Eviplera)</b>	<b>NNRTI</b>
<b>TDF+FTC+ELV/c (Stribild)</b>	<b>Boosted II+ два NRTI</b>

## **1.2. Групи антиретровирусни медикаменти - механизъм на действие и токсичност**

### **1.2.1.НУКЛЕОЗИДНИ ИНХИБИТОРИ НА ОБРАТНАТА ТРАНСКРИПТАЗА (NRTIs)**

Нуклеозидните аналози или инхибитори на обратната транскриптаза действат като алтернативни или лъжливи субстрати и се конкурират с физиологичните нуклеозиди. Отличават се от физиологичните нуклеозиди по малка модификация на рибозомната молекула. Внедряването на нуклеозидните аналози води до неуспешна синтеза на ДНК, като образуваните фосфодиестерните мостове са по-къси и не могат да стабилизират двойната верига. Нуклеозидните аналози се абсорбират непроменени и се активират след фосфорилиране до ефективни трифосфатни деривати. AZT (Zidovudine) и d4T (Stavudine) са тимидинови аналози, докато FTC (Emtricitabine) и 3TC (Lamivudine) са цитидинови аналози. DdI (Didanosine) е инозинов аналог, а ABC (Abacavir) е гуанозинов аналог. NRTIs са първите лекарства, използвани за лечение на HIV инфекция и повечето от терапевтичния опит е базиран на тях (19,20,25,31,46,56,57). Към тази група се отнасят и нуклеотидните аналози, които са монофосфати. Нуклеотиден инхибитор е TDF (Tenofovir disoproxil fumarate) (91).

NRTIs могат да причинят множество от дългосрочни токсични ефекти, като миелотоксичност, лактатна ацидоза, полиневропатия и панкреатит. Въпреки, че липодистрофията първоначално е свързвана основно с PIs, много от метаболитните нарушения и особено липоатрофията могат да се дължат на NRTIs (70). Страничните ефекти се дължат на митохондриална токсичност, която за първи път е описана през 1999 г. (32). Трифосфатите, получени след активиране на NRTIs, инхибират една човешка гама-полимераза. Тази полимераза е отговорна за репликацията на митохондриалната ДНК. Инхибирането ѝ води до намаляване на количеството митохондриална ДНК (108).

Развитието на митохондриална токсичност следва следните принципи (211):

1. Високите концентрации на NRTIs водят до тежка митохондриална токсичност, поради по-изразено намаляване на митохондриална ДНК. Терапевтичната доза на някои нуклеозидни аналози е близка до границата за възникване на токсичност.
2. Проявлението на митохондриална токсичност изисква време. Промените се наблюдават след определено изчерпване на митохондриалната ДНК. Продължителната употреба на NRTIs може да доведе до токсичност и при ниска концентрация на медикаментите.
3. Има значителни различия в потенциала на нуклеозидните и нуклеотидните аналози. Степента на инхибиране на гама-полимеразата от активните NRTIs метаболити е както следва: ddC (HIVID) > ddI (Videx) > d4T (Zerit) > 3TC (Epivir)  $\geq$  ABC (Ziagen)  $\geq$  TDF (Viread.)  $\geq$  FTC (Emtriva.).
4. Активният трифосфат на AZT е слаб инхибитор на гама-полимеразата. AZT може да причини изчерпване на митохондриалната ДНК и като инхибитор на митохондриалната тимидин киназа тип 2 (TK2), така се намесва в синтеза на пиримидинови нуклеотиди и уврежда образуването на митохондриална ДНК (122, 173).
5. Митохондриалната токсичност е тъканно специфична. Това се обяснява от факта, че приема на NRTIs в клетките и техните митохондрии, както и активацията чрез фосфорилиране е различна за различните клетъчни типове.
6. Може да има адитивна или синергична митохондриална токсичност при комбиниране на два или повече NRTIs.
7. Може да се увреди митохондриалната транскрипция без увреждане на митохондриалната ДНК (113,71). Механизмът и клиничната значимост на тази увреда не са напълно изяснени.

Митохондриалната токсичност в черния дроб е свързана с повишено отлагане на мазнини, което води до микро- или макровезикуларна стеатоза.

Стеатозата може да е съпроводена с повишена активност на чернодробни ензими. Наблюдава се стеатохепатит, който може да прогресира до чернодробна недостатъчност и лактатацидоза с потенциално фатален изход (103). Хепатотоксичност се наблюдава предимно при лечение с дидеоксинуклеозиди (ddI, d4T и ddC), но също и при лечение с AZT. Началото на чернодробното увреждане зависи от продължителността на лечение с NRTIs (211).

Проява на митохондриална токсичност е повишението на серумния лактат. Хиперлактатемията често е налице при продължително лечение с d4T особено, ако е в комбинация с ddI (38,174). В повечето случаи са увеличени и чернодробните ензими, докато серумните стойности на електролитите и бикарбонатите са нормални.

При лечение с високи дози AZT се развива миопатия (19). Стойностите на серумната креатинфосфокиназа са нормални или леко повишени. Продължителното лечение с дидеоксинуклеозиди често води и до полиневропатия, която е предимно симетрична, сетивна и дистална на долните крайници (133, 187).

Терминът липодистрофия обозначава преразпределението на мастите в човешкото тяло вследствие на провежданата АРТ. Някои пациенти развиват абнормно мастно натрупване в определени области на тялото (най-често корем и дорзоцервикален регион). Други пациенти развиват мастна загуба в областта на бузите, слепоочията и крайниците. Акумулацията и загубата на масти може да се случат едновременно в един и същи пациент. Загубата на масти, наречена липоатрофия е частично обратима и се развива не по-рано от една година след започването на HAART. Лечението с NRTIs може да увреди някои ендокринни функции на адипоцитите. Уврежда се секрецията на адипонектин и по този механизъм се развива инсулинова резистентност. d4T е доказан рисков фактор, но и други NRTIs като AZT имат аналогичен ефект (32,174,194).

Някои проучвания показват влиянието на NRTIs върху нивата на митохондриална ДНК в кръвта (50,129). Проявите на митохондриална токсичност върху лимфоцитите не е напълно изяснена. Установено е, че е отговорна за спад на броя на лимфоцитите при лечение с ddI (180).

Друга проява на митохондриална токсичност е безсимптомното повишение на серумната липаза. Развитието на панкреатит е рядко и се асоциира отново с приложение на ddI (119).

Продължителното лечение с дидеоксинуклеозиди води и до хиперурикемия (212). Митохондриалната дисфункция може да повиши образуването на лактат, който се конкурира с уратите за тубуларната секреция в бъбреците.

Нуклеотидният аналог TDF може да индуцира синдром на Fanconi с тубуларна загуба на фосфати и последваща остеомаляция (99,156,218). TDF се поема от реналните тубули чрез специален анионен транспортер. При синдрома на Fanconi се наблюдава повишени фосфати, аминокиселини и глюкоза в урината, при понижени фосфати в кръвта. Развитието на този синдром е средно 7 месеца след започване на терапията с TDF и изчезва четири до шест седмици след прекъсване на лечението (91).

AZT има миелосупресивен ефект (56). 5 до 10% от пациентите лекувани с AZT развиват анемия през първите три месеца на ART, а понякога след година от началото на терапията (38). При някои от пациентите като резултат от миелосупресивното действие на AZT се развиват левкопения, макроцитоза и тромбоцитопения (76,96). Левкопения може да се наблюдава и при лечение с TDF или ABC (86).

Хепатотоксичност е установена при лечение с AZT, ddI и HIVID (74).

### **1.2.2. НЕНУКЛЕОЗИДНИ ИНХИБИТОРИ НА ОБРАТНАТА ТРАНСКРИПТАЗА (NNRTIs)**

Таргетният ензим на тези медикаменти е обратната транскриптаза, както и при нуклеозидните аналози. NNRTIs се прикрепват директно и

неконкуретно към ензима на позиция в близост до свързващото място за нуклеозидите. Този процес води до свързването на по-малко нуклеозиди и забавя значително полимеризацията. За разлика от NRTIs, NNRTIs не изискват активиране вътре в клетките (45,92,93).

Първите три NNRTIs – Nevirapine (NVP), Delavirdine и Efavirenz (EFV) са въведени в употреба между 1996 г. и 1998 г. По-късно са въведени Etravirine и Rilpivirine (RPV) (181). Всички NNRTIs се метаболизират чрез цитохром р450 системата (86). NVP е индуктор, докато EFV е едновременно и индуктор, и инхибитор на р450. При приложение на NVP са наблюдавани тежки чернодробни увреждания, по-често отколкото при приложение на EFV. Хепатотоксичността, свързана с приложението на NVP се характеризира с повишение на чернодробните ензими и хепатоцитна некроза (62,63,168,190). Друго рандомизирано проучване обаче не установява хепатотоксичност при прием на NVP (161). Клинично изявената хепатотоксичност зависи от различни рискови фактори, като женски пол, BMI >18,5 (176) или коинфекция с хепатит С (195). По-висок риск за сериозно чернодробно увреждане е установена при пациенти с по-висок брой на CD4 клетки при започване на АРТ - за жени > 250 CD4 клетки / $\mu$ l, за мъже > 400 CD4 клетки / $\mu$ l (195). В указанията за провеждане на терапия с този медикамент изискването е да не се започва лечение при брой на CD4 клетки по-високи от посочените, въпреки, че тези данни не са потвърдени от други проучвания (115, 154). Бременността е свързана с по-висок риск от хепатотоксичност (150).

NNRTIs трябва да бъдат използвани с внимание при пациенти, коинфектирани с хепатит С и не трябва да се прилагат при пациенти с чернодробна цироза стадии по Child - Pugh клас В или С (145). Минимално увеличение на чернодробните ензими е наблюдавано и при лечение с EFV и RPV (93,132).

В над 40 % от пациентите, лечението с EFV може да доведе до странични ефекти от страна на ЦНС. Има връзка между високите плазмени нива на EFV и проявата на тези симптоми от страна на ЦНС (117). Странични ефекти от страна на ЦНС са възможни и при приложението на Etravirine и RPV (45,112).

### **1.2.3. ПРОТЕАЗНИ ИНХИБИТОРИ (PIs)**

С установяването на молекулярната структура на вирусната протеаза, в началото на деветдесетте години е синтезиран първият протеазен инхибитор (65). От 1995 г., протеазните инхибитори са включени в терапията на HIV инфекцията. С увеличаване на данните за митохондриалната токсичност на NRTIs и въвеждането на по-лесни за приемане PIs, този клас лекарства в настоящето е в процес на ренесанс. Прилагат се лекарствени режими на монотерапия с бустирани протеазни инхибитори за пациенти достигнали неопределим вирусен товар (86).

Всички PIs употребявани дълго време водят до различни по степен странични ефекти, свързани с липодистрофия и дислипидемия (140). Почесто промени в липидния профил се установяват при лечение с Lopinavir/ritonavir и Fosamprenavir/ritonavir в сравнение с останалите PIs (82,141,193). Друг доказан страничен ефект на PIs е увреждането на глюкозния метаболизъм. Проследяването на пациенти, лекувани с Indinavir, Ritonavir или Lopinavir/ritonavir показва ранни нарушения в глюкозния метаболизъм и инсулинова резистентност (82,193).

Всички PIs са инхибитори на CYP3A4 системата. Ritonavir е най-силният инхибитор, което позволява при употребата му заедно с други протеазни инхибитори да бъдат сигнификантно повишени най-важните им фармакокинетични параметри - максимална концентрация, продължителни нива и плазмен полуживот (97). Паралелното му приложение с други PIs с цел повишаване на тяхната концентрация се нарича бустирание. Бустиранието с Ritonavir също има рискове. С изключение на бустирания Atazanavir,

всички други бустирани комбинации водят до повишаване на липидните нива (202).

Atazanavir (ATZ) и Indinavir инхибират чернодробния ензим UDP глюкорозилтрансфераза, повишавайки нивата на общия билирубин при над 50 % от пациентите (196,200). Хипербилирубинемията не е свързана с прояви на хепатоцелуларно увреждане (75,157).

Tipranavir/r се свързва с по-висок риск за повишение на чернодробните ензими в сравнение с останалите PIs (81). Докладвани са дванадесет случая на чернодробно обусловена смърт на пациенти, лекувани с Tipranavir/r (39). Медикаментът трябва да бъде използван с внимание при пациенти, коинфектирани с хепатити и не трябва да се прилага при пациенти с чернодробна цироза стадии по Child - Pugh клас В или С (145).

ATZ и Indinavir причиняват нефролитиаза чрез екскреция на непроменените медикаменти в урината и понякога се наблюдават повишени стойности на креатинина (66).

#### **1.2.4.ИНХИБИТОРИ НА НАВЛИЗАНЕТО**

Има три решаващи стъпки за навлизането на HIV в CD4 клетките:

1. Свързване на HIV чрез gp120 повърхностен протеин към CD4 рецептор (таргет на инхибиторите на прикрепването)
2. Свързване към ко-рецептор (таргет на ко-рецепторните антагонисти)
3. Сливане на вируса и клетката (таргет на фузионните инхибитори).

Всичките три лекарствени класове, а именно инхибитори на прикрепването, ко-рецепторни антагонисти и инхибитори на фузията са обобщени като инхибитори на навлизането.

#### **Фузионни инхибитори (FIs)**

T-20 (Enfuvirtide, Fuzeon) е първият одобрен инхибитор на навлизането. Свързва се към една междинна структура на HIV gp41- протеин, която се появява по време на сливането на HIV с таргетната клетка (146). Проучванията TORO установяват повишена честота на лимфаденопатия и

бактериална пневмония при употреба на T-20 (199). Причината за повишената честота на инфекциите се предполага, че се дължи на свързването на гранулоцитите от T-20 и развитието на гранулоцитопения и еозинопения. Наблюдават се тежки локални кожни реакции в областта на инжектирането, тъй като медикаментът се прилага само подкожно.

### **Ко-рецепторни антагонисти**

При навлизането на HIV в таргетните клетки са необходими и т.нар. корецептори. Двата най-важни корецептора са CXCR4 и CCR5. Те са открити в средата на 1990 г. (34,58). Според рецепторният им тропизъм HIV вариантите се отбелязват като R5 и X4-вируси. Рецепторният тропизъм корелира със стадия на инфекцията (48). По-високият брой на CD4 клетките и по-ниският вирусен товар предполагат повече R5 вируси (34,134). CCR5 антагонистите са подходящи само за тези пациенти с R5 вируси, които използват CCR5 корецептор.

Maraviroc е първият одобрен CCR5 антагонист. Медикаментът може да се свърже с  $\alpha$  - рецептори, поради което специфичен страничен ефект, който се наблюдава е дозозависима ортостатична хипотония. Наблюдавани са и единични случаи на хепатотоксичност (123).

През октомври 2005 г., въвеждането на CCR5 антагониста aplaviroc е спряно, след съобщаване на няколко случая на тежка хепатотоксичност (188). От тогава всички CCR5 антагонисти се проследяват активно за възможна хепатотоксичност. Няма негативни данни съобщени за vicriviroc, но в края на 2005 г., Pfizer съобщават един случай на чернодробна недостатъчност с последваща чернодробна трансплантация при пациент, лекуван с maraviroc. Притеснителен факт е развитието на малигнен лимфом при някои от третираните пациенти (86).

### **Интегразни инхибитори (Ис)**

Развитието на този клас медикаменти започва от 2000 г., когато е установен принципът на интегразната инхибиция (79). Ензимът интеграза

участва в интеграцията на вирусната ДНК в генома на гостоприемника. Интеграцията на вирусната ДНК преминава през поне четири стъпки, всяка от които теоретично може да бъде инхибирана от различни интегразни инхибитори (136).

Raltegravir е първият одобрен интегразен инхибитор (или по-точно инхибитор на трансфера на веригата, STI). По химичен състав е нафтиридинкарбоксамид с широка ефикасност срещу R5 и X4 – тропни вируси (7). Токсични ефекти, които са наблюдавани при лечение с Raltegravir са миопатия, рабдомиолиза и невропсихиатрични отклонения (106). Elvitegravir е интегразен инхибитор, който по биохимичния си състав е подобен на хинолоновите антибиотици (177). Единичните дози имат добра бионаличност, сигурност и добра поносимост. Последният одобрен медикамент от тази група е Dolutegravir, при който е установена временна нефротоксичност. Наблюдава се повишаване на стойностите на креатинина в първите няколко седмици от лечението (86).

Редица проучвания установяват, че оксидативният стрес може да бъде основен фактор за токсичност при лечение с антиретровирусни медикаменти. Установяват се увредени антиоксиданти и антиоксидантни ензими при HIV - позитивни пациенти, лекувани с АРТ. Оксидативният стрес е термин използван, за да опише уврежданията причинени от кислородните радикали върху тъканите и органите. Към тях се отнасят хидроксилните радикали, пероксилните радикали, супероксиден анион, азотен оксид, пероксинитрит и водороден пероксид (160). Кислородните радикали предизвикват оксидация на протеини, ДНК, пероксидация на липиди и незабавна клетъчна апоптоза (118). Токсични ефекти като липодистрофия, миопатия, кардиомиопатия, анемия, лактатна ацидоза, панкреатит и полиневрит на фона на провеждана АРТ, могат да са резултат на оксидативен стрес (137). Някои проучвания представят оксидативния стрес като резултат от високоактивната АРТ с развитие на митохондриална

токсичност (73,114,118,192). Комбинации от медикаментите AZT, 3ТС и NVP или AZT,3ТС и EFV, водят до понижаване в серумното ниво на селений и повишена продукция на свободни радикали (21). Понижената глюкозо-медираната инсулинова секреция, която се установява при лечение с PIs също е резултат от оксидативен стрес (42). Някои проучвания доказват, че приложението на антиоксиданти може да облекчи страничните ефекти на АРТ, съдържаща протеазни инхибитори (26). Други автори доказват благоприятния ефект на антиоксидантите върху хода на HIV - инфекцията (89,127,222).

### **1.3. СЪВРЕМЕННИ СТРАТЕГИИ В ТЕРАПИЯТА НА HIV**

През 1997 г. са създадени математически модели, които изчисляват продължителността на вирусната супресия за приблизително три години. След този период се предполага, че всички инфектирани клетки ще загинат. Някои автори дават прогноза за ерадикация на тези клетки за 73.3 години (186). Цел на съвременната наука е откриването на средство за унищожаване на латентните резервоари.

Една от стратегиите за ерадикация на HIV - инфекцията е активирането на латентните клетки чрез стимулиране на тяхната репликация и експресия на вируса на повърхността им. Предполага се, че веднъж експресирали вируса, клетките ще бъдат разпознати от имунната система и ще загинат. До момента са изучавани няколко активатори на латентните клетки. Два от тези активатори стимулират ензима протеинкиназа - Prostratin (28,165) и Auranofin (109). Проучвани са и група медикаменти - инхибитори на хистондеацетилазата (HDAC), при употребата на които също се установява активация на латентните клетки – валпроева киселина, Vorinostat и др. (17,18,178).

Друга стратегия за ерадикация на инфекцията е ранно започване на АРТ в първите седмици или месеци след заразяване, което да предпази от образуване на вирусни резервоари (82).

На 18-та конференция CROI (2011) са представени данни за т.нар. генна терапия. Целта на тази терапия е модификация на гена, кодиращ CCR5 рецепторите на Т - клетките. По този начин се получава деструкция на корцепторите и навлизането на вируса в клетките става невъзможно (13).

Извършвани са проучвания за терапия с някои цитокини с цел активиране на паметовите CD4 клетки. Такива цитокини са IL-2, IL-6, IL-7, TNF и IFN- $\gamma$ . Изследванията показват, че лечението с тези цитокини е рисково, защото предизвиква активиране на прекалено много Т-клетки, което води до потенциално летален системен възпалителен отговор (94,128).

## **2.ВИТАМИН Д**

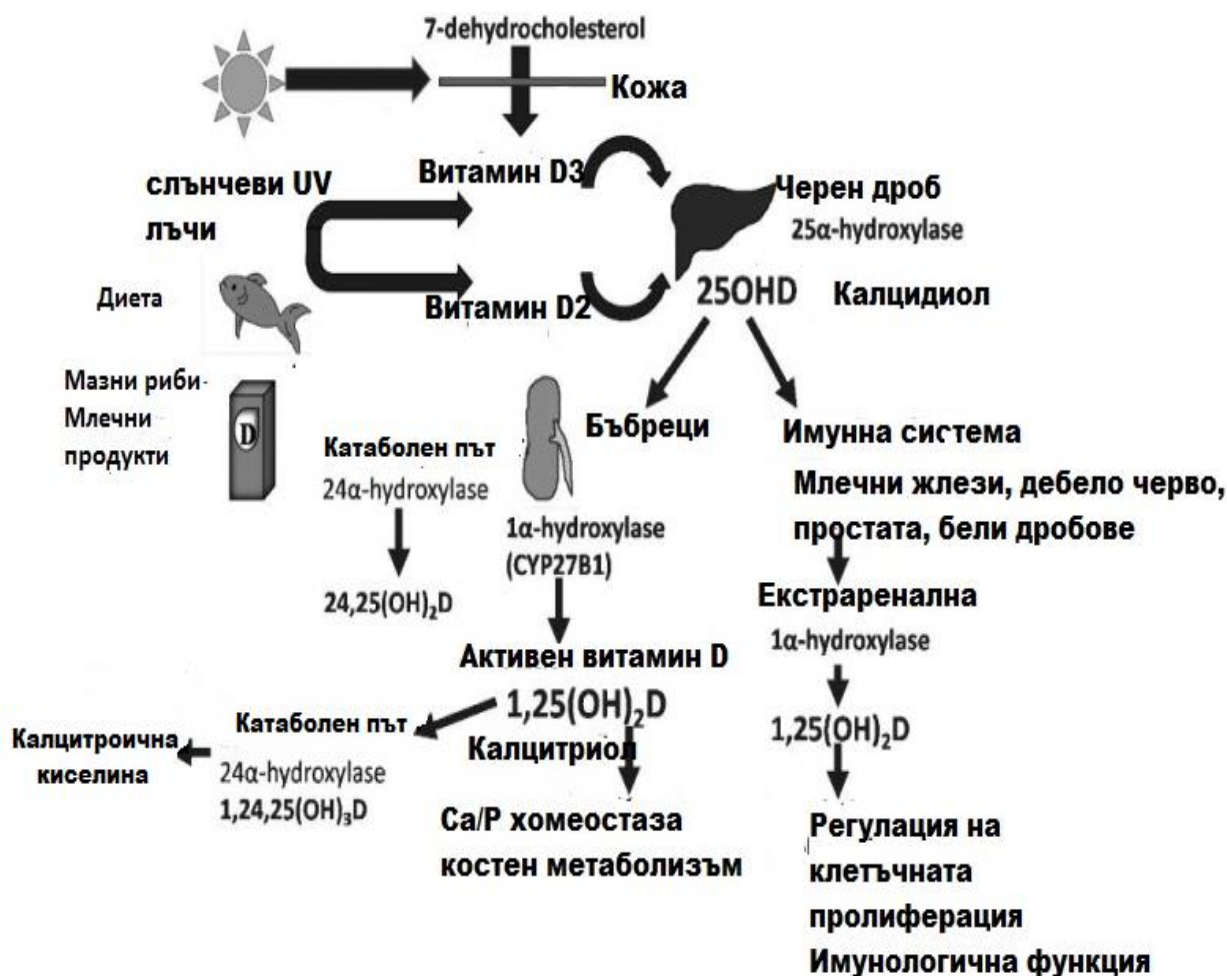
### **2.1. Структура, метаболизъм, функции**

Витамин Д е открит през 1921 г. Той е установен като съставка на рибеното масло от черен дроб на треска и е използван за лечение на рахит. През 1930 г. е установена структурата на неговите метаболити. Дълго време след откриването му е проучвана неговата роля в калциевия метаболизъм и превенцията на костните заболявания. Витамин Д стимулира чревната абсорбция на калций и фосфора, активира костната резорбция и минерализация и подобрява мускулната сила. Различни проучвания показват, че е от значение и за нормалното функциониране на мозъка, бъбреците, кожата и имунната система (2,5,85).

Витамин Д е генерично название, което се използва за сумарно обозначаване на витамин Д2 (ergocalciferol) и витамин Д3 (cholecalciferol). Двата витамина се метаболизират по аналогичен начин и отразяват цялостния витамин Д статус на организма. Прието е да бъде обозначаван като 25(OH)D. 10-20 % от необходимото количество 25(OH)D може да се осигури с хранителни продукти. Основната продукция на 25(OH)D се извършва в кожата, където ултравиолетовите слънчеви лъчи трансформират 7-дехидрохолестерол в превитамин Д. Той от своя страна се превръща във

витамин Д чрез една неензимна термична изомеризация. След това се метаболизира в черния дроб до 25(OH)D чрез 25 $\alpha$ -хидроксилаза, впоследствие 25OHD се превръща в биологично активното химично съединение 1,25(OH)2D от ензима 1 $\alpha$ -хидроксилаза (или CYP27B1) (5). Ензимът 1 $\alpha$ -хидроксилаза предимно се експресира в бъбреците и някои извънбъбречни тъкани, като моноцити и макрофаги (фиг.1).

В бъбреците активността на 1 $\alpha$ -хидроксилазата се контролира от сигналите на калциевата хомеостаза, особено от паратиреоидния хормон (PTH), който се освобождава от парашитовидните жлези при хипокалциемия. 25(OH)D отговаря на ниските нива на калций като стимулира остеокластите да освободят калций от костите, повишава интестиналната калциева абсорбция и понижава бъбречната екскреция на калций. За да прояви своите функции 25(OH)D взаимодейства със съответния рецептор, който е експресиран от голям брой органи, включително мозък, мускули, мастна тъкан, панкреас, дебело черво, млечни жлези и имунни клетки.



Фиг.1 Метаболизъм на 25(OH)D ( М. Pinzone *et al.* )

Активацията на рецепторите за 25(OH)D е отговорна за т.нар. неklasически ефекти на витамин Д (29). Няколко проучвания установяват връзката между серумното ниво на 25(OH)D и някои автоимунни заболявания, захарен диабет 1 тип, кардиоваскуларни заболявания, рак и инфекции (30). В тази връзка установено е, че 25(OH)D е важен медиатор и на вродения, и на придобития имунни отговори. Рецепторът за 25(OH)D се експресира не само на антигенпредставящите клетки – макрофаги и дендритни клетки, но също и на Т и В лимфоцитите.

Сумарното определяне на двете форми на 25(OH)D (25OHD<sub>2</sub>+25OHD<sub>3</sub>) представлява оптимален показател за оценка на витамин Д дефицитните състояния. За дефиниране на достатъчно или оптимално ниво на 25(OH)D се използват няколко критерия (2,3,5):

- нивото на 25(OH)D, необходимо за оптимална супресия на циркулиращия паратхормон (PTH)
- нивото на 25(OH)D, необходимо за максимална абсорбция на калций в червата
- нивото на 25(OH)D, необходимо за постигане на най-висока костна минерална плътност
- нивото на 25(OH)D, необходимо за постигане на най-малка костна загуба
- нивото на 25(OH)D, необходимо за намаление на фрактурите

Много спорове има около класификацията на статуса на 25(OH)D. Последният Консенсус препоръчва според нивото на 25(OH)D, състоянията да се делят на три нива : дефицит на 25(OH)D се приема при праг <25 nmol/l (10 ng/ml), а недостатъчност при серумно ниво в границите 25-49,99 nmol/l (10-30 ng/ml). В изнесените данни от Bischoff-Ferrari на консенсусната конференция през 2012 г., освен посочените по-горе стойности за недостатъчност и дефицит, се приема и ниво на достатъчност >50 nmol/l (>30 ng/ml) (30).

Нивата на 25(OH)D зависят от пола, расата и възрастта. В много страни са проведени изследвания върху популационния статус на 25(OH)D или върху отделни рискови групи от населението. В България също е проведено такова проучване през 2012 г., като са изследвани 2032 лица (2). Според това проучване 75,8% от изследваните са с дефицит или недостатъчност на 25(OH)D. Основните фактори, влияещи на серумните нива на 25(OH)D установени при това проучване са:

- пол - жените имат по-често и по-тежък дефицит на витамин Д в сравнение с мъжете
- стил на живот - по-рисков е живота в замърсения град, работа на закрито, тип хранене
- фактори на околната среда - запрашеност, смог, околна температура, брой слънчеви дни в годината
- възрастта е най-слаб фактор

На базата на това проучване са създадени препоръки за профилактични дневни дози на 25(OH)D и терапевтични за лечение на хиповитаминоза Д (2,3).

## **2.2. Проучвания за серумни нива на 25(OH)D при HIV-инфектирани пациенти**

Редица международни проучвания анализират серумните нива на 25(OH)D при HIV-инфектирани пациенти. Резултатите показват, че при тези пациенти са по-чести състояния на недостиг и дефицит (12,23,131,135,182,206,207). HIV-инфектираните пациенти на средна възраст са в риск за различни заболявания, типични за възрастната популация, включващи метаболитен синдром, остеопороза, инсулинова резистентност, диабет, кардиоваскуларни заболявания и когнитивни нарушения. Много от тези нарушения са свързани и с понижени серумни нива на 25(OH)D.

Проучванията за серумните нива на 25(OH)D при HIV-инфектирани пациенти установяват противоречиви данни както по отношение на честотата на дефицит и недостиг на 25(OH)D при HIV-инфектирани сравнено с общата популация, така и за значимостта на влиянието на различни фактори.

Едно от първите по-мощни проучвания за нивото на 25(OH)D при HIV-инфектирани пациенти е проучването SUN - проспективно кохортно проучване на 700 пациенти в четири града в САЩ. Проучването е проведено

през периода март 2004 г. до юни 2006 г. (41). Участниците са HIV-инфектирани без придружаващи заболявания. Част от изследваните пациенти са наивни (т.е. нелекувани) за АРТ, а другата част провеждат такава терапия. Резултатите показват, че 70.3% от изследваните са с недостиг или дефицит на 25(OH)D. Тези резултати са сравнявани с нивата на 25(OH)D за общата популация в САЩ. Изследването на общата популация е провеждано преди проучването SUN и се нарича National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). При него дефицит или недостиг на 25(OH)D са в 79.1% от общата изследвана популация. Сред общата американска популация дефицитът или недостигът на 25(OH)D са еднакви сред мъже и жени (79% за двата пола). Докато в проучването SUN, недостиг или дефицит на 25(OH)D е по-чест при жените – 80%, срещу 69% при мъжете. Изследователите установяват статистическа достоверност за следните фактори, свързани с по-ниски серумни нива на 25(OH)D: женски пол, възраст, черна раса, испански етнос, ниска експозиция на слънце, хронична HBV и HCV коинфекции, гломерулна филтрация  $>90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ , хипертония и лечение с EFV. При пациенти, които са на АРТ е установен по-висок процент на дефицит или недостиг на 25(OH)D, в сравнение с наивните пациенти. При по-продължително лечение с EFV и TDF е установен по-висок процент на дефицит или недостиг. Имунните параметри като максимален брой на CD4 клетките и диагноза СПИН според авторите нямат сигнификантна връзка с дефицита или недостига на 25(OH)D. По-висока експозиция на светлина, гломерулна филтрация  $90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  и лечение с Ritonavir са независимо свързани със сигнификантно по-ниски проценти на дефицит и недостатъчност на 25(OH)D. Изводите от това проучване са, че при HIV - инфектираните пациенти, процентът на тези с недостиг или дефицит на 25(OH)D е малко по-нисък в сравнение с останалото население в САЩ, но със сигнификантни

различия според пол, възраст, раса и приложение на АРТ и конкретно EFV и TDF.

Друго проучване на HIV – инфектирани, което също не установява по-висока честота на 25(OH)D дефицит или недостиг, в сравнение с общата популация е едно съвременно италианско проучване на 810 HIV-инфектирани пациенти. Изследователите установяват недостиг на 25(OH)D само при 47% от изследваните пациенти, а при 6% дефицит. Авторите намират обаче сигнификантна връзка между недостига на 25(OH)D и по-бърза прогресия на HIV инфекцията, повишен риск от кардиоваскулаторно заболяване, захарен диабет и бъбречно заболяване при средна продължителност на проследяване 6.5 години (206).

Подобни резултати за серумните нива на 25(OH)D са установени и в Швейцарската кохорта HIV-инфектирани (135).

По-голяма част от проучванията обаче сред HIV – инфектирани, показват по-висока честота на 25(OH)D недостиг и дефицит, в сравнение с общата популация.

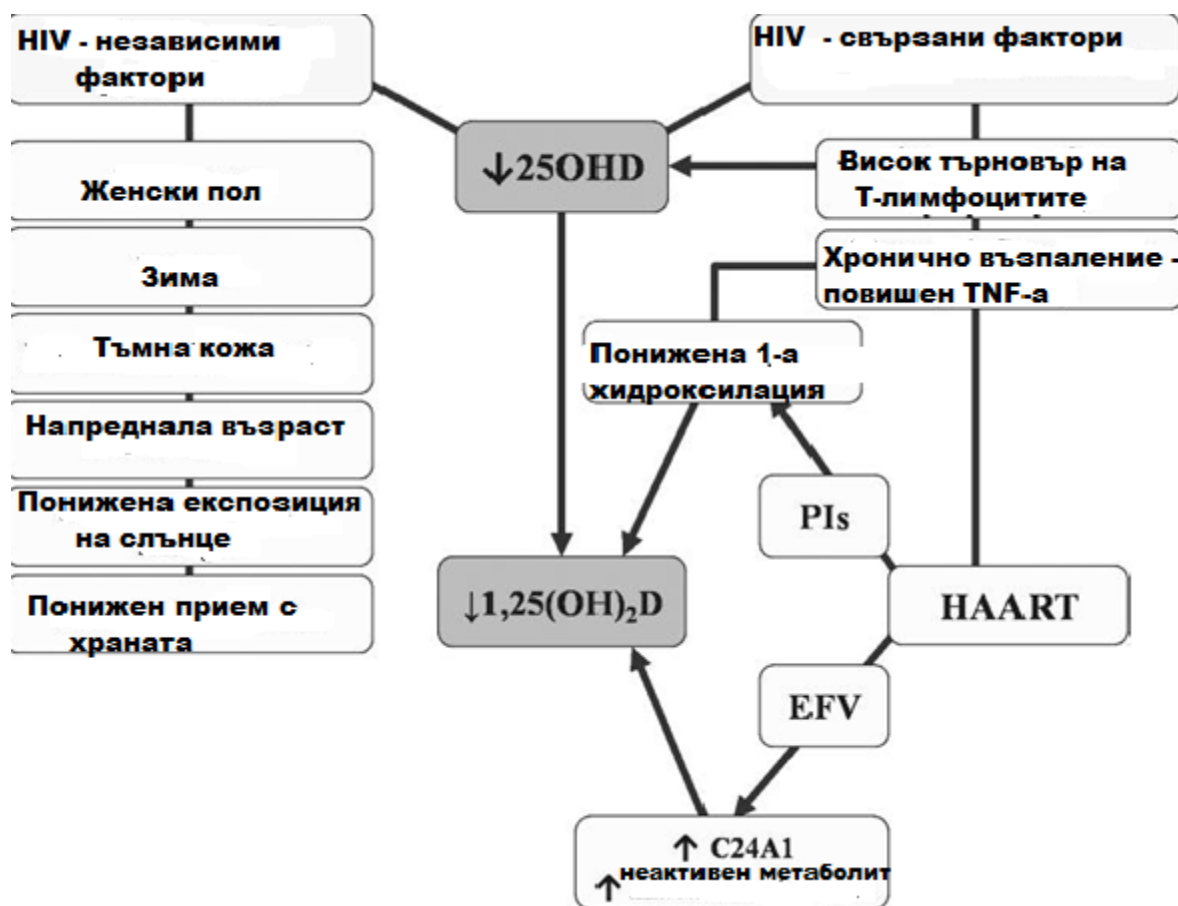
Проучването EuroSIDA е проспективно проучване на голяма кохорта HIV-позитивни пациенти от 31 Европейски страни, Израел и Аржентина. Резултатите от това проучване показват, че хиповитаминоза Д е по-често срещана сред HIV-позитивни. 23.7% от изследваните пациенти са с дефицит - нива на 25(OH)D под 10 ng/ml, 65.3% с недостиг - стойности между 10 и 30 ng/ml и само 11% имат стойности над 30 ng/ml. Изследователите установяват сезонни различия - по-висок процент на хиповитаминоза Д през зимата в сравнение с лятото. Аналогично на общата популация при по-възрастните пациенти е установен по-висок риск за хиповитаминоза Д. При представителите на черната раса са измерени по-ниски серумни нива на 25(OH)D. Важен извод от проучването е че хиповитаминоза Д е свързана с по-висок риск от СПИН дефиниращи заболявания и всички причини за смъртност (131,182,207).

Във Френската кохорта от 2994 HIV - позитивни пациенти се установяват ниски нива на 25(OH)D при 86.7% от изследваните, като 55.6% са с недостиг, а 31.1% с дефицит (12). Проучвания във Великобритания докладват, че 91% от 1077 HIV - позитивни имат по-ниски от нормалните серумни нива на 25(OH)D, като повече от една трета са с дефицит (25(OH)D (214).

Оценката на рисковите фактори за хиповитаминоза Д при HIV - инфекция включва оценка на HIV - специфичните и HIV - независими рискови фактори (фиг.2). Някои рискови фактори като женски пол, зимен сезон, възраст, диета бедна на витамин Д и тъмен цвят на кожата са подобни на тези докладвани при HIV-негативните кохорти.

Повечето автори описват положителна зависимост между Афро-Американски етнос и ниски нива на 25(OH)D (41,131,182,207). При тъмнокожите хора кожната синтеза е значително понижена и е необходима по-значителна експозиция на ултравиолетови слънчеви лъчи, за да се произведе същото количество на 25(OH)D в сравнение с бялата раса. Противоречиви данни има по отношение на връзката между body mass index (BMI) и стойностите на 25(OH)D. Както при общата популация някои автори намират отрицателна корелация между серумните нива на 25(OH)D и BMI, вероятно поради складирането на 25(OH)D в мастната тъкан. При други проучвания е установено точно обратното - хиповитаминоза Д се свързва с нисък BMI, респективно при недостиг на 25(OH)D е налице висок риск от отслабване, дефинирано като BMI по-малък от 18 kg/m<sup>2</sup> (12,23).

Взаимовръзката между серумните нива на 25(OH)D и броя на CD4+ Т-клетките не е ясна. Някои проучвания описват положителна корелация (189), други проучвания не установяват сигнификантни зависимости (172).



Фиг.4 Рискови фактори за хиповитаминоза Д при HIV – инфекция ( M. Pinzone *et al.* )

Няколко *in vitro* и *in vivo* изследвания оценяват влиянието на антиретровирусните медикаменти върху метаболизма на 25(OH)D. Резултатите показват, че и двата класа ARV – PIs и NNRTIs увреждат метаболитните пътища на 25(OH)D. Протеазните инхибитори инхибират 25(OH)D 1 $\alpha$ - и 25 $\alpha$ -хидроксилация в хепатоцитните и моноцитни клетъчни линии. Това понижава превръщането на 25(OH)D в неговите активни метаболити (33,54). От групата на NNRTIs има значително количество данни за връзката между медикамента EFV и нарушената хомеостазата на 25(OH)D (12,47,131). EFV води до понижаване на катаболизма на 25(OH)D чрез индукция на CYP24 и понижаване на транскрипцията от една 25-хидроксилаза - CYP2R1. При лечение с друг нуклеозиден инхибитор - Nevirapine (NVP) не се установява такава връзка със серумните нива на

25(OH)D (214). Резултатите от едно проучване, включващо 262 пациенти показват, че серумните нива на 25(OH)D са по-високи при пациенти, лекувани с NVP и PIs, в сравнение с тези, които са на лечение с EFV (68). Аналогични резултати установяват и във френската кохорта - дефицитът на 25(OH)D е свързан с приложение на EFV (12). Други автори също докладват сигнификантен спад в нивата на 25(OH)D в серума след започване на EFV-базиран режим, в сравнение с не-EFV базиран режим (33). Италианско проучване установява трикратно по-висок риск да се установят серумни нива на 25(OH)D < 20 ng/ml сред пациенти, лекувани с NNRTIs 12 месеца след стартиране на HAART (47).

В проучването MONET, в което пациенти с трайна вирусна супресия са превключени на Darunavir-базирани режими, по-ниските базисни нива на 25(OH)D са свързани с употребата на EFV и AZT. Изследователите отчитат повишение с 27% в стойностите на 25(OH)D при пациенти, които прекъсват EFV (68).

Холандско проучване съобщава данни за по-високи серумни нива на 25(OH)D при бели пациенти, получаващи PIs в сравнение с тези, получаващи NNRTIs или нелекувани (наивни) пациенти (201). В кохортата на EuroSIDA пациентите получаващи PIs-базирани антиретровирусни режими били с по-нисък риск от хиповитаминоза Д, като била установена сигнификантна връзка с употребата на EFV или TDF (131,182,207).

### **2.3. Некласически ефекти на витамин Д**

Връзката между ниските нива на 25(OH)D и много хронични заболявания, които преобладават сред HIV - позитивни пациенти, изисква рутинен скрининг за дефицит на 25(OH)D. В общата популация дефицитът на 25(OH)D има положителна корелация с повишен кардиоваскулаторен риск. Имайки предвид широкото разпространение и на двата фактора сред HIV-позитивни - хиповитаминоза Д и кардиоваскулаторни заболявания, няма да е изненадващо предположението, че има връзка между ниските

серумни нива на 25(OH)D и степента на атеросклероза сред HIV - позитивни. Резултатите от няколко проучвания показват независима връзка между ниските серумни нива на 25(OH)D и дебелината на интимата на каротидната артерия (carotid intima-media thickness - cIMT), която е общ маркер за атеросклеротична съдова болест (171,172,213).

Традиционни рискови фактори за кардиоваскуларно заболяване са инсулиновата резистентност и захарния диабет. Те се установяват по-често при HIV-инфектирани пациенти, сравнено с общата популация. Един от т.нар. „некласически“ ефекти на 25(OH)D е върху инсулиновата секреция и серумната глюкоза (29,30). Резултатите от едно cross-sectional проучване, показват ниски серумни нива на 25(OH)D сред пациенти с 2 тип диабет, сравнено с пациенти без диабет (43). И в двете групи е установен дефицит на 25(OH)D, независимо свързан с наличие на диабет, но не и на метаболитен синдром. 25(OH)D участва в регулацията на инсулиновата секреция и инсулин-медирания транспорт на глюкоза, което обяснява горните резултати. При пациенти с диабет, но без HIV - инфекция приложението на витамин Д води до намаляване на инсулиновата резистентност (43,90,130,159). При пациенти с HIV няма достатъчно данни в тази насока. Едно малко проспективно проучване показва, че суплементацията с холекалциферол (2000 IU/дневно за 14 седмици, 1000 IU/дневно до 48 седмици) води до повишена инсулинова резистентност, оценена с индекс НОМА и повишени нива на кръвна глюкоза на гладно, измерени на 24 - та седмица. Не се установяват различия след 48 - та седмица. Авторите обясняват този резултат с инхибиращия ефект на 25(OH)D върху експресията на PPAR- $\gamma$  рецептор. Активирането на PPAR- $\gamma$  пътя води до повишена инсулинова чувствителност (201).

Съвременни проучвания установяват зависимост между хиповитаминоза Д и повишени възпалителни маркери при HIV-инфектирани. Установена е корелация между тежък дефицит на 25(OH)D и повишени стойности на CRP

и IL-6 в кохорта от 263 HIV-инфектирани пациенти (14). Подобни данни съобщават и други автори, които установяват, че по-висок риск от възпаление (CRP > 3 mg/l) е налице сред HIV-позитивни пациенти със серумни нива на 25(OH)D < 20 ng/ml (72).

#### **2.4. 25(OH)D и имунитет**

In vitro и in vivo проучвания показват ролята на 25(OH)D като важен компонент на вродения имунитет. Установени са рецептори за 25(OH)D в различни клетки на миелоидната и лимфоидната тъкан. Активната форма на 25(OH)D - 1,25(OH)<sub>2</sub>D, повишава продукцията на ендогенни антибиотици, наречени антимикробни пептиди в човешките моноцити, неутрофили и епителни клетки. Установена е ролята на 25(OH)D в активиране на автофагия в човешките макрофаги, която участва в потискането на репликацията на HIV. Стимулацията на специфичните рецептори TLR, участващи в 25(OH)D-зависимия вътреклетъчен обмен води до експресия на антимикробният пептид Cathelicidin, който повишава микробната способност на моноцитите (110).

Дефицитът на 25(OH)D оказва влияние на CD8 T-клетъчния имунитет върху острите вирусни и бактериални инфекции (223). При HIV-инфектирани пациенти вирусът персистира в дългоживеещите клетки, включително латентни T-клетки, макрофаги и дендритни клетки. Като задължителен вътреклетъчен паразит неговото оцеляване зависи от способността му да избягва фагоцитозата. Физиологичните стойности на 25(OH)D инхибират репликацията на HIV чрез индукция на автофагия в човешките макрофаги. В процеса на автофагия основна роля има рецепторите TLR (Toll-like receptors). Участието на 25(OH)D в имунния отговор се осъществява чрез тези рецептори. TLR стимулацията на човешките макрофаги индуцира ензимът 1- $\alpha$ -хидроксилаза, който катализира превръщането на 25(OH)D в активния му метаболит (110).

Според друго проучване 25(OH)D стимулира превръщането на нормалните моноцити до макрофаги, както и диференцирането на прекурсорите в костния мозък. Стимулацията на моноцитите от 25(OH)D индуцира клетъчната диференциация, но не индуцира експресията на HIV. Това показва дисоциация между клетъчната диференциация и вирусната експресия (85). Същото проучване установява и, че ефекта на 25(OH)D върху вирусната експресия е свързан с наличния цитокинен профил. 25(OH)D усилва експресията на HIV в присъствието на TNF- $\alpha$ , но инхибира вирусната експресия в присъствието на IFN- $\gamma$  и IL-6.

### **3.ЦИТОКИНИ**

#### **3.1. Основни характеристики**

Цитокините са нискомолекулни регулаторни белтъци, секретирани от различни видове клетки - макрофаги, В-лимфоцити, Т-лимфоцити и мастоцити, ендотелни клетки, фибробласти и различни стромални клетки. Цитокините се свързват със специфични рецептори на мембраните на таргетните клетки, при което се включва определен сигнален път, който променя генната експресия в клетката. Цитокините регулират интензитета и продължителността на имунния отговор, като стимулират или инхибират активността, пролиферацията и/или диференциацията на различни клетки и като регулират секрецията на други цитокини или на антитела. По този начин цитокини, секретирани дори от малък брой лимфоцити, активирани от антиген, могат да повлияят активността на голям брой клетки, свързани с имунния отговор (87,94,97,28). Цитокините водят до повишен оксидативен стрес, което ги прави важни участници в хроничното възпаление (IL-1,6,12, INF-a) (16).

#### **3.2. Цитокинов профил в хода на HIV-инфекция**

В ранните етапи на HIV-инфекция се наблюдават значителни нарушения в цитокиновите взаимодействия. Според някои автори балансът

между вирусните супресори (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  и IL-10) и вирусните индуктори (IL-6, IL-15, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ ), определя интензитета на вирусна репликация. Установено е значително начално повишение на TNF- $\alpha$  и IL-10. Съотношението между вирусни индуктори и супресори при диагностициране на HIV - инфекция, може да се използва като прогностичен фактор за хода на инфекцията (142). В проучвания на първичната HIV-инфекция се установява, че при повишени плазмени нива на проинфламаторните цитокини е налице висок вирусен товар и може да се предвиди времето, за което броя на CD4+ Т клетките ще падне под 350 cells/mm<sup>3</sup>. Увеличава се броят на клетките, произвеждащи IFN- $\gamma$  и концентрацията му в серума, докато концентрацията на IL-4 произвеждащите клетки и количеството на този цитокин в серума са понижени (169). Едно кохортно проучване на проституиращи жени с висок риск за инфектиране с HIV установява, че след инфектиране високи концентрации на IL-12 и IFN- $\gamma$  са свързани с по-нисък вирусен товар (VL <50 000 с/μl), а високи концентрации на IL-15 и IL-7 с висок вирусен товар ( VL >100000 с/μl ) и с бърз спад на броя на CD4 клетките. Авторите съобщават за значително увеличение на IL-1, IL-2 и IL-7 на шестата седмица след инфектиране с HIV (198).

Проучвания при нелекувани HIV-позитивни пациенти установяват, че IL-10 и IL-15 индуцират NK клетките и активността им срещу HIV (219). Установяват се също така високи концентрации на TNF- $\alpha$  в групите на типичните и бързите прогресори, за разлика от групата на дългосрочните nonпрогресори. Експресията на Th1 цитокини и концентрацията на Th1 клетки били по-ниски при типичните прогресори, отколкото в другата група. Това показва, че дългосрочните nonпрогресори поддържат контрол на прогресията на инфекцията чрез по-слабо активиране и съхраняване на Th1 клетките.

Според много автори персистиращото хронично възпаление и имунната активация са фактори определящи заболяемостта, болестността и смъртността, несвързана със СПИН, даже и при провеждане на ефективна АРТ (16,69,86).

Данните за влиянието на АРТ върху концентрацията на плазмените цитокини не са еднозначни. Според някои проучвания плазмените концентрации на IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-12 намаляват след шестмесечно антиретровирусно лечение, но продължават да са по-високи от тези на контролната група. Също така се установява обратнопропорционална връзка между броя на CD4+ клетките и стойностите на IL-10 преди и 6 месеца след започване на АРТ (191). Друго проучване потвърждава ролята на високите плазмени концентрации на IL-10 за по-бавната прогресия на инфекцията (208). Плазмените концентрации на IL-2 на пациенти, инфектирани с HIV и лекувани с АРТ, остават ниски даже години след началото на терапията, докато тези на IFN- $\gamma$  са по-високи от контролната група (94,126). Други автори наблюдават дисбаланс между Th1 и Th2 с преобладаване на Th2-цитокинен профил в късните стадии на HIV – инфекция (142,169,179,217). В хроничната фаза на HIV инфекцията и прогресия към СПИН се установява понижаване на IL-2 и IFN- $\gamma$  и повишаване на IL-4 и IL-10. Установява се зависимост между развитието на СПИН–свързани заболявания и концентрациите на възпалителни маркери като IL6, високоспецифичен С-реактивен протеин и D-димер (53). Тези маркери се задържат повишени, години след започване на ефективна АРТ. Различията в проучванията за плазмените нива на цитокините се дължат на влиянието на различни фактори. Такива фактори са започване на АРТ при напреднал имуноен дефицит, напреднала възраст, нисък минимален брой на CD4 клетките (надир), остатъчна вирусемия от клетъчните резервоари и лошо придържане към терапията. Според някои автори при прогресия на заболяването нивата на TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  и IL-8, са значително по-високи

в пациентската група с брой на CD4 клетки по-ниски от 200/ mm<sup>3</sup> (83,84). Анализи на цитокиновия профил при висока вирусна вирусемия след прекъсване на лечението, показват значително повишени стойности на IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-10. Установява се корелация между повишаването на вирусния товар при прекъсване на терапията, спадането на броя на CD4 клетките и повишена продукция на IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-10 (53).

Съотношението между нивата на вирусни супресори и индуктори още през ранната фаза на заболяването дава информация за бъдещия ход на заболяването. Високи плазмени нива на IL-6, IL-7, IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  предполагат по-бърза прогресия на инфекцията, респективно високите концентрации на IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  и IL-10 по-бавна. АРТ индуцира качествени и количествени промени в цитокиновия профил. Важен е балансът между отделните цитокини. Ограничаването на възпалението може да допринесе за подобряването на клиничните резултати. Високите плазмени нива на IL-4, IL-8, IL-17, IL-18 също корелират с висока вирусна репликация, хронично възпаление и прогресия на заболяването. Високите концентрации на IL-12, IL-15 и IFN- $\gamma$  предполагат по-благоприятен ход на заболяването.

### **3.3. Влияние на серумните нива на 25(OH)D върху цитокиновия профил**

*In vitro* проучвания показват, че серумните нива на 25(OH)D влияят на цитокиновия профил в организма. Установено е, че 25(OH)D може да инхибира продукцията на проинфламаторни цитокини - IL-17, IFN- $\gamma$  и IL-6 (223,224).

Проучванията сред хората за връзката между 25(OH)D и инфламаторните цитокини са оскъдни и дават противоречиви резултати. Едно малко проучване на 28 здрави възрастни установява, че серумните нива на 25(OH)D имат обратнопропорционална корелация с нивата на IFN- $\gamma$ , но не и с нивата на TNF- $\alpha$  или IL-10 (24). Противоположни са резултатите на друго проучване, което изследва серумите на 69 здрави жени и установява

обратнопропорционална зависимост между серумните нива на 25(OH)D и серумните нива на TNF- $\alpha$ . Няма такава корелация със серумните нива на IL-6 или IL-10 (155). Едно японско проучване от 2014 г. изследва връзката между серумните нива на 25(OH)D и възпалителните цитокини при здрави хора (220). Авторите установяват положителна корелация между серумните нива на 25(OH)D и плазмените нива IL-17. Не е намерена обаче сигнификантна асоциация между серумните нива на 25(OH)D и плазмените стойности на IFN- $\gamma$  или IL-6.

Според други автори няма статистически значима асоциация между нивата на 25(OH)D и ендотелни и възпалителни маркери (разтворим рецептор I за TNF- $\alpha$ , IL-6, C-реактивен протеин и разтворима вътреклетъчна адхезионна молекула-1 и разтворима съдовоклетъчна адхезионна молекула-1) (171,172).

Резултатите от проучване, включващо 263 HIV - инфектирани пациенти на АРТ показват сигнификантна положителна асоциация между тежък дефицит на 25(OH)D и повишени плазмени нива на IL-6 и не установяват такава асоциация с продължителността и вида на терапията (14).

Други изследователи доказват, че 25(OH)D играе важна роля в антиген-представящата клетъчна функция и в продукцията на IL-10, като влияе директно на клетъчния растеж на Т регулаторните клетки (Treg) и стимулира продукцията на IL-10 (98). Високите серумни нива на 25(OH)D са свързани с понижаване на Treg клетъчната пролиферация и понижаване на броя на Treg клетките. Treg клетките участват в инактивацията и инхибицията на Т-клетъчната пролиферация, чрез преминаване от Th1 към Th2 имунен отговор. Прогресията на HIV-инфекцията е свързана с понижаване на броя на Treg и CD4+ клетките. Според други автори суплементацията с 25(OH)D няма ефект върху стойностите на CD4 клетките, но е свързано с понижаване на съотношението Th-17:Treg имунен отговор след 3 месеца (72).

Регулацията на цитокините чрез 25(OH)D има потенциално въздействие върху репликацията на HIV. Инхибирането на секрецията на TNF- $\alpha$  и IL-6 от 25(OH)D и неговите метаболити, *in vivo* и *in vitro* има потенциал да понижи репликацията на HIV чрез инхибиране на транскрипцията на вируса.

Необходимо е да се търсят нови възможности за ограничаване на имунната активация и хроничното възпаление. Намаляването на възпалението паралелно с вирусната супресия ще ограничи прогресията към СПИН и смъртността може да бъде редуцирана. От гореизложеното се вижда значението на баланса на цитокиновия профил при HIV инфекция и ролята им като потенциален биомаркер за предвиждане на прогресията на заболяването. Влиянието на серумните нива на 25(OH)D върху цитокиния профил от своя страна също рефлектира върху хода на HIV инфекцията. Необходими са повече проучвания, за да се изяснят взаимодействията между нивата на цитокините и реалното клинично състояние на HIV-инфектираните.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

**ЦЕЛ:** Целта на настоящата работа е да се проследят и анализират отклоненията в серумните нива на 25(OH)D, основни лабораторни и имунологични показатели при HIV – инфектирани пациенти, провеждащи антиретровирусна терапия, с оглед избор на терапевтичен режим с най-ниска дългосрочна токсичност и оценка на необходимостта от суплементация с вит Д.

За постигане на тази цел бяха поставени следните

**ЗАДАЧИ:**

1. Оценка на влиянието на провежданата АРТ върху стойностите на основни лабораторни показатели.
  - Пълна кръвна картина.
  - Биохимични показатели – кръвна захар, общ холестерол, ALT, креатинин
2. Определяне на серумните нива на 25(OH)D при HIV-инфектирани пациенти и оценка на факторите, оказващи влияние.
  - Фактори, влияещи и върху общата популация – възраст, пол, сезон.
  - Прием и вид на антиретровирусна терапия
3. Анализ на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху биохимични показатели – холестерол, кръвна глюкоза, ALT, креатинин.
4. Анализ на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху имунологични показатели – брой на CD4 клетки, индекс CD4/CD8 и време за възстановяване на CD4 клетките.
5. Определяне на цитокинен профил при HIV–инфектирани пациенти и анализ на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху цитокиния профил (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ ).

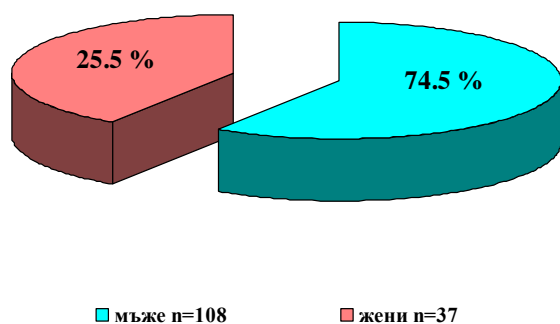
**МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

За изпълнение на поставените задачи бяха изследвани следните пациенти:

### 1. Изследвани пациенти.

В настоящото проучване са включени 145 HIV-инфектирани български пациенти, диспансеризирани в Отделението за лечение на придобита имунна недостатъчност към СБАЛИПБ „Проф.Иван Киров” - гр.София.

От проследените пациенти, 108 са мъже и 37 са жени. Разпределението по пол е представено на фиг.3



**Фиг.3** Разпределение по пол на изследваните HIV - инфектирани пациенти

Средната обща възраст на всички изследвани лица е  $34.9 \pm 9.3$  години.

Средната възраст на мъжете е  $34.8 \pm 9.2$  години, а на жените  $35.2 \pm 9.5$ .

Пациентите са проследявани амбулаторно. Не са наблюдавани усложнения на терапията, налагащи хоспитализация. В проучваната група, по-голяма част от пациентите провеждат антиретровирусно лечение с различна давност, но има и нелекувани (наивни) пациенти. Част от извършваните изследвания се провеждат рутинно в хода на диспансерното проследяване на HIV-инфекцията - ПКК, ALT, кръвна глюкоза, креатинин, холестерол и CD панел (CD4, CD8, CD4/CD8). Допълнително е извършено специализирано изследване на серумното ниво на 25(OH)D, като кръвните

проби за целта са събирани в месеците от ноември до март. Целенасочено бяха избрани зимните месеци, за ограничаване на влиянието на слънчевата светлина върху серумното ниво на 25(OH)D.

На следващ етап от проучването на шестдесет от проследяваните пациенти допълнително се определи цитокинов профил. За определяне на цитокиновия профил пациентите бяха разделени на две подгрупи. В едната подгрупа от 30 човека определянето на цитокинов профил се извърши без допълнителна стимулация на кръвните проби. В другата подгрупа също от 30 човека, определянето на цитокиновия профил беше извършено след 18 часова стимулация на кръвните проби с фитохемаглутинин. За да може да бъде оценявано в един и същи момент влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху цитокиновия профил беше необходимо повторно изследване на серумните нива на 25(OH)D. Кръвните проби за тези изследвания са събирани в периода м.август – м.ноември 2014 г.

При подбора на пациентите са спазени изискванията на етичната комисия към МУ - София.

## **2. Методи**

**2.1. Лабораторни методи** - Изследванията бяха провеждани в сектор Клинична лаборатория на СБАЛИПБ”Проф.Иван Киров”със завеждащ лаборатория д-р И.Габърска.

**2.1.1.Количествено измерване на хемоглобин** - референтните стойности са съответно за мъже между 140 и 180 g/l, а за жени между 120 и 160 g/l.

**2.1.2.Брой на кръвните клетки - еритроцити, левкоцити и тромбоцити в периферна кръв** - референтните стойности са съответно за еритроцити (Er) - жени 3,7 - 5,4 Т/л, мъже - 4,2 - 6,2 Т/л.

Референтните стойности за лекоцити са съответно 3,5 - 10,5 G/l, а на тромбоцитите - 130 - 440 G/l.

**2.1.3. Аланинаминотрансфераза (ALT) - референтни стойности за мъже <41 UI/l, а за жени <31 UI/l.**

**2.1.4. Кръвна глюкоза - референтни стойности 3,3 - 6,4 mmol/l.**

**2.1.5. Общ холестерол - референтните стойности са <5,33 mmol/l.**

**2.1.6. Серумен креатинин - референтните стойности за мъже са между 61 – 134  $\mu$ mol/l, а за жени между 44 - 96  $\mu$ mol/l.**

## **2.2. Методи за определяне серумните нива на 25(OH)D**

### **2.2.1. Радиоимунологичен метод**

При всички изследвани пациенти серумното ниво на 25(OH)D е определяно с високо чувствителен и специфичен радиоимунологичен кит (25OHVitaminD total-RIA-CT, DIAsource ImmunoAssays, Belgium). Методът използва имобилизирано към твърда фаза, високоспецифично моноклонално антитяло към 25OHVit D2 и 25OH Vit D3.

Всички серумни проби, калибратори и контроли бяха предварително третирани с Proclin 300 (0.1 %) за освобождаване на горните два витаминни метаболита от 25OHD-свързващия ги протеин. Чувствителността на измерване е 0.4 ng/ml. Съгласно референтните стойности на метода, нива на 25(OH)D<10 ng/ml се дефинират като дефицит, а серумни нива между 10-30 ng/ml се дефинират като недостиг. Достатъчно е ниво на 25(OH)D от 30 до 150 ng/ml. Стойности над 150 ng/ml вече се определят като токсични.

Изследването е проведено в Клиничен център по ендокринология и геронтология, Медицински факултет – София (проф.Г.Кирилов).

### **2.2.2. Имуноензимен метод**

При повторното определяне на 25(OH)D във втория етап от проучването (паралелно с цитокиновия профил) на 60 пациенти от групата е извършен ензимен имуноанализ с крайно флуоресцентно измерване ELFA. Използван беше тестът VIDAS® 25OHVitamin D Total. Тестът е произведен от bioMérieux, Франция. Тестът е количествен и използва технологията на ензимносвързано флуоресцентно изследване ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Имуноензимният метод измерва серумните нива на 25-hydroxyvitamin D2 и 25-hydroxyvitamin D3. Съгласно референтните стойности на този метод серумни нива на 25(OH)D < 20 ng/ml се дефинират като дефицит, а серумни нива между 20-30 ng/ml се дефинират като недостиг. Достатъчно е серумно ниво на 25(OH)D от 30 до 100 ng/ml, а стойности над 100 ng/ml са токсични.

Изследването е проведено в сектор Клинична лаборатория на СБАЛИПБ”Проф.Иван Киров” (д-р И.Габърска).

### **2.3. Имунологични методи**

Изследванията са извършвани в Националната референтна лаборатория по имунология на Национален център по заразни и паразитни болести (проф.М.Николова).

#### **2.3.1. Определяне на броя на CD4+Т-лимфоцитите. Имунофлуоцитометрия.**

Използваният метод за определяне на процент и абсолютен брой лимфоцити е флуоцитометричен, посредством многопараметърна флуоцитометрия. Пробите са обработвани по методика директно маркиране с лизиране, без промиване (т.нар. Lysis/No wash). За определяне на абсолютния брой на лимфоцитните популации е използвана стандартна епруветка Trucount (BD Trucount™), съдържаща точно определен брой, сертифициран от производителя брой флуоресцентни микросфери.

Флуоцитометричните изследвания са осъществени с апарат FACS Canto II. Апаратът е с три лазера и възможност за едновременен анализ на шест флуорохрома. Софтуерният продукт за събиране и анализ на пробите FACS Canto ver 1.1.0 - специализиран клиничен софтуер на (BD), за събиране и анализ на проби за имунофенотипизация, предназначен за флуоцитометри, анализиращи до флуоресцентни канала.

Преди събиране на пробите параметрите на апарата се верифицират посредством сертифицирани калибрационни материали, като част от рутинната процедура по калибриране на флуоцитометъра. За целта са използвани калибрационни флуоресцентни микросфери (BD FACS Canto™ 7-color) и софтуеър за автоматична настройка на времето на флуоцитометъра. Клиничният софтуеър BD FACS Canto (v2.0) автоматично изчислява абсолютния брой и процент на всяка от основните лимфоцитни популации, което осигурява точност и възпроизводимост на резултатите.

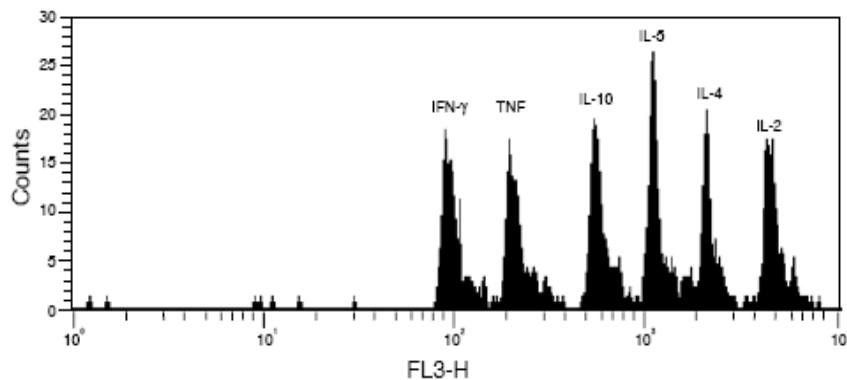
### **2.3.2. Определяне на Th1/Th2 цитокинов профил с ”Human Th1/Th2 Cytokine Kit”BD™ CBA (Cytometric Bead Array)**

Изследва се плазма от пациентите за определяне на цитокинов профил *ex vivo*. Използва се остатък от периферна хепаринизирана кръв, взета за рутинен имунологичен мониторинг. Центрофугира се на 500 оборота за 10 минути за отделяне на клетъчните елементи и се замразяват две порции плазма. Съхраняват се на температура -80 °C . На половината от пробите (n=30) не е извършвана стимулация. На останалите 30 проби се извърши 18 часова *in vitro* стимулация на цялата кръв с фитохемаглутинин. Целта на стимулацията е да се активират по-голяма част от наличните лимфоцити, за да се добие реална представа за техния цитокинов профил. По този начин се установява техния цитокинов потенциал.

Работи се в стерилни условия. В стерилна епруветка се залагат 250µl DMEM и 5µl концентриран разтвор на фитохемаглутинин (ФХА), като за него се постига крайна концентрация 10µg/ml. Фитохемаглутининът е белтък от растителен произход, който се използва като неспецифичен активатор на лимфоцитите, тъй като свързва кръстосано антиген-специфичните им рецептори. Той е поликлонален стимулатор, с който се очаква да се активират над 90 % от лимфоцитите. Съхранява се разтворен в среда за култивиране DMEM при -20°C. Размразява се непосредствено преди употреба. Хранителната среда DMEM се използва за разреждане на кръвта в методите за *in vitro* активация за оценка на активационния праг и за определяне на цитокинов профил. Добавят се 250µl прясна венозна кръв, взета с антикоагулант хепарин. Разбъркват се на вортекс. Пробите се инкубират на 37°C в термостат за 24 часа. След изтичане на инкубацията епруветката с фитохемаглутинин се центрофугира за 5 минути на 300g. Внимателно се събира супернатантата, като 2 дози x 135µl се замразяват на -80°C и се съхраняват до изследване със СВА кит.

**Принцип на метода:** Тестът BD СВА Human Th1/Th2 Cytokine Kit може да измерва количествено плазмените нива на интерлевкин 2 (IL-2), интерлевкин 4 (IL-4), интерлевкин 6 (IL-6), интерлевкин 10 (IL-10), тумор некротичен фактор алфа (TNF-α) и интерферон гама (IFN-γ). Китът е оптимизиран да извършва количествен анализ на цитокините в супернатанти от тъканни култури, плазма взета в контейнер с EDTA или серумни проби. BD СВА (Цитометричен микросферов метод) използва шест групи от флуоресциращи (FL3) микросфери, всяка от които носи на повърхността си анти тяло за един от цитокините IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α и IFN-γ (фиг. 4). Микросферите, специфични за различни цитокини, флуоресцират с различен интензитет по FL3. По този начин те могат да се разграничат флуоцитометрично. След обработка с реагента за детекция (PE-конюгирани цитокин-специфични антитела), микросферите флуоресцират и

по FL2, като интензитета на тази флуоресценция зависи от количеството свързан цитокин. С помощта на стандарти, съдържащи известни концентрации от всеки цитокин, се построяват стандартни криви и пробите могат да се анализират количествено. Следователно, с помощта на "Human Th1/Th2 Cytokine Kit"BD™ СВА в една епруветка могат едновременно да бъдат определени количествено IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ .



Фигура 4. Шест различни популации микросфери с различен интензитет на FL3, специфични за един от цитокините: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ .

**Отчитане и анализ на резултатите от флоуцитометричните изследвания** - при събирането и анализа на пробите бяха използвани следните софтуерни продукти, съвместими с флоуцитометър FACSCalibur™:

FACSComp – специализиран софтуер на BD Biosciences за CellQuestPro™ ver. 5.1 - специализиран софтуер на BD Biosciences за РС за събиране и анализ на проби за имунофенотипизация, осигуряващ по-голяма гъвкавост в събирането и анализа на проби от научни експерименти. Програмата дава възможност за собствен дизайн в структурата на експеримента и индивидуална настройка в параметрите на статистиката. За събирането на пробите бе използван специфичен набор от настройки на апарата. Всички програмни продукти на BD Biosciences са проектирани и изработени според изискванията на стандартите ISO 9001 и GMP.

### **3.4. Статистически методи**

Всички статистически анализи бяха извършени със Statistica 7.0, Stat Soft Inc., USA, 2004.

За ниво на значимост за отхвърляне на нулевата хипотеза бе избрано  $p < 0.05$ .

Основните използвани методи са:

1. Дескриптивен анализ на честотното разпределение на изследваните параметри (променливи).
2. Тестове на Kolmogorov Smirnov и Lilliefors - чрез тях беше извършена проверка за нормалност на разпределенията.
3. Оценка на взаимовръзката между променливите чрез определяне на коефициента на корелация (Pearson).
4. Статистическата обработка на данните за процентното разпределение беше извършена чрез  $\chi^2$  Тест.
5. Доказване на достоверните разлики в съответните променливи за групите изследвани пациенти беше извършено чрез непараметрични тестове (Mann-Whitney U test за независими променливи и еднофакторна ANOVA).

## **РЕЗУЛТАТИ**

**I. Оценка на влиянието на вида на провежданата АРТ върху основни лабораторни, някои имунологични показатели и серумни нива на 25(OH)D.**

## 1. Възрастово разпределение на изследваната група пациенти

Поради липсата на контролна група здрави индивиди, е направен статистически анализ на възрастовото разпределение на всички изследвани пациенти като ги разделихме в 5 възрастови групи:

**1 група** - от 20 до 30 години

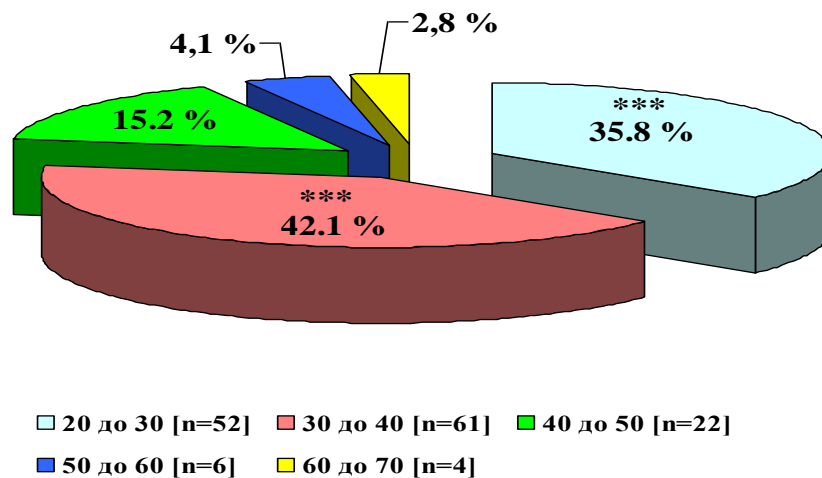
**2 група** - от 30 до 40 години

**3 група** - от 40 до 50 години

**4 група** - от 50 до 60 години

**5 група** - от 60 до 70 години

Процентът на пациентите в първата 35.8 % (n=52) и втората 42.1 % (n=61), е достоверно по-голям от този в останалите три групи ( $\chi^2$  тест, p=0.0001). Съответно в третата група са 15.2 % (n=22), в четвъртата - 4.1 % (n=6) и в петата – 2.8 % (n=4) (фиг.5).



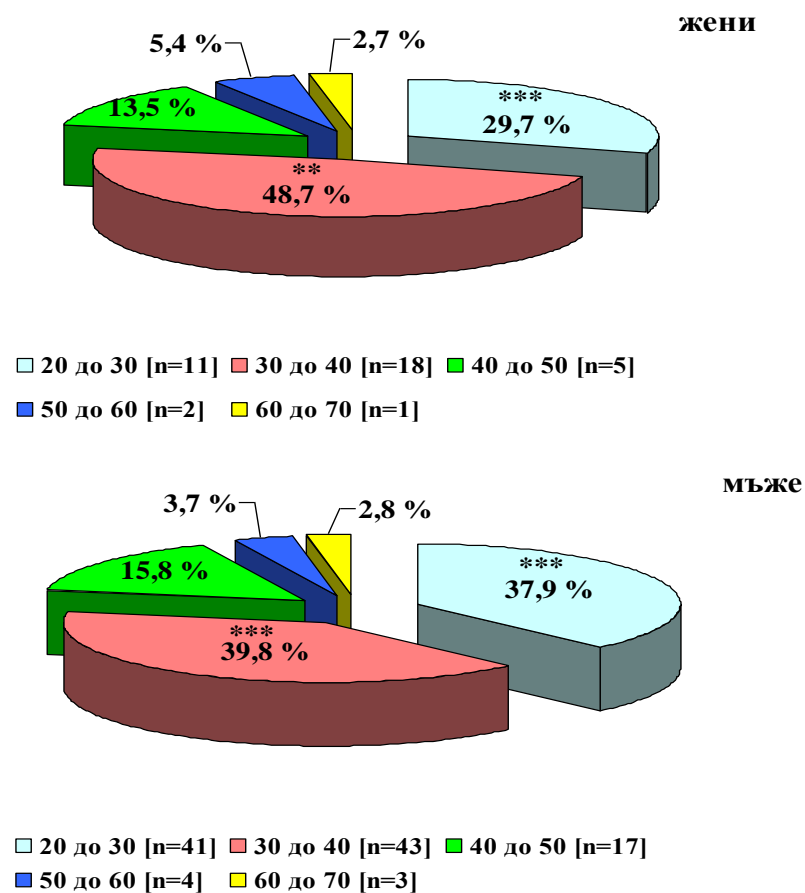
**Фиг.5** Процентно разпределение на изследваните пациенти, разделени във възрастови групи. Значимата разлика е отбелязана със звездичка (p> 0.001)

Референтните граници за някои от изследваните лабораторни параметри имат различия в зависимост от пола. Поради тази причина се извърши подразделяне по пол във всяка възрастова група.

Най-голям е броят на пациентите (жени и мъже) във възрастова група от 30 до 40 години (ж = 18, м = 43), следвани от възрастовата група от 20 до

30 години (ж = 11, м = 41). Най-малък е броят на жените и мъжете във възрастова група от 60 до 70 години (ж = 1, м = 3).

Процентът на мъжете в първа и втора група е достоверно по-голям от този в останалите три групи ( $\chi^2$  тест,  $p= 0.0001$ ), докато при жените процентът в втората група е достоверно ( $\chi^2$  тест,  $p= 0.006$ ) по-голям от този на трета и на четвърта групи ( $\chi^2$  тест,  $p= 0.0011$ ) (фиг.6).



**Фиг.6** Процентно разпределение на изследваните пациенти (жени и мъже), разделени във възрастови групи. Значимата разлика е отбелязана със звездичка ( $p > 0.001$  за мъжете и  $p > 0.01$  за жените).

Не се установи статистически значима разлика между жени и мъже за съответните възрастови групи, което позволи да бъдат сравнявани отделните групи и се направиха последващите статистически анализи.

## 2. Механизъм на инфектиране с HIV на проследяваните пациенти

При по-голямата част от проследените пациенти (n=113; 77,7%) механизмът на инфектиране с HIV е полов. При 22,3 % (n=32) от пациентите, механизмът на инфектиране е кръвен (употреба на интравенозни наркотици или преливане на кръв и кръвни продукти). Разпределението на пациентите по трансмисивни категории е отразено на таблица 4.

**Таблица 4**

Механизъм на инфектиране	Мъже (n)	Мъже %	Жени (n)	Жени %	Общо (n)	Общо %
Полов хетеросексуален	38	35%	35	94,6 %	73	50,3 %
Полов MSM	40	37 %	-	-	40	27,4 %
Кръвен IVDU	28	26,2 %	2	5,4 %	30	20,7 %
Кръвен (преливане на кръв и кръвни продукти)	2	1,8%	-	-	2	1,6 %

От направената дескриптивна статистика и тестовете за нормалност на разпределенията на стойностите на измерваните променливи се установи, че разпределенията на измерените параметри се различават от нормалното разпределение, поради което за оценка на достоверността на разликите в променливите за съответните групи бяха използвани непараметрични тестове.

## 3. Анализ на данните след разделяне на пациентите по пол

За да се анализират отклоненията и разликите в стойностите на изследваните параметри, пациентите са разделени в две подгрупи според пола (жени и мъже). Поради различният брой на изследваните жени (n=37)

и мъже (n=108) беше приложен непараметричен тест за независими извадки (Mann-WhitneyUtest).

На таблици 5 и 6 са представени основните изследвани показатели със съответните минимални, максимални и средни стойности, стандартните им отклонения, както и броя и % пациенти с отклонения в параметрите.

**Таблица 5. Проследени показатели при изследваните мъже**

Показатели мъже n=108	Min	Max	Mean	SD	Abnormal n	Abnormal %
Hb	101	179	148	13.88	<b>50</b>	<b>46.1</b>
Er	2.79	5.75	4.47	0.67	<b>36</b>	<b>33</b>
Leu	2.60	9.18	5.54	1.42	<b>5</b>	<b>4.5</b>
Thr	56	657	233.21	80.52	<b>4 &lt;/2 &gt; *</b>	<b>2.2/ 1.8</b>
ALT	6	254	40.27	36.13	<b>29</b>	<b>20</b>
Glu	3.50	8.29	5.78	0.87	<b>37</b>	<b>33</b>
Chol	1.27	9.50	4.92	1.56	<b>17</b>	<b>15.5</b>
Creat	32.10	116	10.17	15.30	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>25(OH)D</b>	1.00	108	21.04	13.57	<b>90</b>	<b>83.3</b>
CD4	44	1474	503.80	261.22	<b>63</b>	<b>58.3</b>

\*Със знак <е отбелязан броят на мъжете със стойности на тромбоцитите под референтна граница, а със знак >броят на мъжете със стойности на тромбоцитите над горна граница

**Таблица 6. Проследени показатели при изследваните жени**

Показатели жени n=37	Min	Max	Mean	SD	Abnormal n	Abnormal %
Hb	102	151	129.51	10.97	<b>8</b>	<b>21.1</b>
Er	3.00	5.47	4.05	0.53	<b>6</b>	<b>16.1</b>

Leuco	2.25	12.00	5.64	2.07	<b>6</b>	<b>16.1</b>
Thr	139	511	267.68	75.10	<b>0 / 1&gt;</b>	<b>0/ 2.7</b>
ALT	11	62	24.95	36.13	<b>5</b>	<b>13.2</b>
Glu	3.69	8.01	5.80	0.98	<b>13</b>	<b>35</b>
Chol	3.16	10.20	5.51	1.63	<b>11</b>	<b>30</b>
Creat	36.10	100	58.91	12.94	<b>0</b>	<b>0</b>
25(OH)D	7.40	90.10	21.36	14.36	<b>31</b>	<b>83</b>
CD4	63	1283	553.19	279.11	<b>16</b>	<b>40.5</b>

\*Със знак >е отбелязан броят на жените със стойности на тромбоцитите над горна граница, няма жени с по-ниски от нормалните стойности на тромбоцитите

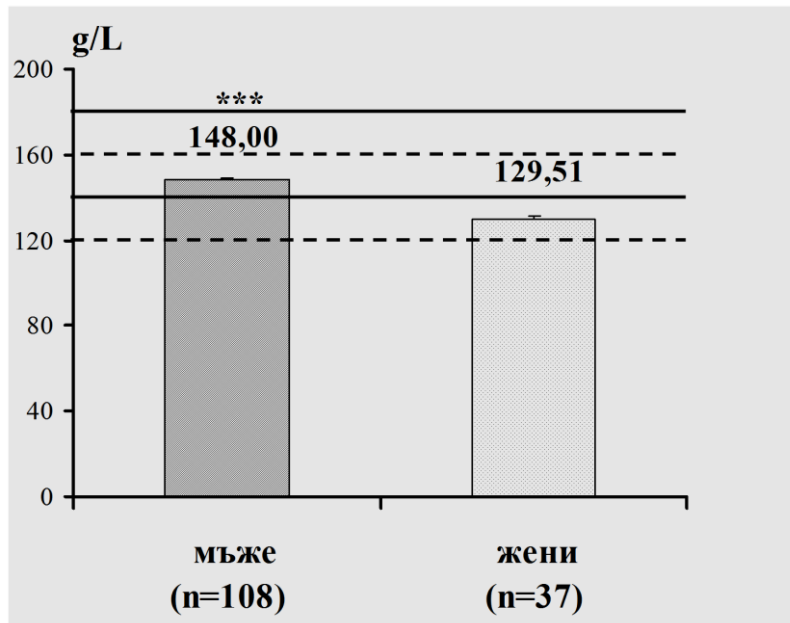
### 3.1.Кръвна картина

Статистически значими различия между мъже и жени установихме по отношение на средни стойности хемоглобин, еритроцити и тромбоцити, но не и на левкоцитите, което е представено на таблица 7.

*Таблица 7. Показатели на ПКК*

ПКК	Mean мъже	Mean жени	Z	p
Hb(g/L)	148.00 ± 13.88	129.51± 10.97	<b>6,42625</b>	<b>0,000000</b>
Er (T/L)	4.45±0.67	4.05 ± 0.53	<b>3,88940</b>	<b>0,000101</b>
Leu (G/L)	5.54 ± 1.42	5.64 ± 2.07	-0,07710	0,938543
Thr (G/L)	233.21 ± 7.75	267.68 ± 12.35	<b>-2,69643</b>	<b>0,007009</b>

Средната стойност на хемоглобина за жени е достоверно по-ниска от тази на мъжете (**p = 0.000000**) (фиг.7).

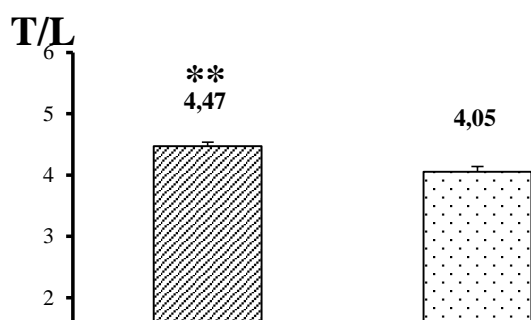


**Фиг.7** Хемоглобин (mean±SE) при мъже и жени. \*\*\*  $p < 0.001$ .

В групата на жените 21,1 % (n=8) са със стойности на хемоглобина по-ниска от долната референтна граница (120g/l), докато в групата на мъжете 46,1 % (n=50) от изследваните пациенти са със стойности на хемоглобина по-ниски от долната референтна граница за мъже (140 g/l).

Средната стойност на еритроцитите за жени също е достоверно по-ниска в сравнение с тази на мъжете ( Mann-WhitneyUtest,  $p = 0.000101$ ) (фиг.8).

Една трета от мъжете (n=36, 33 %) обаче са със стойности на еритроцитите по-ниски от референтните стойности, докато в групата на жените 16,1 % (n=6) са с по-ниски стойности на еритроцитите.

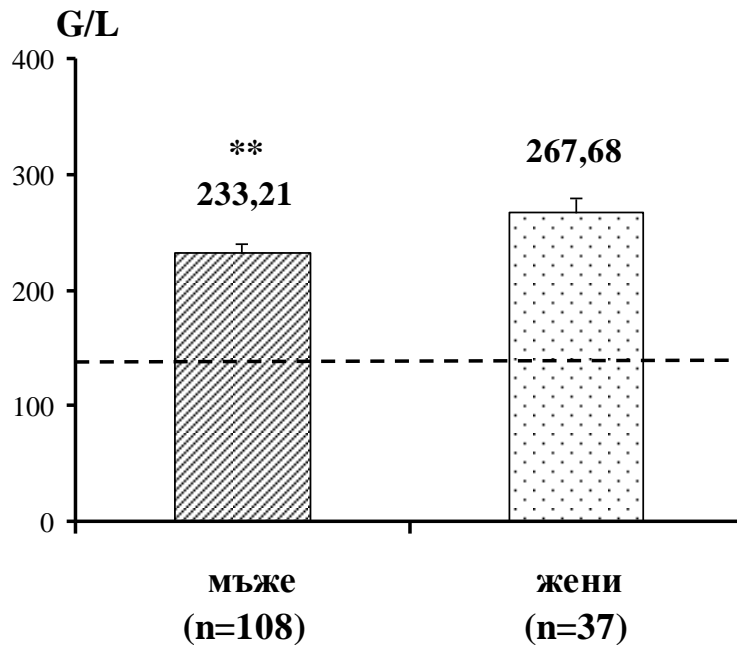


**Фиг.8** Еритроцити (mean±SE) при мъже и жени. \*\*\* P<0.001.

Разликите в средните стойности на хемоглобин и еритроцити са очаквани поради разлики в референтните граници на тези показатели за мъже и жени.

Средните стойности на левкоцитите за мъже и жени нямат достоверна разлика (p=0,938545).

За тромбоцитите установихме обратна зависимост. Средната стойност на тромбоцитите при мъже е значимо по-ниска от тази на жени (p = 0.007) (фиг.9). Освен значимо по-ниските тромбоцити, в групата на мъжете установихме, че 2,2 % (n=4) са със стойности на тромбоцитите по-ниски от долната референтна граница и 1,8 % (n=2) са със стойности над горната референтна. В групата на жените няма пациентки със стойности по-ниски от долната референтна граница, но в 2,7 % (n=1) установихме стойности на тромбоцитите по-високи от горната референтна граница.



**Фиг.9** Тромбоцити (mean±SE) при мъже и жени. \*\* P<0.01.

### 3.2.Биохимични показатели

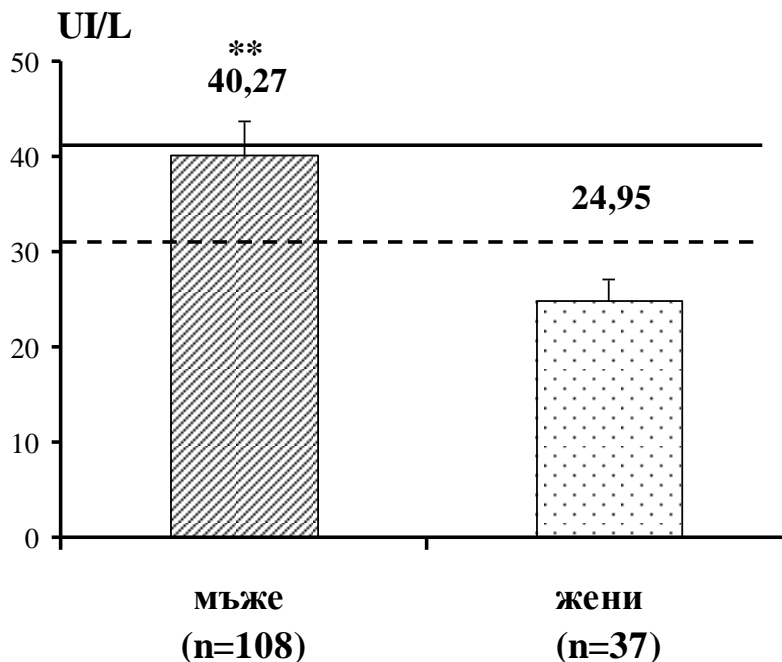
От измерваните биохимични параметри само средните стойности на ALT и креатинин се различаваха достоверно според пола. Тези разлики също са очаквани поради разликите в референтните стойности на тези показатели за мъже и жени.

Средните стойности на биохимичните показатели за мъже и жени и достоверните разлики са представени на таблица 8.

**Таблица 8. Биохимични показатели**

Биохимични показатели	Mean мъже	Mean жени	Z	p
ALT (U/l)	40.27 ± 36.13	24.95 ± 36.13 UI/L	3,17191	0,001515
Glu (mmol/l)	5.78 ± 0.87	5.80 ± 0.98	-0,04082	0,967436
Chol (mmol/l)	4.92 ± 1.56	5.51 ± 1.63	-1,69859	0,089398
Creat (µmol/l)	70.17 ± 15.30	58.91 ± 12.94	4,17528	0,000030

При мъжете средната стойност на ALT е достоверно по-висока от тази за жените (Mann-WhitneyUtest, Z = 3.17014, p = 0.001524) (фиг.10).

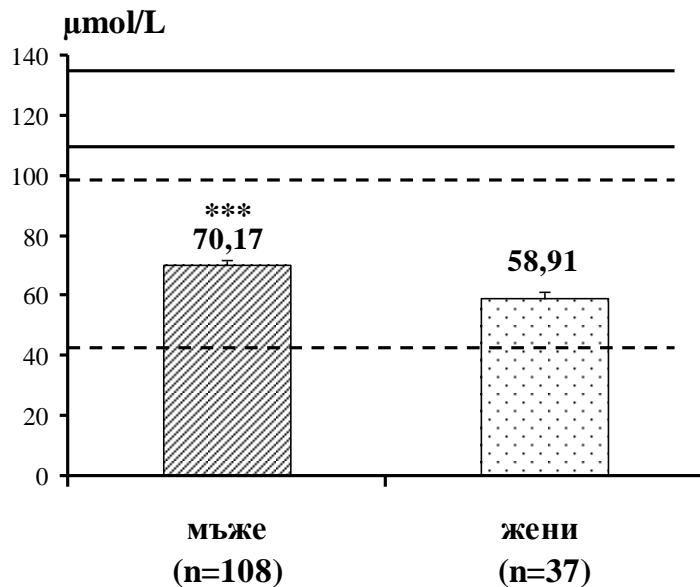


**Фиг.10** ALT (mean±SE) при мъже и жени. \*\*P<0.01.

От всички проследени пациенти повишени стойности на ALT установихме при 20 % (n=29). От изследваните жени 13,2 % (n=5) са със стойности над референтната. Докато от изследваните мъже 21 % (n=24) са със стойности на ALT над референтната. В групата на жените 5,4 % (n=2)

са коинфектирани с хепатит С. В групата на мъжете 22,2 % (n=24) са коинфектирани с хепатит С и 1,8 % (n=2) са коинфектирани с хепатит В. Половината от коинфектираните с хепатити са с повишени стойности на ALT.

Другият биохимичен показател при който установихме статистически достоверна разлика е креатинин, както беше очаквано при мъжете средната стойност е достоверно по-висока (Mann-WhitneyUtest,  $Z=4.17243, p = 0.000030$ ). Не установихме абнормни стойности на креатинина в цялата проследявана група пациенти (фиг.11)



**Фиг.11** Креатинин (mean±SE) при мъже и жени. \*\*  $p<0.01$ . Долната и горната референтни граници за жени е отбелязана с пунктир, а за мъже с непрекъсната линия.

Не установихме сигнификантна разлика в средните стойности на кръвната глюкоза между мъже и жени. При 34,5 % (n=50) от проследените пациенти установихме повишени стойности на кръвната глюкоза. Съответно в групата на жените отново 35 % (n=13) са с повишени стойности на кръвната захар, съответно в групата на мъжете 33 % (n=37) са с повишени стойности на кръвната захар.

Не се установяват и достоверни разлики по отношение средните стойности на холестерола в зависимост от пола. От всички изследвани пациенти при 12,4 % (n=28) намерихме повишени стойности на общия холестерол. При разделянето по пол установихме, че в групата на жените е налице по-голям процент с повишени стойности - 30 % (n=11), докато при мъжете 15,5 % (n=17) от изследваните мъже са с повишен общ холестерол.

### 3.3.Изследване на CD4 клетки.

На таблица 9 са представени стойностите на CD4 клетките със съответните минимални, максимални и средни стойности.

**Таблица 9. Стойности на CD4/  $\mu$ L**

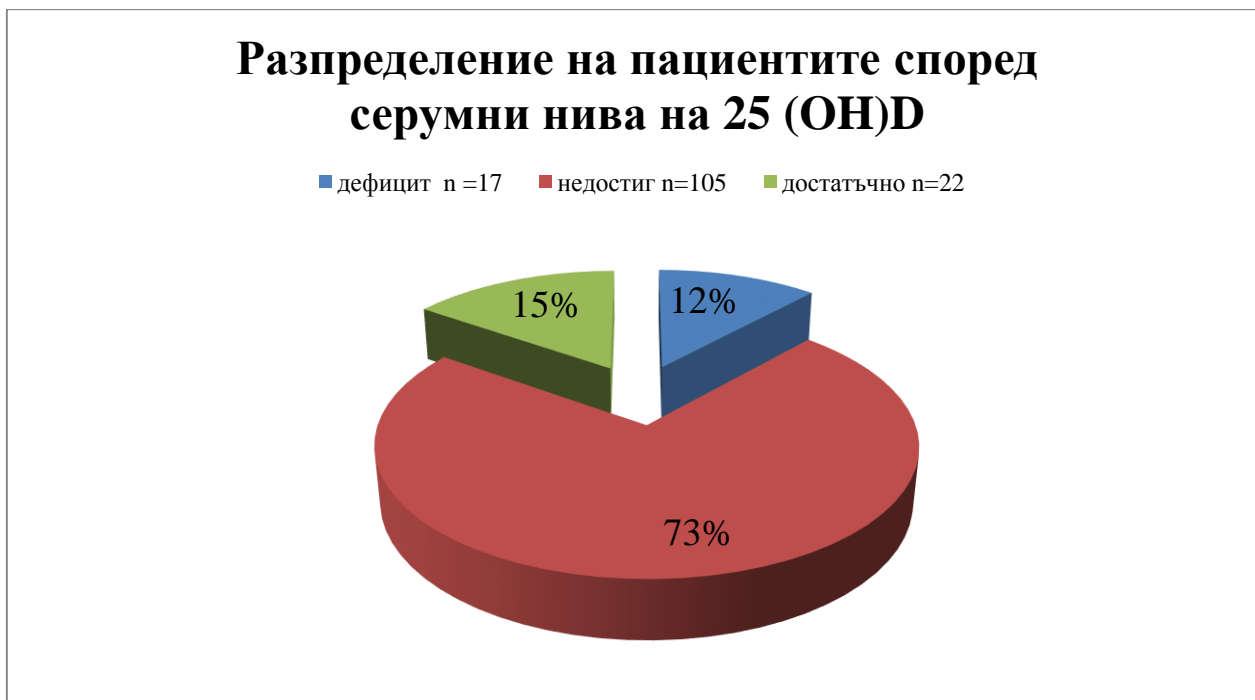
	Min CD4/ $\mu$ L	Max CD4/ $\mu$ L	CD4/ $\mu$ L(mean $\pm$ SE)	z	p
Мъже	44	1474	503.80 $\pm$ 261.22	-0,97056596	0.334387
Жени	63	1283	553.19 $\pm$ 279.11		

Не се установява статистически значима разлика между средните стойности на CD4 клетките в зависимост от пола (Mann-WhitneyUtest, Z=-0.97057, p = 0.334387). Минималната стойност на CD4 клетките при мъже е по-ниска от тази при жени, докато максималната стойност при мъжете е по-висока от тази при жените.

### 3.4. Изследване на серумното ниво на 25(OH)D

Според референциите на използвания радиоимунологичен метод за определяне на серумните нива на 25(OH)D, за нормални се смятат стойности над 30 ng/ml. От всички проследени пациенти само при 15 % (n=22) установихме нормални серумни нива на 25(OH)D. Съответно при останалите 85 % (n=123) установихме понижени серумни нива на 25(OH)D<30 ng/ml. От тях при 12 % (n=17) серумното ниво на 25(OH)D е

< 10 ng/ml, което се дефинира като дефицит на витамин Д. Най-голяма е групата пациенти с ниво на 25(OH)D между 10-30 ng/ml - 73 % (n=105). Такива серумни нива се дефинират като недостатъчност на витамин Д (фиг.12).



Фиг.12 Разпределение на пациентите според серумното им ниво на 25(OH)D

Измерените серумни нива на 25(OH)D – съответно минимални, максимални и средни при мъже и жени са представени на таблица 10.

**Таблица 10. Стойности на 25(OH)D**

	Min 25(OH)D ng/ml	Max 25(OH)D ng/ml	25 (OH)D(mean±SE) ng/ml	z	p
Мъже	1,0	65,5	21,04 ± 13.57	0.18595	0.8524832
Жени	7,4	90,1	21.36 ± 14.36		

Не установяваме сигнификантна разлика в средните стойности на 25(OH)D между мъже и жени (Mann-WhitneyUtest, Z = 0.18595, p =

0.8524832). От изследваните жени 83% (n=31) са със стойности на 25(OH)D под 30 ng/ml. Съответно от изследваните мъже в 83,3% (n= 90) се установява дефицит или недостиг на 25(OH)D.

Разпределението на проследените пациенти по пол и в зависимост от стойностите на 25(OH)D е представено на таблица 11.

**Таблица 11. Разпределение на пациентите по серумни нива на 25(OH)D**

	Дефицит		Недостиг		Достатъчно	
	n	%	n	%	n	%
мъже	10	9,2 %	80	74 %	18	16,8 %
жени	3	8,1%	28	75,6 %	6	16,3 %

На таблица 12 са представени средните стойности на 25(OH)D в групите с дефицит, недостиг и нормални серумни нива.

**Таблица 12. Серумни нива на 25(OH)D (mean+ SE) в групите с дефицит, недостиг и достатъчност при двата пола**

	Дефицит	Недостиг	Достатъчно
Мъже	7.5 ± 2.81	17.9± 4.4	42.7 ± 20.2
Жени	8.1 ± 1.00	18.0 ± 5.8	43.7 ± 23.3

Няма сигнификантни разлики в средните стойности на 25(OH)D между мъжете и жените и в отделните групи дефинирани като дефицит, недостиг и достатъчни нива на 25(OH)D.

#### **4. Анализ на данните след разделяне на пациентите по степен на имуен дефицит (брой на CD4 клетки)**

За да оценим и влиянието на степента на имуен дефицит върху проследяваните показатели, разделихме пациентите според броя на CD4 клетките в три групи.

Групите бяха определени, съответстващи на класификацията на CDC за стадиране на HIV-инфекцията според броя на CD4клетките. В първи стадий на HIV-инфекция са пациенти с нормални стойности на CD4 > 500/μl, във втори стадий са пациенти с брой на CD4 между 200 – 499 /μl и в трети стадий са пациенти с брой на CD4 < 200/μl.

Разпределението на пациентите е представено на таблица 13.

**Таблица 13. Разпределение на пациентите според степен на имуен дефицит**

Стадий	n		%		CD4 mean		SD	
	мъже	жени	мъже	жени	Мъже	жени	Мъже	жени
I – ви CD4 <200	8	1	8,4	2,7	109.88	63.00	55.59/	0.00
II – ри CD4 200-499	55	15	50,9/	40,6	367.38	321.00	91.47	74.07
III - ти CD4 >500	45	21	40,7	56,7	740.56/	742.38	215.34	215.30

Не установяваме статистически достоверни разлики между средните стойности на CD4 клетките при мъже и жени във всяка една от групите.

Важно е да се отбележи, че само една жена от изследваните е в трети стадий на HIV инфекция. По-голямата част от изследваните жени са в първи стадий на инфекцията - 56,7%. При мъжете по-голямата част от изследваните пациенти са във втори стадий на инфекцията - 50,9 %.

#### 4.1.Кръвна картина

На таблица 14 са представени средните стойности на хемоглобина и стандартните отклонения в зависимост от степента на имуен дефицит.

**Таблица 14. Hb (mean, SD, SE) при проследените пациенти според степента на имуен дефицит**

Брой на CD4 /mcl	Hb mean		SD		SE		P (мъже)
	мъже/жени		мъже/жени		мъже/жени		
CD4 <200	133.25	115.00	10.71	0.00	7.32	0.00	p = 0.01826 (трети спрямо първи стадий)
CD4=200-499	147.69	131.27	12.10	12.16	1.63	3.14	p=0.05 (трети спрямо втори стадий)
CD4 >500	151.00	128.95	13.11	9.99	1.95	2.22	

При анализ на получените резултатите намерихме следните статистически достоверни разлики в зависимост от степента на имуен дефицит. Мъжете с напреднал имуен дефицит (трети стадий на инфекцията) имат значимо по-нисък хемоглобин от тези в първи и втори стадий (Mann-WhitneyUtest,  $Z=-2.36029$ ,  $p=0.01826$ ,  $p=0.05$ ). Статистически значима разлика в хемоглобина между мъже и жени установихме в групите с първи и втори стадий, но не и при трети стадий на инфекцията (Mann-WhitneyUtest,  $Z = -5.14195$ ,  $p=0.00000$ ,  $Z = 4.0864$ ,  $p=0.000044$ ).

Аналогични резултати получихме и по отношение на еритроцитите (таблица 15.)

**Таблица 15. Брой еритроцити (mean, SD, SE) според степен на имуен дефицит**

Брой на CD4 /mcl	Er mean		SD		SE		P
	Мъже/жени	Мъже/жени	Мъже/жени	Мъже/жени	Мъже/жени	Мъже/жени	
CD4 <200	3.96	3.91	0.74	0.00	0.26	0	<b>Мъже</b> <b>P=0.02578</b> (трети спрямо втори стадий ) <b>жени</b> <b>p = 0.01826</b> (втори спрямо първи стадий) <b>p = 0.00979</b> (втори спрямо трети стадий)
CD4 =200-499	4.64	4.32	0.61	0.42	0.08	0.11	
CD4 >500	4.36	3.87	0.69	0.55	0.10	0.12	

Мъжете в трети стадий на инфекцията, т.е с най-тежък имуен дефицит имат значимо по-ниски средни стойности на еритроцитите от тези във втори (Mann-WhitneyUtest,  $p = 0.02578$ ). Докато при жените във втори стадий на HIV-инфекция средните стойности на еритроцитите са достоверно по-високи от тези на пациентките в първи стадий и в трети стадий (Mann-WhitneyUtest,  $p = 0.01826$ ,  $p = 0.00979$ ).

Средни стойности на еритроцитите бяха значимо по-високи при мъжете спрямо жените само в първи и втори стадий, но не и в трети стадий на инфекцията ( $p = 0.002751$ ,  $p = 0.026036$ ).

На таблица 16 са представени средните стойности на левкоцитите и стандартните отклонения, в зависимост от степента на имуен дефицит.

**Таблица 16. Левкоцити (mean, SD, SE) според степен на имуен дефицит**

Брой на CD4 /mcl	Leu mean		SD		SE		P
	мъже/жени		мъже/жени		мъже/жени		
CD4 <200	4.62	2.96	1.06	0.00	0.37	0	<b>Мъже</b> p = 0.010496 (първи стадий спрямо втори и трети)  <b>жени</b> p = 0.004081 (първи стадий спрямо втори )
CD4 200-499	5.24	4.66	1.29	1.67	0.17	0.43	
CD4 >500	6.07	6.47	1.45	1.99	0.22	0.43	

Средните стойности на левкоцитите при мъжете в трети и втори стадий на инфекцията са статистически значимо по-ниски от средните стойности на левкоцитите на мъжете в първи стадий ( $p = 0.010496$ ).

При жените средната стойност на левкоцитите на пациентките в първи стадий е сигнификантно по-висока от тази на пациентките във втори стадий на инфекцията ( $p=0.004081$ ).

На таблица 17 са представени средните стойности на тромбоцитите и стандартните отклонения, в зависимост от степента на имунен дефицит.

Средните стойности на тромбоцитите при пациентите от трети стадий са сигнификантно по-ниски от съответните за пациентите в първи и втори стадий ( $p=0.009855$ ,  $p=0.008510$ ). Средната стойност на тромбоцитите на жените в първи стадий е статистически значимо по-висока от съответната за мъжете ( $p=0.006414$ ).

**Таблица 17. Тромбоцити (mean, SD, SE) според степента на имунния дефицит**

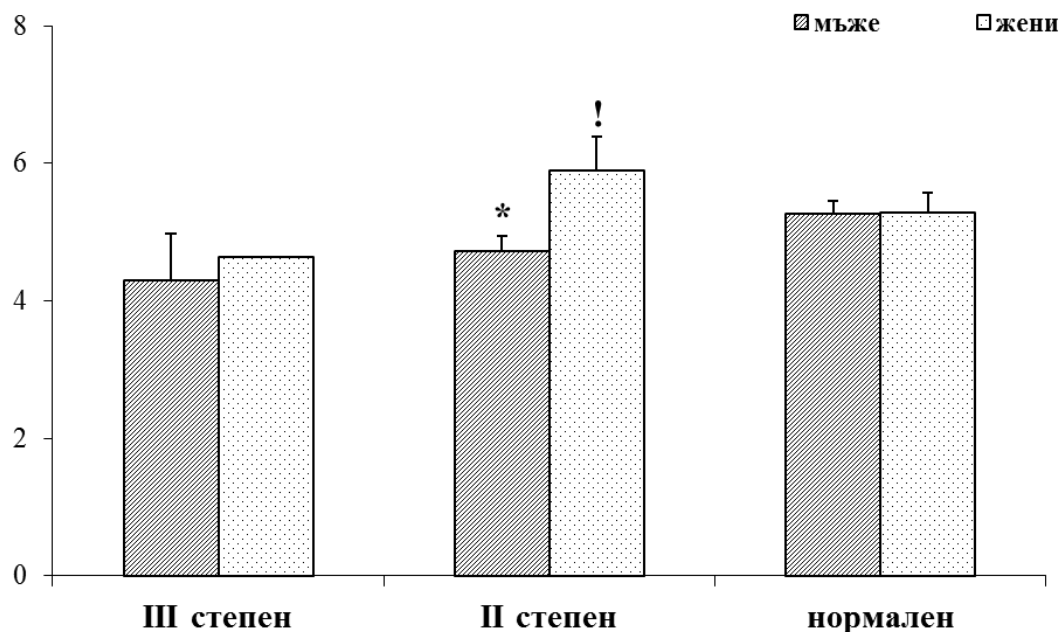
Брой на CD4 /mcl	Thr mean		SD		SE		P
	мъже/жени		мъже/жени		мъже/жени		
CD4 <200	220.02	139.00	178.31	0.00	63.04	0.00	Мъже p = 0.009855 (трети спрямо първи стадий)
CD4 200-499	238.09	239.73	73.31	59.40	9.88	15.34	p = 0.008510 (трети спрямо втори стадий)
CD4 >500	286.50	293.76	56.07	74.53	8.36	16.26	p = 0.006414 (Жени спрямо мъже в първи стадий)

#### 4.2. Биохимични показатели

При жените не установихме статистически значимо влияние на степента на имуноен дефицит върху стойностите на биохимичните показатели – кръвна захар, холестерол, креатинин и ALT.

При мъжете в първи стадий на инфекцията средната стойност на холестерола е сигнификантно по-висока от тази на пациентите във втори стадий (p=0.019913).

Жените във втори стадий на инфекцията са със статистически значимо по-високи средни стойности на холестерола от мъжете в същия стадий (Mann-WhitneyUtest, Z=-2.18991, p=0.028532) (фиг.13).



**Фиг.13** Холестерол (mean±SE) на изследваните пациенти, според степента на имуноен дефицит. Достоверните разлики между групата от 1-вистадий и останалите две групи за мъже са означени с \*, а разликата между мъже и жени – с ! ( $p < 0.05$ ).

Средните стойности на ALT при мъже в първи и втори стадий на инфекцията са значимо по-високи от тези на жените ( $p=0.0500$ ,  $p=0.008272$ ).

На таблици 18 и 19 са представени обобщено средните стойности на биохимичните показатели на мъжете и жените, според степента на имуноен дефицит.

**Таблица 18.** Серумни нива на биохимичните показатели (mean) при мъжете, според степен на имуноен дефицит.

Брой на CD4 /mcl	glu	chol	creat	ALT

<b>CD4 &lt;200</b>	<b>5.60</b>	<b>4.30</b>	<b>73.49</b>	<b>68.63</b>
<b>CD4 200-499</b>	<b>5.80</b>	<b>4.73</b>	<b>72.22</b>	<b>41.33</b>
<b>CD4 &gt;500</b>	<b>5.80</b>	<b>5.26</b>	<b>67.08</b>	<b>33.93</b>

*Таблица 19. Средни стойности на биохимичните показатели при жените, според степен на имунен дефицит.*

<b>Брой на CD4 /mcl</b>	<b>glu</b>	<b>chol</b>	<b>creat</b>	<b>ALT</b>
<b>CD4 &lt;200</b>	<b>4.60</b>	<b>4.64</b>	<b>38.10</b>	<b>53.00</b>
<b>CD4 200-499</b>	<b>6.00</b>	<b>5.89</b>	<b>62.47</b>	<b>23.40</b>
<b>CD4 &gt;500</b>	<b>5.70</b>	<b>5.27</b>	<b>57.36</b>	<b>24.71</b>

**5. Анализ на данните след разделяне на пациентите според серумните им нива на 25(OH)D**

За да оценим влиянието на серумните нива на 25(OH)D върху останалите проследявани лабораторни и имунологични показатели, разделихме пациентите според стойностите на 25(OH)D на три групи – с дефицит, недостиг и нормални серумни нива.

### 5.1. Кръвна картина

Средните стойности на хемоглобина и стандартните отклонения в различните групи според серумните нива на 25(OH)D са представени на таблица 20.

**Таблица 20. Хемоглобин (mean, SD, SE) според серумните нива на 25(OH)D**

25 (OH)D	Hb mean		SD		SE		P
	мъже	жени	мъже	жени	мъже	жени	
Дефицит <10 ng/ml	141.40	131.67	17.53	14.47	5.54	8.35	м/ж p = 0.011299
Недостиг 10-30 ng/ml	148.69	130.00	12.04	10.93	1.35	2.07	
Достатъчно >30	151.00	126.70	13.11	10.94	1.95	4.47	

Не се установява сигнификантна разлика в средните стойности на хемоглобина между жени и мъже с дефицит на 25(OH)D.

Съответстващо на различията в референтните граници намерихме, че средната стойност на хемоглобина при мъже с нормални серумни нива на 25(OH)D е значимо по-висока от тази при жените с нормални стойности (p=0.00000). Същото се установява и при сравняване на групите мъже и жени с недостиг на 25(OH)D (p = 0.011299).

Средните стойности на левкоцитите и стандартните отклонения за различните групи, в зависимост от серумните нива на 25(OH)D са отразени на таблица 21.

**Таблица 21. Левкоцити (mean, SD, SE) в зависимост от серумните нива на 25(OH)D**

25 (OH)D	Leu mean		SD		SE		P
	мъже/жени	мъже/жени	мъже/жени	мъже/жени	мъже/жени	мъже/жени	
Дефицит <10 ng/ml	4.59	6.75	0.33	3.29	0.33	1.90	Мъже p = 0.039238
Недостиг 10-30 ng/ml	5.64	5.41	1.50	1.60	0.17	0.31	
Достатъчно >30	6.07	6.14	0.22	3.20	0.22	1.31	

Средните стойности на общият брой левкоцити при мъже с дефицит и недостиг на 25(OH)D са сигнификантно по-ниски от средните стойности на левкоцитите при пациенти с нормални серумни нива ( $p=0.039238$ ). При жените не се установяват статистически значими разлики между групите. Сигнификантни различия в показателите на кръвната картина между групите, разделени по серумни нива на 25(OH)D, установихме само по отношение на средните стойности на хемоглобин и левкоцити.

## 5.2.Биохимични показатели

На таблица 22 са представени средните стойности на кръвната захар и стандартните отклонения за трите групи.

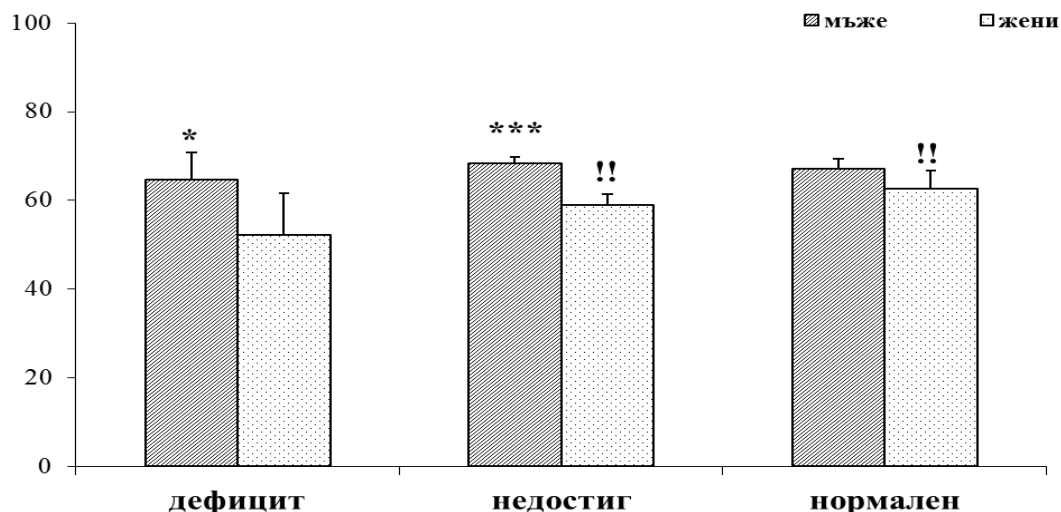
Средната стойност на кръвната захар при жени с дефицит на 25(OH)D е достоверно по-висока от тези на другите две групи - с недостиг и с нормални стойности ( $p=0.045022$ ,  $p=0.049871$ ). При мъже не се установяват значими разлики (табл.22).

**Таблица 22. Серумна глюкоза (mean, SD, SE) в зависимост от нивата на 25(OH)D**

25 (OH)D	Glu mean		SD		SE		P
	мъже	жени	мъже	жени	мъже	жени	
Дефицит <10 ng/ml	5.85	5.95	0.55	1.03	0.17	0.20	Жени $p = 0.045022$ $p = 0.049871$
Недостиг 10-30 ng/ml	5.72	5.54	0.89	0.61	0.10	0.25	
Достатъчно >30	5.80	4.84	0.94	0.39	0.14	0.23	

Средната стойност на креатинина при мъже с дефицит на 25(OH)D е сигнификантно по-ниска от тази на мъжете с недостиг и нормални стойности ( $p=0.029143$ ,  $p=0.000911$ ).

Статистически значими различия на средните на креатинина между мъже и жени, които са логични поради различията в референтните граници, се установяват само в групите с недостиг и нормални серумни нива на 25(OH)D, но не и в групите с дефицит ( $p=0.001260$ ,  $Z= 2.80000$ ,  $p=0.005111$ ) (фиг.14).



Фиг. 14 Креатинин ( $\text{mean} \pm \text{SE}$ ) на изследваните пациенти, разделени според серумните нива на 25(OH)D (дефицит <10 ng/ml, недостиг - 10-30 ng/ml и нормален > 30 ng/ml).

\*  $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ! - достоверните разлики между половете

Достоверни разлики в биохимичните показатели между групите според серумните нива на 25(OH)D установяваме само по отношение на кръвната захар и креатинина.

### 5.3. Брой CD4 клетки

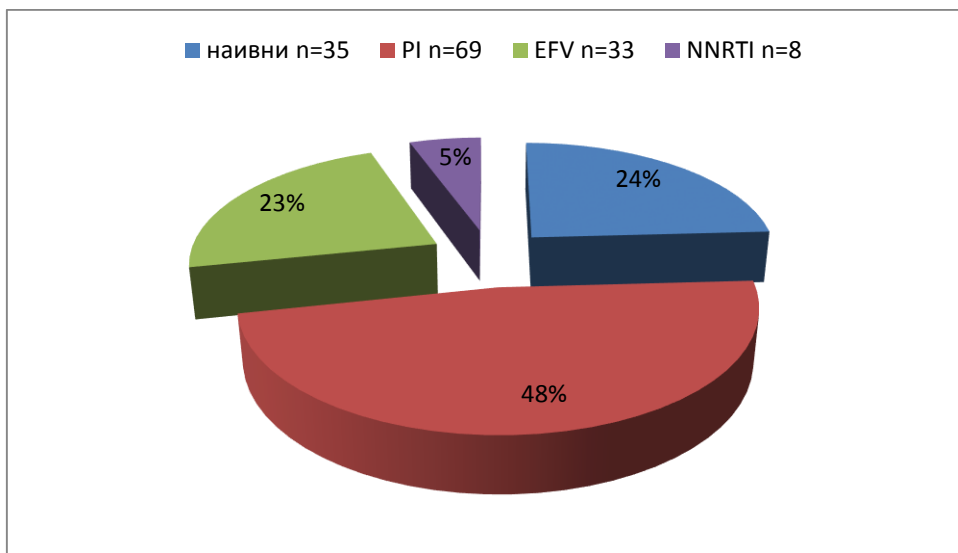
На таблица 23 са представени средните стойности на CD4 клетките, според серумното ниво на 25(OH)D. Средната стойност на броя CD4 клетки/ $\mu\text{L}$  при жените с нормални серумни нива на 25(OH)D е сигнификантно по-висока от съответните за пациентките с недостиг и с дефицит на 25(OH)D ( $p=0.007691$ ,  $p=0.04769$ ). В групата с нормални стойности на 25(OH)D, средната стойност на CD4 клетките при мъжете е статистически значимо по-ниска от средната стойност на CD4 клетките при жените ( $Z=2.66535$ ,  $p=0.007691$ ).

**Таблица 23. Брой на CD4 клетките (mean, SD, SE), според серумното ниво на 25(OH)D**

25 (OH)D	CD4/ $\mu$ l mean		SD		SE		P
	мъже/жени	мъже/жени	мъже/жени	мъже/жени	мъже/жени	мъже/жени	
Дефицит <10 ng/ml	395.50	380.00	281.80	341.73	89.11	197.30	Жени p= 0.04769
Недостиг 10-30 ng/ml	523.43	500.39	245.20	215.20	27.41	40.67	p=0.007691
Достатъчно >30	740.56	886.17	127.44	312.15	32.10	127.44	м/ж p = 0.007691

#### **6. Анализи на данните след разпределение на пациентите по прием и вид на приеманата антиретровирусна терапия**

За да проучим влиянието на приложеното лечение на пациентите върху измерваните параметри ги разделихме в четири групи, съответстващи на лечението: без лечение, лечение с Efavirenz (EFV), протеазни инхибитори и нуклеозидни инхибитори. В първата група са общо 35 (24.1 %) мъже и жени, във втората – 33 (22.8 %), в третата - 69 (47.6 %) и в четвъртата – 8 (5.5 %). Това разпределение е представено на фигура 15.



**Фиг. 15** Процентно разпределение на изследваните пациенти (общо жени и мъже), разделени в четири групи, според приложеното лечение. Наивни – нелекувани, EFV - efavirenz, PIs - протеазни инхибитори, NNRTI – нуклеозидни инхибитори.

Медикаментът EFV (efavirenz) е нуклеозиден инхибитор, отделянето му в самостоятелна група е с цел по-добра оценка на влиянието му върху стойностите на 25(OH)D. По литературни данни пациентите, които са на лечение с този медикамент имат най-изразено понижение на серумните нива на 25(OH)D. В групата на лекуваните с нуклеозидни инхибитори са на практика само пациенти лекувани с NVP (nevirapine).

За да оценим каква е разликата в изследваните параметри за изследваните пациенти (общо мъже и жени) в четирите групи, съответстващи на лечението приложихме еднофакторна ANOVA с фактор “група” с четири поднива - без лечение, лечение с EFV, с протеазни инхибитори и с нуклеозидни инхибитори. Анализът показва, че факторът “група” е значим ( $F = 1226.822$ ,  $p = 0.000000$ ).

За да намерим значимите разлики в проучваните параметри за четирите групи, извършихме Post Hoc Duncan тест.

## 6.1.Кръвна картина

На таблица 24 и 25 са представени средните стойности на хемоглобин и левкоцити, както и брой и процент пациенти с по-ниски от референтните стойности в различните групи според прием и вид на АРТ.

**Таблица 24. Хемоглобин (mean, SD) според вид и прием на АРТ.**

АРТ	Hb mean	SD	Пациенти с по-нисък от нормата Hb (n)	Пациенти с по-нисък от нормата Hb(%)	P
Наивни пациенти n=35	146.6	15.0	6	17.1	p>0.05 за всички групи
Лекувани с EFV n=33	146.4	15.1	2	6	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	137.4	7.3	1	12.5	
Лекувани с PIs n=69	140.8	16.1	18	26.1	

Не установяваме статистически значими разлики в средните стойности на хемоглобина и левкоцитите при разделянето на пациентите според прием и вид на антиретровирусна терапия. По-ниски от референтните стойности за хемоглобин установихме при 26,1 % от пациентите на PIs, 12,5 % от пациентите на NNRTIs, 6 % от пациентите на EFV и 17,1 % от нелекуваните пациенти. Респективно по-ниски от референтните стойности левкоцити установихме при 25 % от лекуваните с NNRTIs, 15,9 % от лекуваните с PIs, 9,1 % от лекуваните с EFV и 2,8 % от нелекуваните пациенти.

**Таблица 25. Левкоцити (mean, SD) според АРТ**

АРТ	Leu mean	SD	Пациенти с по-нисък от нормата Leu (n)	Пациенти с по-нисък от нормата Leu(%)	P
Наивни пациенти n=35	5.7	1.7	1	2.8	<b>p&gt;0.05</b> за всички групи
Лекувани с EFV n=33	5.2	1.3	3	9.1	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	5.0	1.7	2	25	
Лекувани с PIs n=69	5.8	1.7	11	15.9	

Средните стойности на еритроцитите, според прием и вид на АРТ са представени на таблица 26.

**Таблица 26. Еритроцити (mean, SD) според АРТ**

АРТ	Er mean	SD	Пациенти с по-ниски от нормата Er (n)	Пациенти с по-ниски от нормата Er(%)	P
Наивни пациенти n=35	4.78	0.57	1	2,9	<b>Наивни/лекувани</b> <b>p = 0.004238</b>  <b>EFV/NVP</b> <b>(p =0.003276)</b>
Лекувани с EFV n=33	4.44	0.55	3	19	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	3.53	0.79	6	37.5	
Лекувани с PIs n=69	4.18	0.64	10	14.5	

Средната стойност на еритроцитите при нелекуваните пациенти е сигнификантно по-висока от съответната за групата на лекуваните с нуклеозидни инхибитори (NVP) и протеазни инхибитори ( $p=0.004238$ ). Средната стойност на еритроцитите на пациентите, лекувани с EFV е достоверно по-висока от съответната за лекуваните с нуклеозидни инхибитори (Nevirapin) ( $p=0.003276$ ). Анализирахме каква част от тези пациенти имат в антиретровирусната си комбинация медикамента AZT, за да преценим дали получения резултат не се дължи на неговия прием. Няма значима разлика - в групата на пациентите, лекувани с Efavirenz 12,1 % имат в комбинацията си AZT, а от лекуваните с Nevirapine 12,5 %.

В допълнение на горните резултати в групата на нелекуваните при 2,9 % от пациентите, стойността на еритроцитите е по-ниска от долната референтна граница. В останалите групи - 37,5 % от лекуваните с NNRTIs (NVP), 19 % от лекуваните с EFV и 14,5 % от лекуваните с PIs пациенти, са със стойности на еритроцитите по-ниски от референтните.

Средните стойности на тромбоцитите и стандартните отклонения за различните групи според АРТ са представени на таблица 27. От лекуваните с EFV 6,6 % и 5,4 % от наивните пациенти са със стойности на тромбоцитите по-ниски от референтната граница. В останалите две групи - 1,4% от пациентите на лечение с PIs и 12,5% от лекуваните с NNRTIs са с по-ниски от референтните стойности на тромбоцитите. Същото процентно съотношение - 1,4 % от лекуваните с PIs и 12,5 % от лекуваните с NNRTIs са със стойности на тромбоцитите над горната референтна граница.

Средната стойност на тромбоците на пациентите, лекувани с NNRTIs (Nevirapin) е достоверно по-висока от съответната средна на нелекуваните пациенти ( $df=128$ ,  $p=0.032396$ ). Средната стойност на тромбоцитите на групата, лекувана с PIs е по-висока от тази на лекуваните с EFV ( $p=0.039528$ ).

**Таблица 27. Тромбоцити (mean, SD, брой и % пациенти с отклонения)**

ART	Thr mean	SD	Abnorm Thr		P
			n	%	
Наивни пациенти n=35	224.14	64.29	2	5,4	NVP/наивни p=0.032396  PIs/EFV p=0.039528
Лекувани с EFV n=33	226.45	85.32	2	6,6	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	282.88	117.21	1/1	12,5/12,5	
Лекувани с PIs n=69	253.77	85.32	1/1	1,4/1,4	

## 6.2. Биохимични показатели

Средните стойности, съответните стандартни отклонения на ALT и броят и % пациенти с повишени стойности са представени на таблица 28.

Сигнификантно по-висока е средната стойност на ALT при пациентите, лекувани с NNRTIs (Nevirapin) спрямо съответната на лекуваните с протеазни инхибитори. За останалите групи не се установиха значими различия (df=128, p=0.049865).

В групата на лекуваните с NNRTIs (NVP) при 37,5 % се установяват повишени стойности на ALT, като 25 % (n=2) от пациентите са коинфектирани с хепатити. От пациентите на лечение с EFV- 33,3 % са с повишени стойности на ALT, като коинфектираните с хепатит в тази група са 15 % (n=5). В групата на нелекуваните пациенти 17,1 % са сповишени стойности на ALT, като 25,9 % (n=9) от пациентите са коинфектирани с

хепатити. При пациентите на лечение с PIs, повишени над нормата стойности на ALT се установиха при 14,4 %(n=10). В същата група 18,6 % (n=13) от пациентите са коинфектирани с хепатити.

**Таблица 28. ALT (mean, SD) според приеманата терапия**

ART	ALT mean	SD	Abnorm ALT		P
			n	%	
Наивни пациенти n=35	44.85	28.90	6	17,1	NNRTIs/PIs  p = 0.049865
Лекувани с EFV n=33	49.30	49.56	11	33,3	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	50.88	44.85	3	37,5	
Лекувани с PIs n=69	29.39	17.58	10	14,4	

Средните стойности на холестерола при изследваните пациенти в зависимост от терапията, стандартните отклонения и пациентите (брой и процент) с повишен холестерол са представени на таблица 29. Средната стойност на холестерола в групата на лекуваните с EFV е достоверно по-висока само от тази на групата на нелекуваните (df =128, p=0.04986).

В групата на лекуваните с NNRTIs 37,5% са със стойности на холестерола над референтната граница. От групата на лекуваните с EFV 33,3 % от изследваните пациенти са с повишен холестерол. В групата на лекуваните с PIs 21,7 % от пациентите, а от нелекуваните пациенти 5,4 % са с повишен холестерол.

**Таблица 29. Общ холестерол (mean, SD, брой и % пациенти с повишени стойности), според приеманата АРТ**

АРТ	Total chol Mean	SD	Abnorm chol		P
			n	%	
Наивни пациенти n=35	4.46	1.11	2	5,4	EFV/наивни p = 0.04986
Лекувани с EFV n=33	5.88	4.85	11	33,3	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	5.51	2.31	3	37,5	
Лекувани с PIs n=69	5.06	1.61	15	21,7	

На таблица 30 са представени съответните средни стойности, стандартни отклонения и брой и % пациенти с повишени стойности на кръвна захар. Няма значими различия в средните стойности на кръвната захар в зависимост от приема или вида на АРТ. При пациентите, лекувани с PIs в 24,6 % се установява повишена стойност на кръвната захар. При 37,5 % от лекуваните с NNRTIs (NVP), 36,9% от лекуваните с EFV и 5,4 % от нелекуваните са с повишени стойности на кръвната захар.

**Таблица 30. Кръвна захар (mean, SD, брой и % пациенти с повишени стойности), според приеманата АРТ**

АРТ	Glu Mean	SD	Abnorm glu n	%	P
Наивни пациенти n=35	5.86	0.78	2	5,4	p>0.05 за всички групи
Лекувани с EFV n=33	5.66	0.86	12	36,9	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	6.20	0.83	3	37,5	
Лекувани с PIs n=69	5.76	0.97	17	24,6	

На таблица 31 са представени средните стойности и стандартни отклонения на креатинин.

Няма значими различия в средните стойности на креатинина в зависимост от приема или вида на приеманата АРТ. Няма и пациенти със стойности извън референтните граници.

**Таблица 31. Креатинин (mean, SD), според прием и вид АРТ**

АРТ	Креатинин mean	SD	P
Наивни пациенти n=35	68.7	13.6	p>0.05 за всички групи
Лекувани с EFV n=33	64.2	17.4	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	66.2	25.3	
Лекувани с PIs n=69	68.2	14.2	

### 6.3. Серумно ниво на 25(OH)D

В групата на лекуваните с EFV 94 % от пациентите са с понижени серумни нива на 25(OH)D, като 21 % са с дефицит (<10 ng/ml) и 73 % са с недостатъчност (10-30 ng/ml). Само 6 % от тази група са с нормални серумни нива на 25(OH)D.

В групата на лекуваните с ненуклеозидни инхибитори (nevirapin) 87,7 % от пациентите са с понижени серумни нива на 25(OH)D, като 77,5 % са с недостатъчност и 12,5 % с дефицит.

В групата на лекуваните с протеазни инхибитори общо 78,2 % от пациентите са с по-ниски от нормалните стойности на серумния 25(OH)D, като 2,9 % са с дефицит, 65,3 % са с недостатъчност и 21,6 % са с нормални серумни нива на 25(OH)D.

При нелекуваните пациенти 80 % са с понижени стойности на 25(OH)D, като 74,3 % са с недостатъчност и 5,7 % са с дефицит. В тази група 20 % са с нормални серумни стойности на 25(OH)D.

Средните стойности на серумните нива на 25(OH)D според приеманата терапия, както и броят и % пациенти с понижени серумни нива са представени на таблица 32. Не се установиха значими различия в средните стойности на серумните нива на 25(OH)D при разделяне на пациентите според прием и вид на антиретровирусна терапия.

**Таблица 32. Серумни нива на 25(OH)D (mean, SD, брой и % пациенти с понижени стойности), според прием и вид АРТ**

АРТ	25(OH)D Mean	SD	Дефицит 25(OH)D <10 ng/ml		Недостиг 25(OH)D 10-30 ng/ml		P
			n	%	n	%	
Наивни пациенти n=35	21.26	14.79	2	5,7%	26	74,3 %	p>0.05 за всички групи
Лекувани с EFV n=33	17.12	11.23	7	21 %	24	73%	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	20.43	7.48	1	12,5%	6	77,5 %	
Лекувани с PIs n=69	23.04	14.59	2	2,9%	52	63,5	

#### 6.4.Брой на CD4 клетки

Средните, минималните и максималните стойности на CD4 клетките, според приеманата терапия са представени на таблица 33. Средните стойности на CD4 клетките не се различават значимо в групите, разделени според прием и вид на антиретровирусната терапия (df=143, p=0.393).

**Таблица 33. Брой CD4 клетки (min, max, mean, SD, ) според прием и вид на АРТ**

АРТ	Min CD4/ $\mu$ L	Max CD4/ $\mu$ L	Mean CD4/ $\mu$ L	SD	P
Наивни пациенти n=35	116	1283	527.17	221.61	p = 0.39363
Лекувани с EFV n=33	63	834	431.67	195.74	
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	63	963	533.00	318.06	
Лекувани с PIs n=69	44	1474	549.54	221.61	

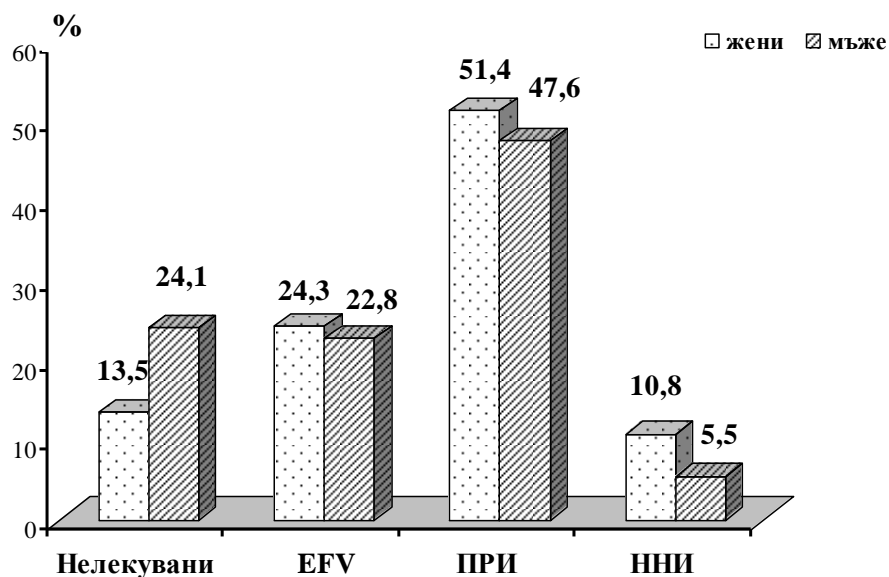
На таблица 34 е представено разпределението на пациентите според степента на имунен дефицит (според класификацията на CDC в зависимост от броя на CD4 клетките) и приеманата АРТ. В групата с най-тежък имунен дефицит, съответно брой на CD4 клетки  $<200/\mu$ l, най-голям дял е на пациентите, лекувани с EFV – 44,5%. Респективно в групата с нормален брой на CD4 клетките  $>500/\mu$ l, най-голям е процентът на лекуваните с протеазни инхибитори – 51,5 %.

**Таблица 34. Разпределение на пациентите (n,%) според АРТ и степен на имуен дефицит.**

Брой на CD4 /mcl	Наивни		Лекувани с PIs		Лекувани с EVF		Лекувани с NNRTIs (NVP)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CD4 <200 n=9	1	11,1	2	22,2	4	44,5	2	22,2
CD4 200-499 n=70	19	27,1	33	47,1	14	20	4	5,8
CD4 >500 n=66	15	22,7	34	51,5	15	22,7	2	3,1

#### **7. Анализи след разделяне на групите според прием и вид на АРТ и пол**

Всяка от четирите групи, определени по приемана терапия или липса на такава, разделихме на подгрупи мъже и жени. Целта беше да се установи дали има разлика в проучваните параметри. Такава разлика се очакваше, поради получените разлики в изследваните показатели при разделяне на общата група само по пол. Процентното разпределение е показано на фиг.16. Не установяваме достоверна разлика в процентното разпределение на мъжете и жените в четирите групи.



**Фиг.16** Процентно разпределение на изследваните жени и мъже, разделени в четири групи, според приложеното лечение. EFV - efavirenz, ПРИ - протеазни инхибитори, ННИ – нуклеозидни инхибитори.

За да се оцени каква е разликата в изследваните параметри за изследваните мъже и жени в четирите групи, съответстващи на лечението приложихме еднофакторна ANOVA с фактор “група” с четири поднива - без лечение, лечение с EFV, протеазни и нуклеозидни инхибитори.

Приложената еднофакторна ANOVA за групата на мъжете показва, че факторът “група” е значим ( $F=975.5542$ ,  $p=0.000000$ ). Приложената еднофакторна ANOVA и за групата на жените показва, че факторът “група” е значим ( $F=631.0703$ ,  $p=0.000000$ ).

На таблица 35 са представени средните стойности на проследените показатели на изследваните мъже, според прием и вид на приеманата АРТ. Съответно на таблица 36 са представени средните стойности на проследените показатели на изследваните жени, според прием и вид на приеманата АРТ.

**Таблица 35. Средни стойности на проследените показатели на изследваните мъже, разпределени според прием и вид на АРТ**

АРТ	Hb	Er	Leu	Thr	glu	chol	creat	ALT	CD4	25(OH)D
Наивни пациенти n=30	150.10	4.80	5.60	217.30	5.80	4.40	70.70	34.60	498.00	19.40
Лекувани с EFV n=24	152.30	4.60	5.20	226.00	5.60	5.60	67.90	57.10	430.10	18.50
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=4	142.80	3.80	4.40	262.00	6.00	4.50	81.20	75.30	482.00	17.50
Лекувани с PIs n=50	145.10	4.20	5.80	243.90	5.80	4.90	70.00	32.00	544.40	23.50

**Таблица 36. Средни стойности на проследените показатели на изследваните жени, разпределени според прием и вид на АРТ**

АРТ	Hb	Er	Leu	Thr	glu	chol	creat	ALT	CD4	25(OH)D
Наивни пациенти n=5	125.40	4.60	6.00	265.20	6.20	4.60	56.20	26.60	702.20	32.40
Лекувани с EFV n=9	130.70	3.90	5.10	227.70	5.80	5.70	54.20	28.40	435.80	13.40
Лекувани с NNRTI (NVP) n=4	132.00	3.90	5.60	303.80	6.40	6.50	51.20	26.50	584.00	23.40
Лекувани с PIs n=19	129.50	4.00	5.80	279.70	5.50	5.40	63.50	22.50	563.10	21.80

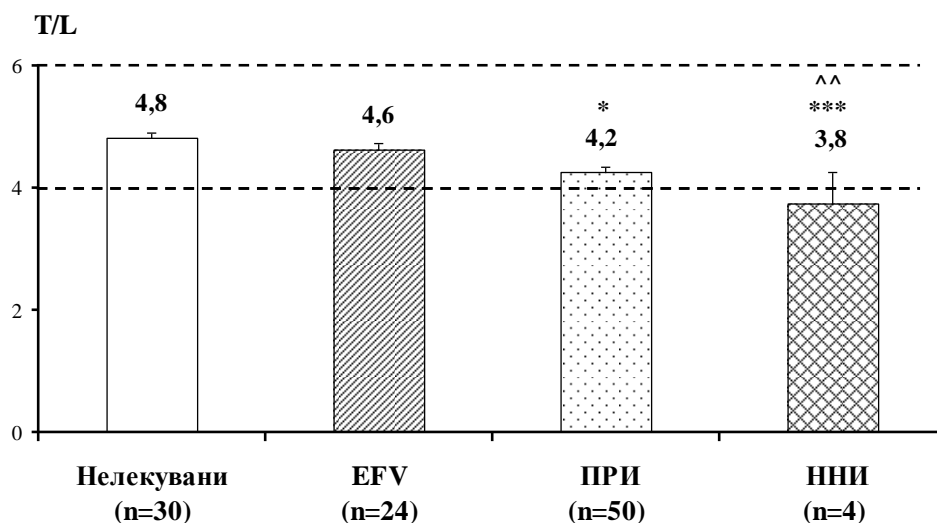
## 7.1. Кръвна картина

### 7.1.1. Мъже

Статистически значими разлики между групите мъже, разделени по прием и вид на антиретровирусната терапия установихме само по отношение на средните стойности на еритроцитите и левкоцитите. Не се установиха сигнификантни различия в средните стойности на хемоглобина и тромбоцитите.

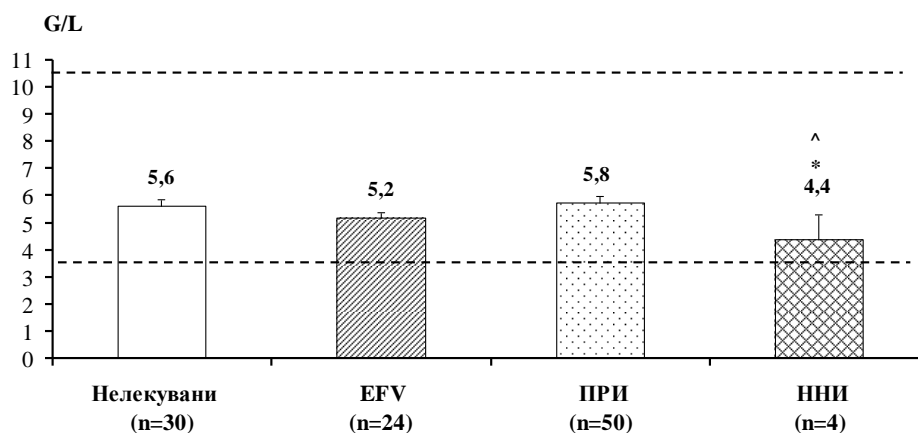
Средната стойност на еритроцитите на нелекуваните мъже е достоверно по-висока от тези на мъжете, лекувани с протеазни и нуклеозидни инхибитори ( $df=104$ ,  $p=0.041133$ ,  $p=0.000199$ ).

Средната стойност на еритроцитите на мъжете, лекувани с EFV е достоверно по-висока от тази на мъжете, лекувани с NNRTIs (Nevirapin) ( $df=104$ ,  $p=0.001448$ ) (фиг.17).



**Фиг.17** Еритроцити ( $mean \pm SE$ ) на изследваните мъже. EFV-efavirenz, ПРИ-протеазни инхибитори, ННИ–нуклеозидни инхибитори (NVP). Достоверните разлики между групата нелекувани и групите ПРИ и ННИ са означени с \* и \*\*\* ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ), а между групата, лекувана с EFV и ННИ с ^ ( $p < 0.01$ ).

Средните стойности на левкоцитите на нелекуваните мъже и лекуваните с PIs са достоверно по-високи от тези на мъжете, лекувани с NNRTIs (NVP) ( $df=104$ ,  $p=0.042414$ ,  $p=0.0301124$ ) (фиг.18).

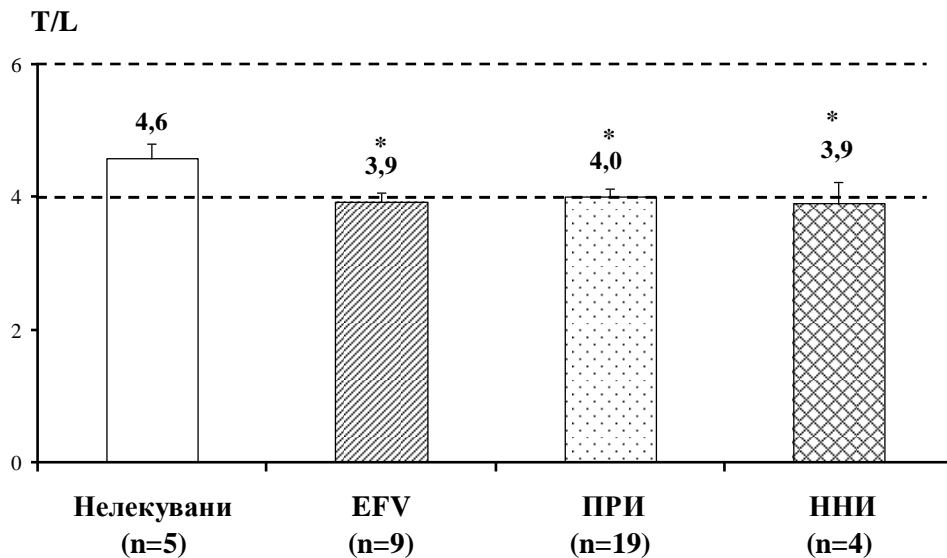


**Фиг.18** Левкоцити ( $mean \pm SE$ ) на изследваните мъже. EFV-efavirenz, ПРИ-протеазни инхибитори, ННИ–ненуклеозидни инхибитори (NVP). Достоверните разлики между групата ННИ и групите нелекувани и ПРИ са обозначени с \* и ^ ( $p < 0.05$ ).

### 7.1.2. Жени

От изследваните кръвни параметри намерихме статистически достоверни разлики между групите с различна АРТ, само в стойностите на еритроцитите. Не се установиха сигнификантни различия в средните стойности на хемоглобина, левкоцитите и тромбоцитите между групите жени, според прием и вид на АРТ.

Средната стойност на еритроцитите на нелекуваните жени е сигнификантно по-висока от тази на трите останали групи - лекувани с EFV, протеазни и ненуклеозидни инхибитори ( $df=33$ ,  $p=0.0029961$ ,  $p=0.04374$ ,  $p=0.031843$ ) (фиг.19).



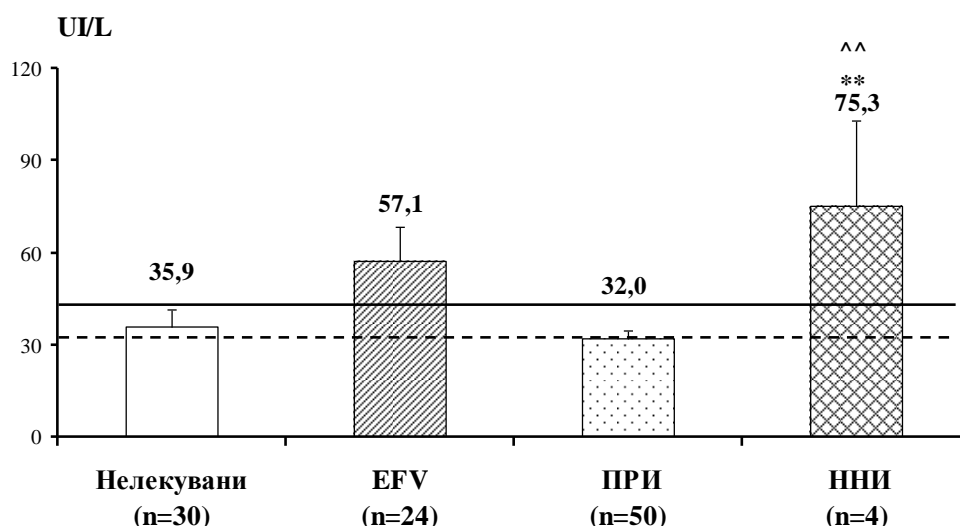
**Фиг.19** Еритроцити (mean±SE) на изследваните жени. EFV-efavirenz, ПРИ-протеазни инхибитори, ННИ-ненуклеозидни инхибитори (NVP). Достоверните разлики между групата нелекувани и останалите групи са означени с \* ( $p < 0.05$ ).

## 7.2. Биохимични показатели

### 7.2.1. Мъже

От изследваните биохимични параметри установихме статистически значими различия между отделните терапевтични групи само в средните стойности на ALT. За останалите биохимични показатели - кръвна захар, холестерол и креатинин не бяха установени сигнификантни различия между четирите групи мъже, разделени спрямо получаваното лечение.

Средната стойност на ALT на мъжете, лекувани с NNRTIs (nevirapin) е сигнификантно по-висока от средните на нелекуваните мъже и на лекуваните с PIs ( $df=104$ ,  $p=0.009804$ ,  $p=0.005635$ ) (фиг.20).



**Фиг.20** ALT (mean±SE) на изследваните мъже. Достоверната разлика между групата нуклеозидни инхибитори (ННИ) и групите нелекувани и протеазни инхибитори (ПРИ) са означени с \*\* и ^^ ( $p < 0.01$ ).

### 7.2.2. Жени

Анализите на биохимичните показатели в групите жени, според прием и вид на АРТ, не установиха сигнификантни различия.

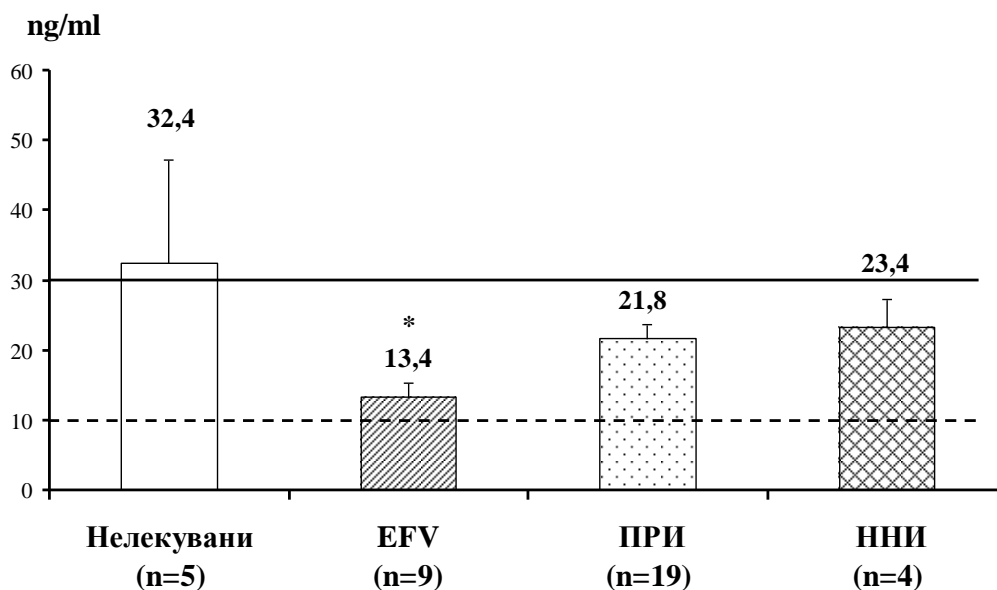
## 7.3. Серумни нива на 25(OH)D

### 7.3.1. Мъже

Анализите ни не установиха статистически достоверни разлики в средните стойности на серумните нива на 25(OH)D между групите мъже, според прием и вид АРТ.

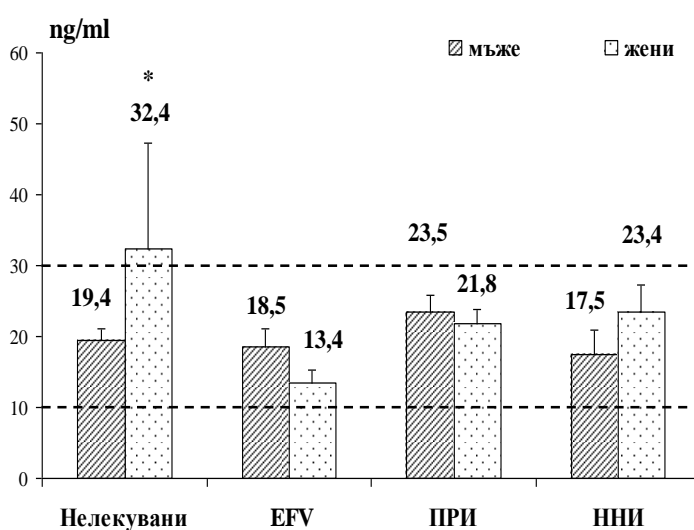
### 7.3.2. Жени

Средната стойност на 25(OH)D на нелекуваните жени е сигнификантно по-висока от тази на жените, лекувани с EFV ( $df=33$ ,  $p=0.026746$ ) (фиг.21).



**Фиг.21** 25(OH)D (mean±SE) на изследваните жени. Достоверните разлики между групата нелекувани и останалите групи са означени с \* ( $p < 0.05$ ). Стойностите под пунктираната линия показват дефицит, тези над плътната линия - нормални стойности, а между двете линии - недостиг на 25(OH)D.

Средните стойности на 25(OH)D при нелекуваните жени е сигнификантно по-висока от тази на нелекуваните мъже ( $df=33$ ,  $p=0.050$ ). За останалите групи не намерихме статистически достоверни разлики между средните стойности за мъжете и жените (фиг.22).



**Фиг.22** 25(OH)D (mean±SE) на изследваните мъже и жени. Достоверните разлики между групата на мъжете и тази на жените са означени с \* ( $p=0.05$ ).

## 7.4. Брой на CD4 клетки

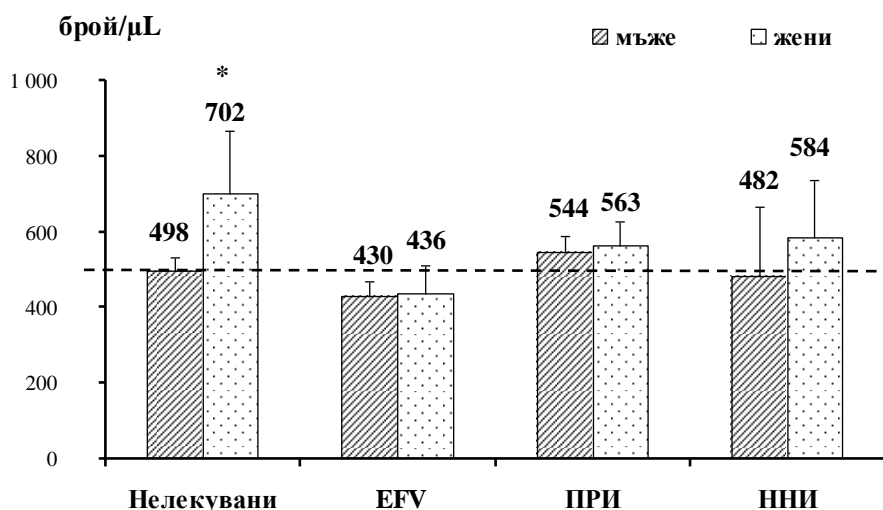
### 7.4.1. Мъже

Анализите ни не установиха статистически значими разлики в средните стойности на CD4 клетките при мъжете, разделени според прием и вид АРТ.

### 7.4.2. Жени

Анализите не установиха и достоверни разлики между средните стойности на броя на CD4 клетките в групите жени, според прием и вид АРТ.

Установихме, че средната стойност на броя на CD4 клетките за групата на нелекуваните жени е достоверно по-висока от тази на нелекуваните мъже ( $df=33$ ,  $p=0.050$ ) (фиг.23). За останалите групи не намерихме достоверни разлики между средните стойности на CD4 клетките за мъжете и жените.



**Фиг.23** Брой CD4 клетки ( $mean \pm SE$ ) на изследваните мъже и жени. Достоверните разлики между групата на мъжете и тази на жените са означени с \* ( $p < 0.05$ ).

## **8. Корелационни анализи за взаимовръзки между серумните нива на 25(OH)D и останалите изследвани параметри**

Друг статистически метод, който използвахме за обработка на получените данни е корелационен анализ. Използвахме следната скала за степен на корелация:  $R < 0,3$  – слаба корелация,  $0,3 < R < 0,5$  – умерена корелация и  $0,5 < R < 0,7$  – значителна корелация. Анализирахме възможни корелации между серумните нивата на 25(OH)D и биохимичните показатели - кръвна захар, холестерол, креатинин и ALT. Също така беше анализирана възможността за корелация между серумните нива на 25(OH)D и брой на CD4 клетките.

### **8.1. Корелации между 25(OH)D и биохимичните показатели**

При изследваните пациенти се установи умерена корелация между серумните нива на 25(OH)D и серумните нива на общия холестерол при пациенти във възрастова група 30-40 г. ( $r=0.38$ ,  $p<0.05$ ). При селектиране на пациентите и по пол отново умерена корелация със статистическа достоверност беше установена при мъже във възрастова група 30-40 г. Не са установени корелации в останалите групи.

При последващ анализ разделихме пациентите според серумното им ниво на 25(OH)D в групи с дефицит, недостиг и нормални стойности. В групата с дефицит на 25(OH)D (общо мъже и жени) се установиха статистически значими обратни корелации между серумните нива на 25(OH)D и стойностите на кръвната захар ( $r=-0.47$ ,  $p=0.038655$ ) и ALT ( $r=-0.58$ ,  $p=0.01356$ ). Понижаването на серумното ниво на 25(OH)D корелира с повишаването на кръвната захар и ALT. Положителна корелация със статистическа достоверност се установи и със стойностите на холестерола.

Тези резултати са представени на таблица 37.

***Таблица 37. Корелации между серумното ниво на 25(OH)D и стойностите на биохимичните показатели на цялата група пациенти***

Серумно ниво на 25(OH)D	glu	chol	ALT	creat	p
Дефицит <10 ng/ml (n=13)	<b>-0.47</b>	<b>0.309</b>	<b>-0.58</b>	<b>-0.242</b>	p=0.038655 p=0.01356
Недостиг 10-30 ng/ml (n = 108)	-0.071	-0.067	0.0071	0.016	
Норма >30 ng/ml (n=24)	<b>0.36</b>	-0.025	0.09	<b>0.35</b>	

*Таблица 38. Корелации между серумното ниво на 25(OH)D и стойностите на биохимичните показатели при мъже*

Серумно ниво на 25(OH)D	glu	chol	ALT	creat	p
Дефицит <10 ng/ml (n=10)	<b>-0.38</b>	<b>0.325</b>	<b>-0.58</b>	<b>-0.177</b>	p<0.05
Недостиг 10-30 ng/ml (n=80 )	-0.011	-0.068	0.123	-0.076	
Норма >30 ng/ml (n=18)	0.244	0.15	0.073	<b>0.438</b>	

Аналогичен резултат получихме при мъжете с дефицит на 25(OH)D. Установи се умерена обратна корелация отново с кръвната захар ( $r=-0.38$ ,  $p<0.05$ ) и значима обратна корелация с ALT( $r=-0.58$ ,  $p<0.05$ ). Положителна

корелация намерихме между 25(OH)D и креатинин в групата с нормални серумни нива на 25(OH)D. Тези резултати са представени на таблица 38.

В групата на жените с нормални серумни нива на 25(OH)D се установиха значими положителни корелации между серумните нива на 25(OH)D и кръвната глюкоза ( $r=0.8$ ,  $p<0.05$ ) и също така между 25(OH)D и креатинин ( $r=0.75$ ,  $p<0.05$ ). При нормални стойности на 25(OH)D, повишаването на серумното му ниво корелира с повишение на креатинина и кръвната захар. Резултатите са представени на таблица 39.

**Таблица 39. Корелации между серумното ниво на 25(OH)D и стойностите на биохимичните показатели при жени**

Серумно ниво на 25(OH)D	glu	chol	ALT	creat	p
Дефицит <10 ng/ml (n=3)	-0.12	0.23	- 0.0964	0.14	p<0.05
Недостиг 10-30 ng/ml (n = 28)	-0.189	-0.18	-0.191	0.25	
Норма >30 ng/ml (n=6)	<b>0.8</b>	-0.16	-0.259	<b>0.775</b>	

## 8.2. Корелации между серумното ниво на 25(OH)D и броят на CD4 клетките

Корелационният анализ е направен за отделните групи по пол, възраст и приемана антиретровирусна терапия.

Умерена ( $r=0.37$ ,  $p<0.05$ ) положителна корелация между серумното ниво на 25(OH)D и броят на CD4 клетките установихме за възрастовата група 30-40 години. При разделяне на пациентите не само по възраст, но и по пол отново умерена положителна корелация със статистическа достоверност се установи между серумните нива на 25(OH)D и броят на CD4 клетките при мъже във възрастова група 30-40 години. Статистическата достоверност за тази група е обяснима, тъй като това е групата с най-голям брой пациенти. Значителна положителна корелация ( $r=0.5$ ,  $p<0.05$ ) със статистическа достоверност между същите показатели се установи в групата на жените, лекувани с протеазни инхибитори.

## **II. Изследване на цитокинов профил. Оценка на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху цитокиновия профил при HIV-фектирани пациенти.**

Втори етап от нашето проучване беше определяне на цитокинов профил на част от проследените до момента пациенти. На шестдесет от тези пациенти, освен изследваните и анализирани до момента показатели, са изследвани и следните цитокини: IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ . Групата беше подбрана, така че да включва повече пациенти с установен при първото изследване дефицит или недостиг на 25(OH)D и на които е препоръчана суплементация с витамин Д.

Кръвните проби са събирани в периода от м. август до м.ноември 2014 г. За да можем да оценим влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху стойностите на цитокините, направихме повторно изследване на 25(OH)D, паралелно с рутинно проследяваните лабораторни, имунологични и вирусологични показатели.

Разпределението по пол на тези 60 пациенти е представено на фиг.24.



**Фиг.24** Разпределение по пол на пациентите, проследени във втори етап от проучването (мъже=41, жени=19).

Само двама от пациентите, на които е изследван цитокинов профил, не са на лечение. Останалите (n=58, 96,6%) пациенти провеждат АРТ с различна продължителност на лечението.

### **1.Разпределение на кръвните проби на пациентите за изследване на цитокиновия профил (с и без стимулация с фитохемаглутинин)**

На тридесет от пациентите (20 мъже и 10 жени) е определен цитокинов профил *ex vivo* (определяне на концентрация на цитокините IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 в периферната кръв без предварителна стимулация). Всичките пациенти в тази подгрупа са на различен етап от началото на АРТ - съответно от 3 до 185 месеца. За улеснение ги дефинирахме като подгрупа А.

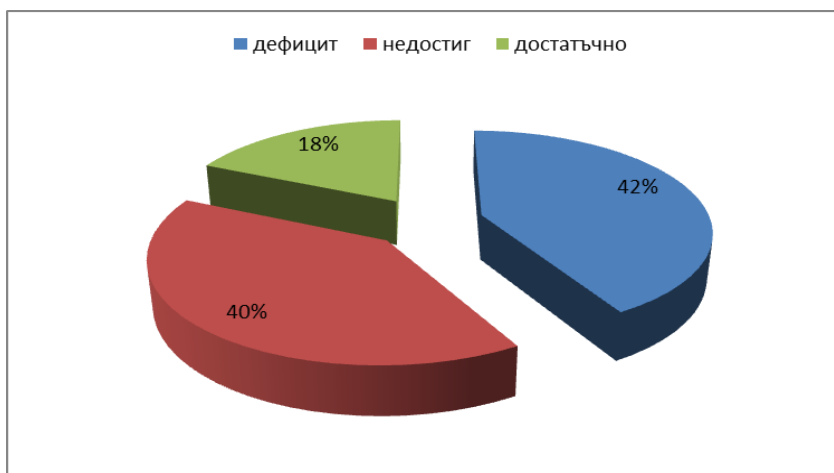
На останалите 30 пациенти (21 мъже и 9 жени) се определи цитокиновия „потенциал” – т.е. концентрацията на цитокините след неспецифична стимулация на проба от периферната кръв с фитохемаглутинин. Това са пациенти от подгрупа Б. В тази подгрупа двама от пациентите не са на лечение, останалите са на различен етап от терапията - съответно от 2 до

153 месеца от началото на лечение. За цялата група от пациенти (разделени от своя страна на подгрупи А и Б) са направени следните анализи:

- 1.1. Връзка между серумните нива на 25(ОН)D и цитокиновия профил, имунологични и вирусологични показатели на пациентите от подгрупа А
- 1.2. Връзка между серумните нива на 25(ОН)D и цитокиновия профил, имунологични и вирусологични показатели на пациентите от подгрупа Б

Повторното определяне на серумните нива на 25(ОН)D е извършено с имуноензимен метод ELFA, при който за дефицит се считат стойности под 20 ng/ml, недостатъчност е налице при стойности 20-30 ng/ml, а за нормални стойности се смятат тези над 30 ng/ml.

От изследваните пациенти 81,6 % (n=49) са с по-ниски от нормалните стойности на 25(ОН)D. При 41,6 % (n=25) от изследваните пациенти се установи дефицит, при 40% (n=24) от тях установихме недостатъчност и 18,4 % (n=11) са с нормални стойности (фиг.25).

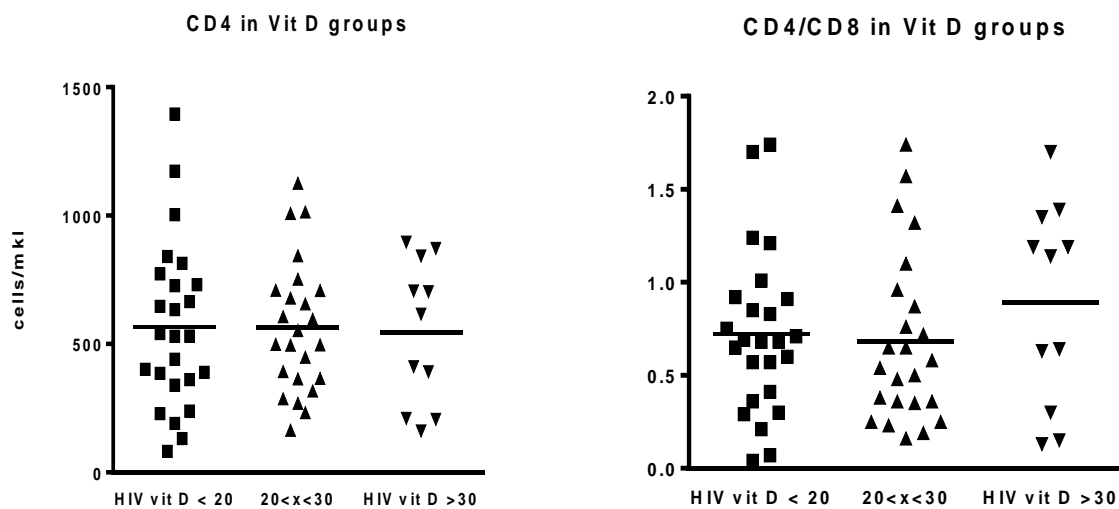


Фиг.25 Разпределение на пациентите според серумните нива на 25(ОН)D при повторното изследване.

## 2. Анализи на резултатите от проведените изследвания

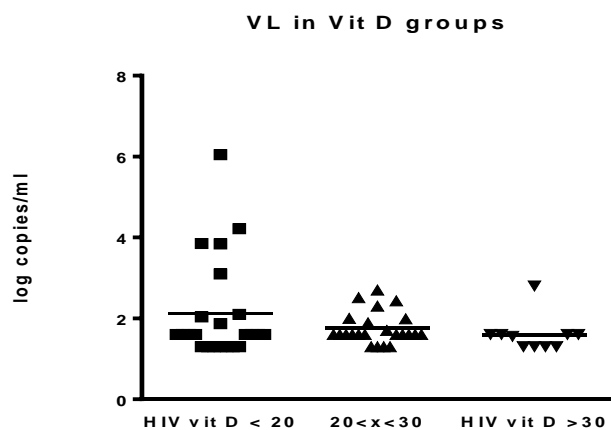
## 2.1. Оценка на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху брой CD4 клетки, индекс CD4/CD8 и вирусен товар за цялата изследвана група.

Анализите ни не установиха сигнификантна разлика между средните стойности на броя на CD4 клетките в трите подгрупи пациенти с различни нива на 25(OH)D. Не се установява и статистически значима разлика в трите групи пациенти с различни нива на 25(OH)D по отношение на индекса CD4/CD8. Пациентите с понижени нива на 25(OH)D имат тенденция за понисък индекс CD4/CD8, макар и разликата да не е статистически значима (фиг.26).



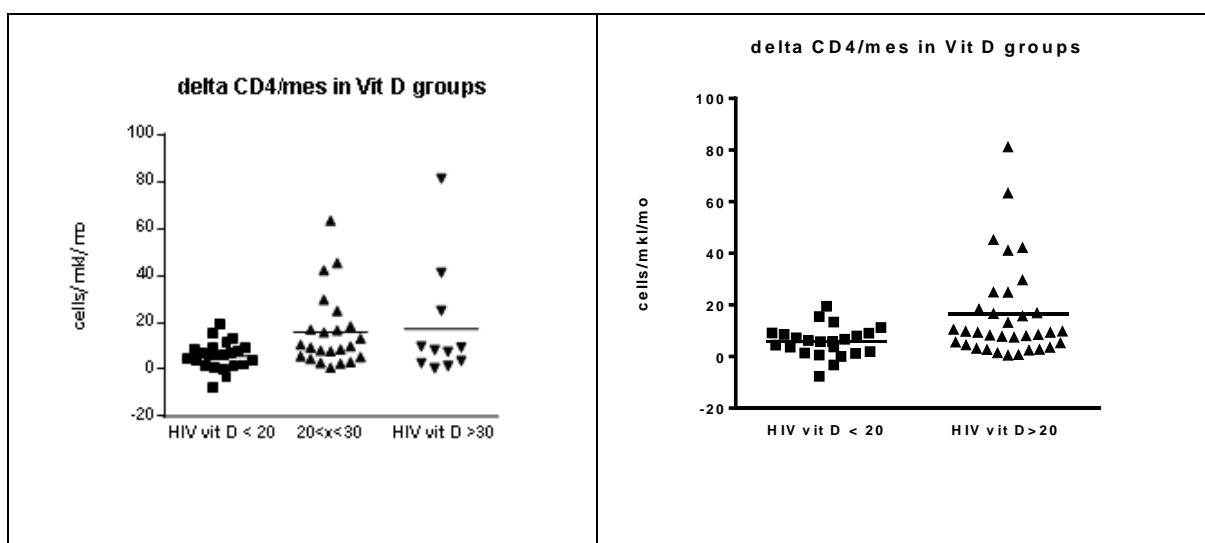
Фиг.26. Разпределение на стойностите CD4 клетки и индекс CD4/CD8 в групите с различни нива на 25(OH)D

Всички пациенти с активна вирусна репликация са в групите с намалено ниво на 25(OH)D (дефицит и недостатъчност), независимо че не се установи сигнификантна разлика между отделните сравнявани групи (фиг.27).



Фиг.27. Разпределение на стойностите на вирусния товар в групите с дефицит, недостатъчност и нормален 25(ОН)D

Тъй като анализираните пациенти се различават по продължителност на провежданата АРТ е по-коректно да се сравни скоростта на промяна на CD4, т.е. разликата между изходния и актуален брой CD4, разделена на месеците терапия. Установихме, че при пациентите със стойности на 25(ОН)D < 20 ng/ml, възстановяването на броя на CD4 клетките е по-бавно, отколкото при тези с недостатъчност (20-30 ng/ml) или нормални стойности на 25(ОН)D (mean cells/ $\mu$ l/months съответно 6; 16; 17; p=0.009 и 0.03)(фиг.28).



Фиг.28. Възстановяване на броя на CD4 клетките в зависимост от серумните нива на 25(ОН)D.

При анализа на цитокиновия профил трябва да се има предвид че:

**Референтните стойности за цитокини в серум и плазма по литературни данни варират в много широки граници!**

**2.2. Изследване на цитокинов профил *ex vivo* (без стимулация) и оценка на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D**

**2.2.1. Резултати от изследваните цитокини в подгрупа А**

Изследването на цитокинов профил без стимулация с фитохемаглутинин даде следните резултати:

А) Много ниско ниво на IL-2 – под долната граница на детекция за теста, поради което не може да бъде отчетено.

Б) Установените резултати за IFN- $\gamma$  са съответно: средна 33.6pg/l, минимална 1pg/l и максимална 63pg/l. Средната стойност е по-висока от използваните референтни стойности (13,7-19). Същевременно се очертаха две подгрупи: с много ниски (под долна референтна граница) и с много високи (над горна референтна граница) стойности на IFN- $\gamma$ .

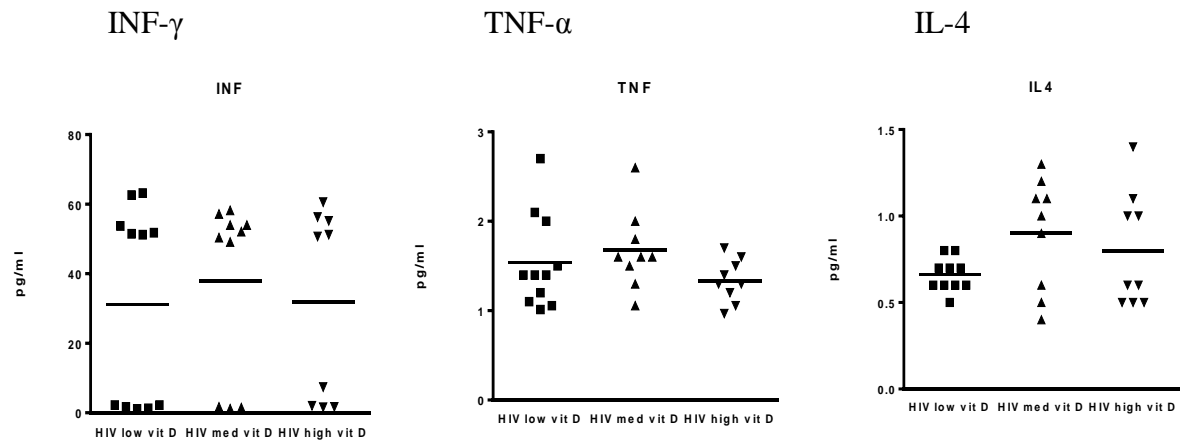
В) Установените стойности за TNF- $\alpha$  са по-ниски от използваните референтни стойности: средна 1.7 pg/l, минимална 1pg/l и максимална 6pg/l.

Г) Резултатите за IL-6 - средна стойност 1.3pg/l, минимална 0.8pg/l и максимална 4pg/l са в рамките на използвания референтен интервал.

Д) Установените нива на IL-4 - средна стойност 0.9 pg/l, минимална 0.4pg/l и максимална 2.5pg/l са в долната част на използвания референтен интервал.

Е) Резултатите за IL-10 - средна 1.4 pg/l, минимална 0.6pg/l и максимална 4pg/l са под използвания референтен интервал.

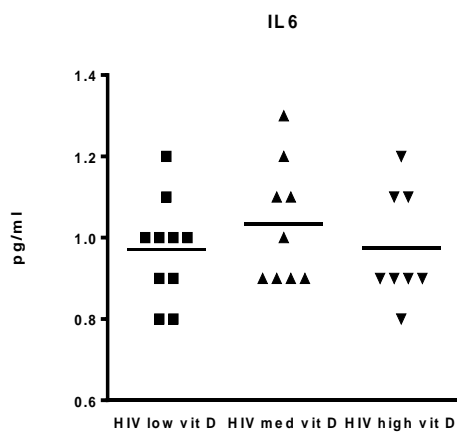
**2.2.2. Оценка на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху плазмени цитокини в подгрупа А.**



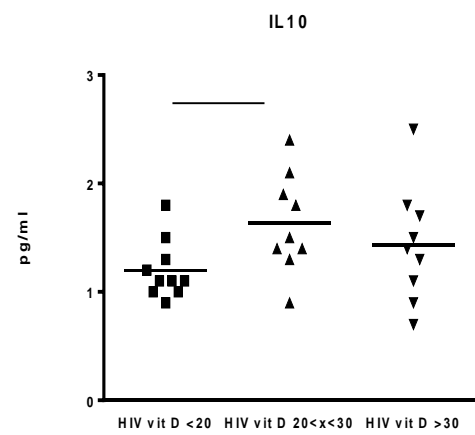
Ref. 7 - 19

Ref. 3 - 5 (6 - 20)

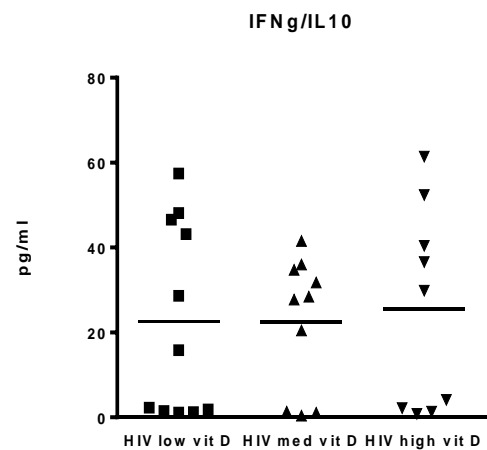
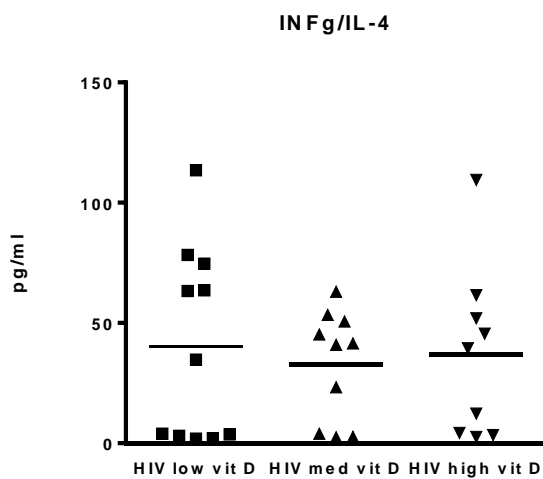
Ref. 0.4 - 77



Ref. 1.6 - 16 (0.4 - 5.6)



Ref. 2 - 7



Фиг.29. Цитокинов профил на подгрупа А

Сравнението на групите по серумни стойности на 25(OH)D по отношение на цитокиновия профил показва:

- нивата на IL-10 са понижени при пациентите с дефицит на 25(OH)D спрямо тези с недостатъчност(1,2 vs. 1,6, p=0.0265).
- Нивата на останалите цитокини не се отличават значимо между групите по 25(OH)D (p>0.05).
- Няма разлика в съотношенията IFN- $\gamma$ /IL-4 и IFN- $\gamma$ /IL-10 отразяващи природата (сила и регулация) на Th1 имунния отговор (p > 0.05). (Фиг.29)

Интерес представляваше какви са характеристиките на пациентите с много ниска и много висока експресия на IFN- $\gamma$ , поради което е направен по-подробен анализ в тези две подгрупи.

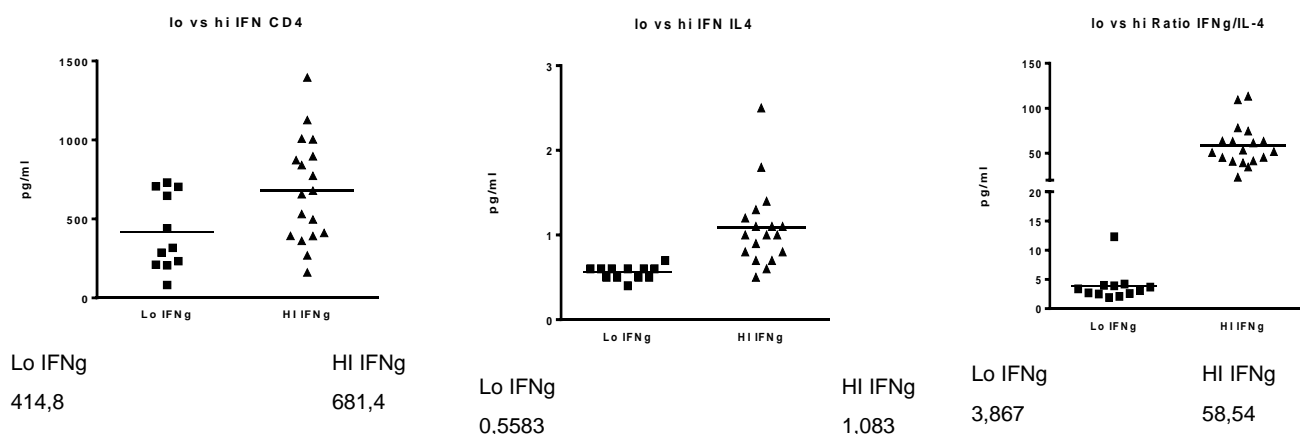
Едната подгрупа включва дванадесет пациенти с много нисък IFN- $\gamma$ . Средната стойност на IFN- $\gamma$  при тези пациенти е 2.1 pg/ml, която е под долната референтна граница. В другата подгрупа от осемнадесет пациенти е измерена средна стойност на IFN- $\gamma$  - 56 pg/ml, която е над горната референтна граница. Установи се, че тези две подгрупи се различават значимо по броя на CD4 клетките, нивото на IL-4 и съотношението IFN- $\gamma$ /IL-4.

Подгрупата с висок IFN- $\gamma$  е със значимо по-висока средна стойност на броя на CD4 клетките и по-ниска средна стойност на IL-4 сравнена с групата с нисък IFN- $\gamma$ . Респективно подгрупата с висок IFN- $\gamma$  е с по-високо съотношение IFN- $\gamma$ /IL-4, което отразява силата на Th1 имунния отговор(Фиг.30). Не се установяват сигнификантни разлики между тези две подгрупи по отношение на IL-6, IL-10 иTNF- $\alpha$ . Не се установяват също така и статистически достоверни разлики по отношение на серумните нива на 25(OH)D, вирусният товар и индексът CD4/CD8.

Брой CD4, p=0.03\*

IL-4, p < 0,0001

Ratio IFN- $\gamma$ /IL4, p< 0,0001 \*\*\*\*

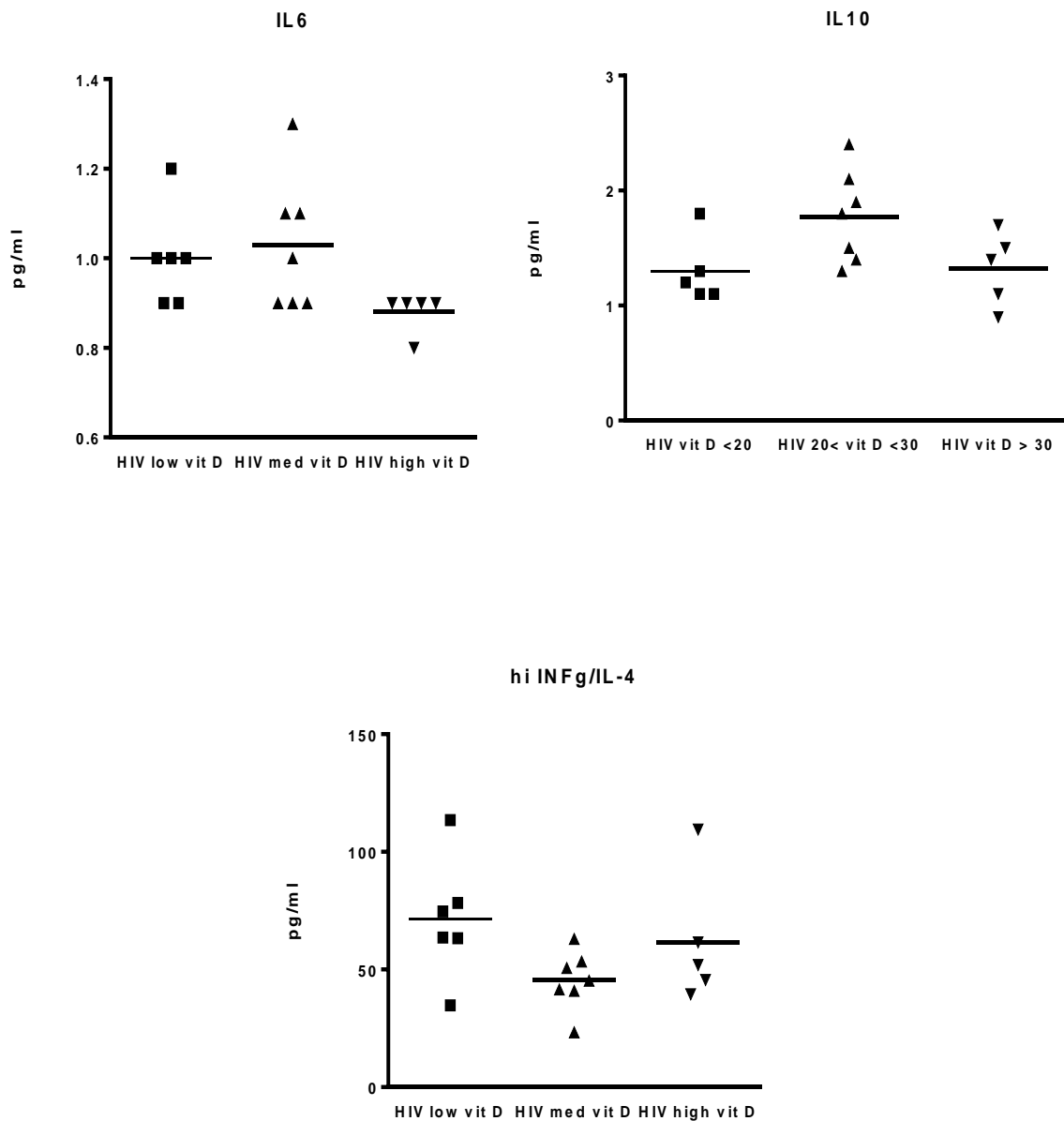


Фиг.30 Сравнение по отношение брой CD4, IL-4 и IFN- $\gamma$  /IL-4 между двете подгрупи с нисък и висок IFN- $\gamma$ .

Само в рамките на подгрупата с ниски стойности на IFN- $\gamma$  установихме връзка между серумното ниво на 25(OH)D и плазмените нива на IL-6, IL-10 и съотношението IFN- $\gamma$ /IL-4 (Th1/Th2), а именно:

- Пациентите с дефицит и недостатъчност на 25(OH)D се отличават със значимо по-високи нива на IL-6 в сравнение с пациентите, които имат нормални стойности на 25(OH)D (съответно mean = 1; 1; 0,88; p=0.04 между 1 и 3 и между 2 и 3).
- Пациентите с недостатъчност на 25(OH)D се отличават с по-ниски нива на IL-10 в сравнение с пациентите, които имат нормални стойности (mean 1,3; 1,7; 1,3; p=0.03).
- Индексът IFN- $\gamma$ /IL-4 е значимо по-нисък при пациентите с недостатъчност на 25(OH)D (mean 45 срещу 71 и 62; p = 0.035).

Тези зависимости са отразени на фиг.31



Фиг.31 Зависимост между серумните нива на 25(OH)D и плазмените нива на IL-6, IL-10 и съотношението IFN- $\gamma$ /IL-4 в подгрупата с нисък IFN- $\gamma$ .

### 2.3. Изследване на цитокинов профил след стимулация с фитохемаглутинин и оценка на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D.

Изследването на цитокинов профил след стимулация с фитохемаглутинин в подгрупа Б даде следните резултати:

А) Получените резултати за IFN- $\gamma$  показаха средна стойност 1250pg/l, при минимална стойност 16 pg/l и максимална 5400pg/l. Референтният интервал

е 2500 (350 – 4700) pg/l. Това показва, че част от пациентите със стимулирана секреция са със стойности на IFN- $\gamma$  значително под долната референтна граница. Не се очертават ясно изразени подгрупи по IFN- $\gamma$ .

Б) Стойностите на TNF- $\alpha$  са средна 1957pg/l, минимална 91 pg/l и максимална 7070pg/l, при референтен интервал 2120 (618 – 4680). И в тази подгрупа част от пациентите са под долна референтна граница.

В) Резултатите за IL-10 показват същата тенденция. Средната стойност е 174pg/l, минималната е 18 pg/l, а максималната е 445pg/l. Референтните стойности са средна - 252pg/l (минимална 203pg/l – максимална 365pg/l). Има резултати на част от пациентите обаче и над горната граница.

Г) Резултатите за IL-4 - средна 46 pg/l, минимална 6pg/, максимална - 344pg/l) при референтен интервал 79 (19 – 264). Тук намерените стойности са сравними с референтните.

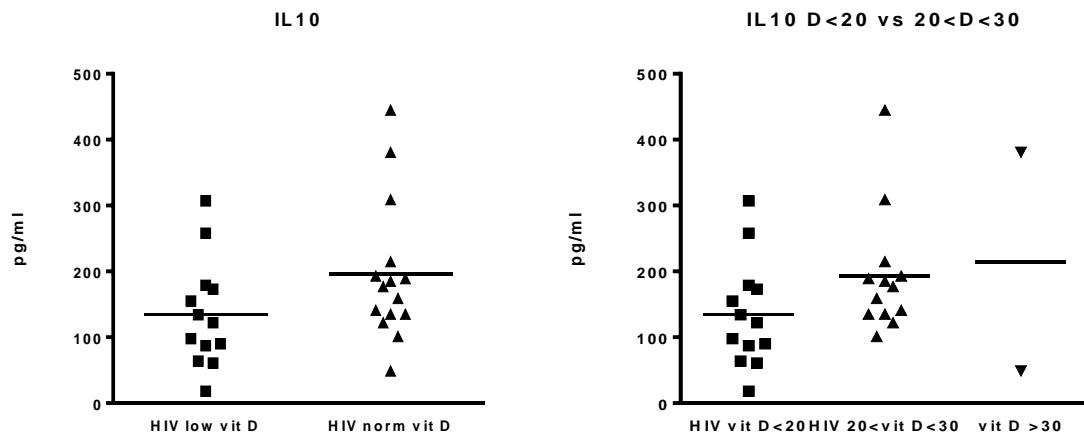
Д) Резултатите за IL-6 са средна 26437pg/l, минимална 3620 pg/l и максимална 66867pg/l. Референтният интервал е 22453 (17 100 – 28 450). Тук стимулираната секреция варира в много по-широки граници от нормата, като при някои пациенти значително се отличава от референтния интервал.

Е) Резултатите за IL-2 - средна 184pg/l, минимална стойност 7 pg/l и максимална 1336pg/l, при референтен интервал 306 (82– 585). И тук резултатите варират в широки граници, т.е.при някои пациенти е извън референтните стойности.

В тази подгрупа също направихме анализ и сравнение на пациентите в зависимост от серумното ниво на 25(OH)D. Тук сравняваме обаче пациенти със стойности на 25(OH)D<20 ng/ml и такива със стойности над >20 ng/ml, поради малкия брой пациенти (n=2) с нормални стойности на 25(OH)D(>30 ng/ml).

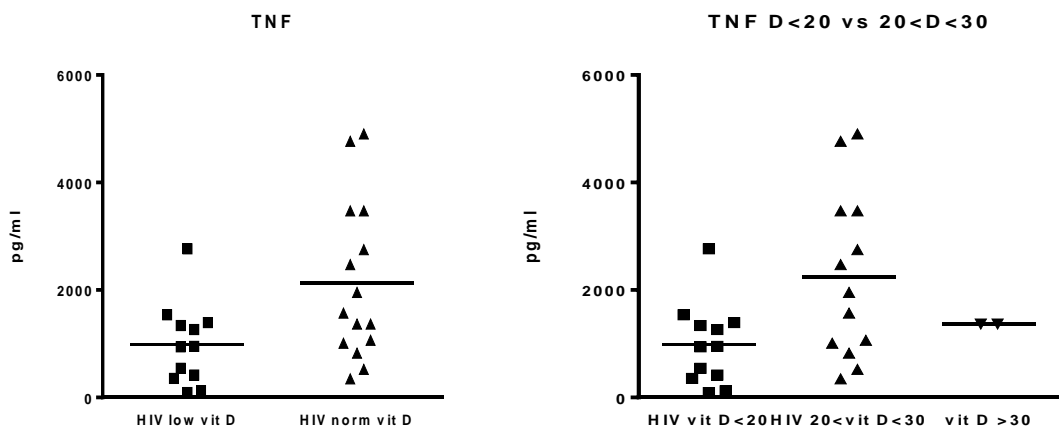
Анализите показаха, че нивото на IL-10 е понижено значимо при пациентите с дефицит на 25(OH)D, т.е. със серумни нива <20 ng/ml спрямо тези със

серумни нива  $>20$  ng/ml (mean = 134 и 196;  $p = 0.05$ ). (фиг.32) Този резултат е аналогичен на полученото и в подгрупа А.



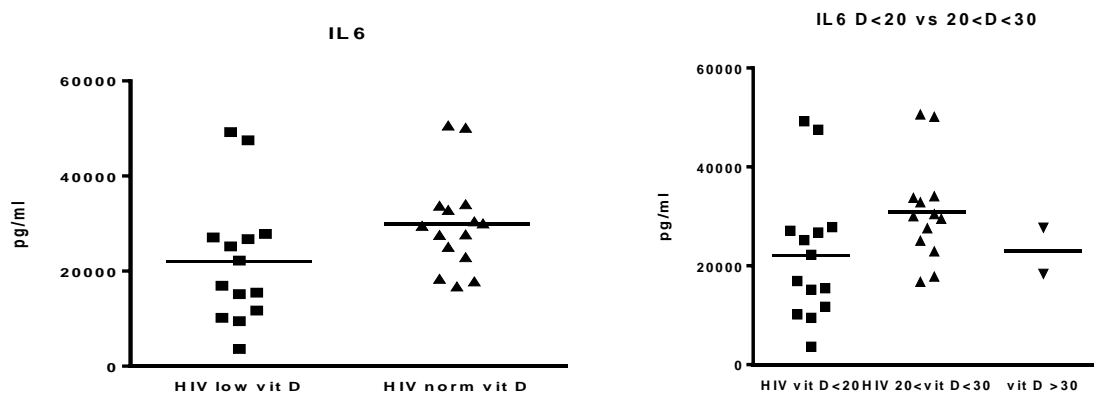
Фиг.32 Разпределение на стойностите на IL-10 спрямо серумното ниво на 25(OH)D.

Статистически значима разлика получихме и за плазменото ниво на TNF- $\alpha$ . То е понижено сигнификантно при пациентите с дефицит на 25(OH)D спрямо групата със серумно ниво  $>20$ ng/ml (mean  $<20 = 978$ ;  $>20 = 2125$ ;  $p=0.027$ )(фиг.33).



Фиг.33 Разпределение на стойностите на TNF- $\alpha$  в различните групи спрямо 25(OH)D.

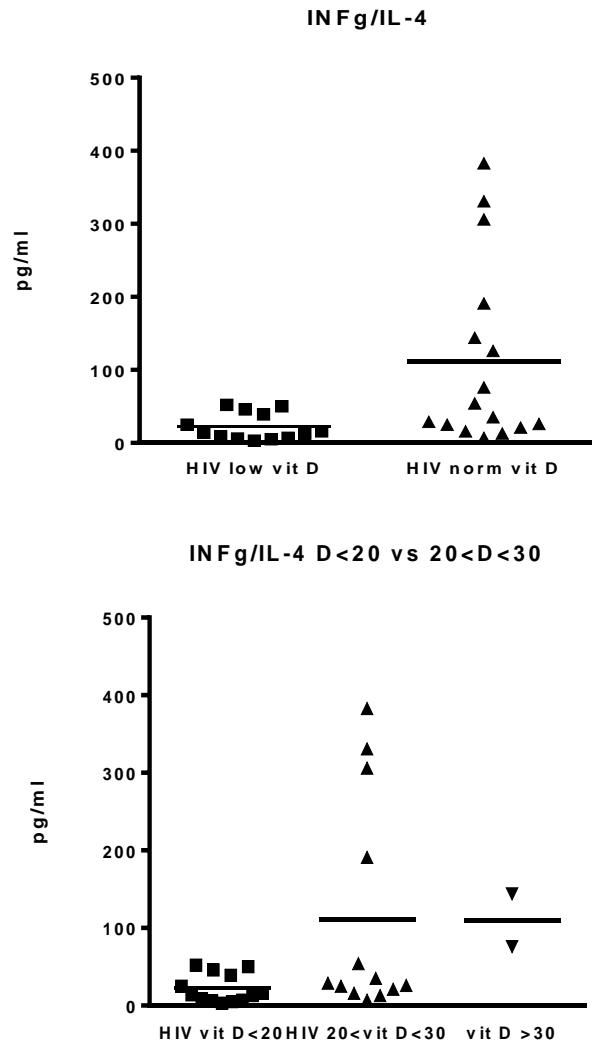
Статистически достоверни различия намерихме и в средните стойности на IL-6 в зависимост от серумното ниво на 25(OH)D. При пациенти с дефицит на 25(OH)D се установяват достоверно по-ниски стойности на IL-6, сравнени с тези на пациентите без дефицит (mean 22025 и 29835;  $p=0.02$ ) (фиг.34). В пациентите от подгрупа А с ниска секреция на IFN- $\gamma$  установихме обратната зависимост.



Фиг.34 Разпределение на стойностите на IL-6 в различните групи според нивата на 25(OH)D.

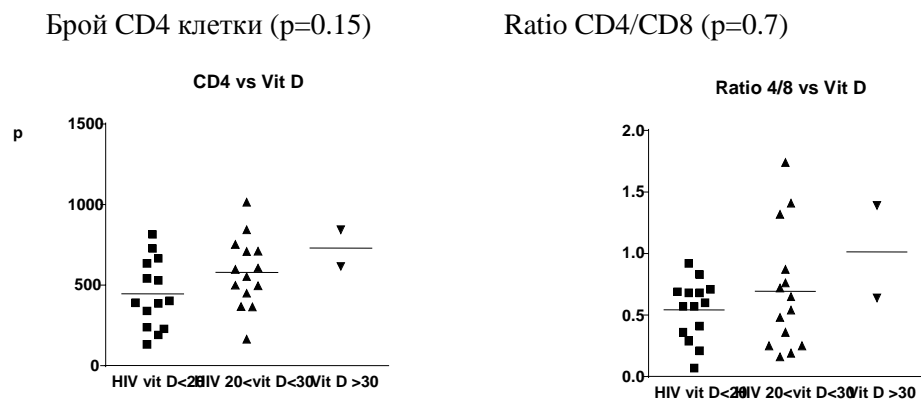
По отношение нивата на INF- $\gamma$ , IL-2 и IL-4 не се установи статистически значима разлика между групите ( $p>0.05$ ). Няма разлика и в съотношението INF- $\gamma$  /IL-10, въпреки разликата в нивата на IL-10.

Установихме обаче, че съотношението INF- $\gamma$ /IL-4, отразяващо силата на Th1 имунния отговор, е значимо по-високо при пациентите със стойности на 25(OH)D > 20 ng/ml в сравнение с пациентите с дефицит (mean 111 vs. 22;  $p = 0.0124$ ) (фиг.35).



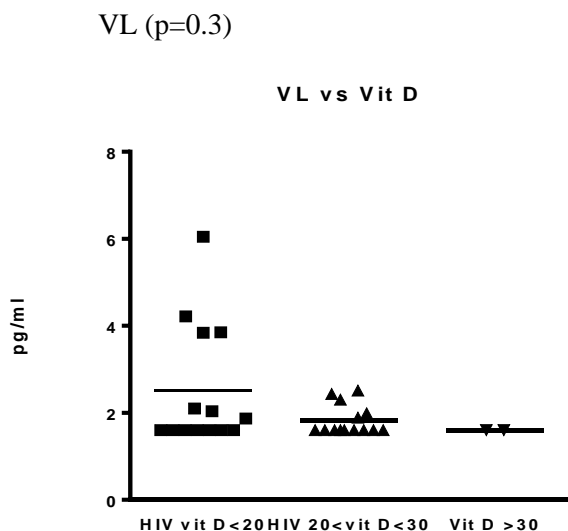
Фиг.35 Различия в индекса IFN- $\gamma$ /IL-4, отразяващ силата на Th1 имунния отговор в групите с дефицит и без дефицит на 25(OH)D.

Аналогично на резултатите в подгрупа А и в подгрупа Б не се установиха статистически значими разлики по отношение на броя на CD4 клетките и индексът CD4/CD8. Налице е тенденция за по-висок брой на CD4 при пациентите със стойности на 25(OH)D > 20ng/ml (фиг.36).



Фиг.36 Разпределение на стойностите на CD4 клетки и индекс CD4/CD8 в групите с различни нива на 25(OH)D.

Друга тенденция, която установяваме както беше установено и в подгрупа А е, че пациентите с активна вирусна репликация на фона на провежданата АРТ са в подгрупата с дефицит на 25(OH)D. Не се установиха обаче сигнификантни разлики между групите (фиг.37).



Фиг.37. Разпределение на стойностите вирусен товар спрямо нивата на 25(OH)D.

Анализите показаха, че изследването на стимулиран цитокинов профил е по-информативно от профила *ex vivo*.

Данните от изследвания цитокинов профил на HIV – инфектирани пациенти показват, че нарастващият в условията на хронична HIV инфекция дефицит на 25(OH)D задълбочава увреждането на клетъчния имунен отговор. Ниските серумни нива на 25(OH)D са свързани с повишени стойности на IL-6, понижени стойности на IL-10, IFN- $\gamma$  и TNF-  $\alpha$  и понижен индекс IFN- $\gamma$ /IL-4.

## ОБСЪЖДАНЕ

Пожизненият прием на сART изисква използването на медикаменти с минимални странични ефекти и минимална дългосрочна токсичност. Въпреки, че съвременната ART има значително по-малко токсичност в сравнение с ранните антиретровирусни медикаменти и дава минимални отклонения в основните лабораторните показатели, необходимо е мониториране на тези показатели и навременни корекции.

Една от задачите на настоящата работа е да установи доколко антиретровирусното лечение, което приемат HIV–инфектираните български пациентите, води до отклонения в основните им лабораторни показатели. В българската литература има обзорни статии по този въпрос (4,8), но няма собствени проучвания.

Нашето проучване показва абнормни стойности по отношение на показателите на кръвната картина и някои биохимични показатели – кръвна захар, холестерол и ALT. Не за всички отклонения установихме статистически значима зависимост от провежданата терапия.

От направените изследвания установихме отклонения в *хемоглобина* и *еритроцитите* при част от изследваните пациенти. Почти половината от изследваните мъже - 46,1 % и 21,1% от изследваните жени са със стойности на *хемоглобина* по-ниски от долната референтна граница. Съответно 33 % от мъжете и 16,1 % от жените са с по-ниски от нормалните стойности на *еритроцитите*. Анализите ни показаха, че един от факторите влияещ значимо на стойностите на хемоглобина и еритроцитите е броят на CD4 клетките, т.е. степента на имуноен дефицит. Мъжете в трети стадий на HIV – инфекция (CD4 клетки <200/ $\mu$ l) имат значимо по-нисък хемоглобин ( $p=0.01826$ ) от пациентите с по-висок брой CD4 клетки, т.е. с по-добър имунитет.

Аналогични са анализите ни и по отношение на броя на еритроцитите. Отново мъжете в трети стадий на инфекцията с брой на CD4 < 200/  $\mu$ l, имат значимо по-ниски средни стойности на еритроцитите от пациентите с по-висок брой CD4 клетки ( $p = 0.02578$ ).

Нашите данни за отсъствие на сигнификантни различия в средните стойности на хемоглобина и еритроцитите между мъже и жени в групите с напреднал имуноен дефицит (CD4 < 200/  $\mu$ l), биха могли да се обяснят с липса на физиологичната разлика по пол в стойностите на тези показатели при напреднал имуноен дефицит.

Доколко провежданата АРТ оказва влияние на стойностите на еритроцитите и хемоглобина анализирахме след разделяне на пациентите в групи по прием и вид на АРТ. Получените резултати, че еритроцитите на нелекуваните пациенти са значимо по-високи ( $p = 0.0007$ ,  $p=0.004238$ ) от тези на лекуваните пациенти, както с нуклеозидни инхибитори, така и с протеазни инхибитори, дават доказателства че факторът АРТ води до понижаване на еритроцитите. Общото в терапията в групите на лекуваните пациенти е наличието на комбинация от два нуклеозидни инхибитора, а разликата е в третия компонент на АРТ. По литературни данни нуклеозидните инхибитори имат най-изразен миелосупресивен ефект при пациенти на АРТ, като най-изразен е този ефект при лечение с медикамента AZT (37,38,49,71,74,107,113,173). Механизмът по който се развива тази миелотоксичност е чрез увреждане на митохондриалната функция и натрупване оксидативен стрес (10,11,21,64,89).

Според нашите анализи, средните стойности на еритроцитите при пациенти лекувани с нуклеозидния инхибитор Nevirapin са сигнификантно по-ниски, в сравнение с тези на пациентите лекувани с друг представител на групата Efavirenz ( $p=0.003276$ ). На въпроса дали получения резултат не се дължи на приема на AZT, отговорихме като анализирахме каква част от тези пациенти имат в антиретровирусната си комбинация

медикамента AZT. В групата на лекуваните с Efavirenz 12,1 % от пациентите имат в комбинацията си AZT, а в групата на лекуваните с Nevirapine 12,5 %. Няма сигнификантна разлика, т.е. резултатът не може да бъде обяснен с преобладаване на лечение с AZT в една от двете групи. Не намерихме публикувани данни за сравнение на NNRTIs по отношение на влиянието им върху еритроцитите и хемоглобина.

Според редица автори анемията е честа проява на HIV-инфекцията и е независим прогностичен фактор за болестност и смъртност (27,149,163). В повечето случаи при HIV-инфектирани, анемията се коригира най-малко след 6 месечно антиретровирусно лечение. В други случаи персистира въпреки провежданата АРТ. Основен миелосупресивен фактор от АРТ са нуклеозидните инхибитори на обратната транскриптаза. Според цитираните автори обаче анемията често е свързана и с други фактори като остаряването и хроничното имунно възпаление. При нашите пациенти не се установи статистически значимо влияние на възрастта върху стойностите на хемоглобина и еритроцитите. По-голяма част от проследените ни пациенти обаче са на възраст до 50 години.

По отношение на стойностите на *левкоцитите* установихме влияние на няколко фактора. Степента на имунен дефицит е един от факторите, със сигнификантно значение. Средните стойности на левкоцитите при мъжете в трети и втори стадий на HIV инфекция ( $CD4 < 200$  и  $200-400 /\mu l$ ) са статистически значимо по-ниски ( $p = 0.010496$ ,  $p = 0.010496$ ) от средните стойности на левкоцитите на мъжете с нормален брой  $CD4$  клетки. Аналогични резултати получихме и при жените - средната стойност на левкоцитите на пациентките с нормален брой  $CD4$  клетки е по-висока ( $p=0.004081$ ) от тази на пациентките във втори и трети стадий на HIV инфекция и различията са сигнификантни.

Нашите данни при анализ на влиянието на АРТ върху стойностите на левкоцитите, че при нелекуваните мъже и тези лекувани с PIs левкоцитите

са значимо по-високи ( $p=0.042414$ ,  $p=0.0301124$ ) от тези на лекуваните с NNRTIs, биха могли да се обяснят по следния начин. Нелекуваните пациенти са все още със съхранена костномозъчна функция, съответно по-висок общ брой левкоцити, респективно CD4 клетки, затова и при тях все още не е започната терапия. Обяснимо е, че нелекуваните пациенти имат по-висок брой левкоцити. Една от проявите на напреднала HIV инфекция е миелосупресията. По отношение съпоставката PIs и NNRTIs, нашите данни корелират с данните на други автори за по-добро възстановяване на общия брой левкоцити и респективно броя на CD4 клетките при лечение с протеазни инхибитори в сравнение с лечението с нуклеозидни инхибитори (151).

Интересни са, установените при нашите пациенти сигнификантно по-ниски стойности на тромбоцитите при мъжете, в сравнение с жените ( $p=0.007$ ) и по-високият относителен дял на мъжете с тромбоцитопения (27,1% vs 0). Причина за този резултат вероятно са налични коинфекции с хепатити, за които е доказано че водят до тромбоцитопения. При мъжете дялът на коинфектираните с хепатити е по-голям - 24 %, докато при жените коинфектираните с хепатити са 5,4% от проследените.

Анализите ни показаха, че един от факторите, влияещи значимо на стойностите на тромбоцитите е степента на имунен дефицит. Установихме, че средните стойности на тромбоцитите при пациентите с брой на CD4 клетки под 499/  $\mu\text{l}$  (т.е. втори и трети стадий на HIV инфекция) са сигнификантно по-ниски ( $p=0.009855$ ,  $p=0.008510$ ) от съответните за пациентите с нормален брой CD4 клетки.

Анализите за влиянието на АРТ показват, че средната стойност на тромбоцитите на пациентите лекувани с Nevirapine е сигнификантно по-висока от тази на нелекуваните пациенти. Този резултат може да се тълкува като сигнификантна разлика между лекувани и нелекувани пациенти. Лекуваните пациенти са с по-нисък вирусен товар от нелекуваните. Според

едно кохортно проучване броят на тромбоцитите има обратнопропорционална връзка с вирусния товар на HIV (167). Броят на тромбоцитите се повишава с намаляването на вирусния товар. Нашите данни корелират с данните от това проучване - по-високи стойности на тромбоцити при лекувани в сравнение с нелекувани пациенти. Друг резултат от нашите анализи е, че тромбоцитите на пациенти, лекувани с PIs са сигнификантно по-високи от тези на лекувани с Efavirenz. Причината за този резултат най-вероятно е по-добър вирусологичен отговор при лечение с PIs. Нашите данни съответстват на данните и на други проучвания, установили по-добър вирусологичен и имунологичен отговор при лечение с PIs, сравнено с лечение с NNRTIs (151).

Отклонения от референтните стойности установихме и по отношение на стойностите на ALT. От цялата група проследени пациенти, при 20 % се установяват повишени стойности на ALT. При мъжете 21 % са с повишени стойности на ALT, докато в групата на жените 13,2 % са със стойности над референтната. В групата на жените 5,4 % са коинфектирани с хепатит С. В групата на мъжете 22,2 % са коинфектирани с хепатит С и 1,8 % са коинфектирани с хепатит В. Само половината обаче от коинфектираните пациенти са с повишени стойности на ALT.

Установихме сигнификантно влияние на някои ARV върху стойностите на ALT. Сигнификантно по-висока е средната стойност на ALT при пациенти, лекувани с ненуклеозидния инхибитор Nevirapin ( $p=0.049865$ ) сравнено с лекуваните с PIs. В групата на лекуваните с NVP при 37,5 % установяваме повишени стойности на ALT, докато 14,4 % от лекуваните с PIs са с повишени стойности на ALT. По литературни данни един от рисковите фактори за хепатотоксичност на медикамента NVP е женският пол (150,176). Нашите анализи показаха сигнификантни различия само при мъжете. Средната стойност на ALT на мъжете, лекувани с NVP е сигнификантно по-висока от средните на нелекуваните мъже ( $p=0.009804$ )

и на лекуваните с PIs ( $p=0.005635$ ). Данните ни съвпадат с тези на редица проучвания, показващи че лечението с NVP води до повишена активност на ALT (62,63,64,168,190). Има и автори, които не установяват такъв ефект (161). Според някои изследователи при коинфекция с хепатит С има по-висок риск от клинично изявена токсичност при лечение с NVP (196). В нашето проучване 25 % от пациентите, лекувани с NVP и 18,6 % от пациентите, лекувани с PIs са коинфектирани с хепатит С. Не установихме сигнификантни разлики между сравняваните групи по отношение на влиянието на коинфекцията с хепатит С. Това изисква провеждането на допълнителни анализи и ще бъде обект на следващи проучвания.

При анализ на данните за *креатинин*, установяваме че при мъжете средната стойност е сигнификантно по-висока от тази на жените. Този резултат е очакван, поради физиологичната разлика в стойностите на креатинина според пола. По-важното е, че при всички проследени пациенти не установихме стойности на креатинина извън референтните граници. Изводът ни е, че в проследената група пациенти, ART няма нефротоксичен ефект.

Общо 12,4 % от изследваните пациенти са с повишени стойности на общия *холестерол*. 30 % от изследваните жени са с повишени стойности на холестерола, докато при мъжете повишени стойности имат 15,5 % от проследените. Анализите ни показват, че средната стойност на холестерола на пациентите, лекувани с EFV е сигнификантно по-висока от тази на нелекуваните. От тези данни може да се направи извода, че лечението с посочения по-горе нуклеозиден инхибитор води до повишение на общия холестерол. Интерес представляват данните ни, че 37,5 % от лекуваните с NVP са със стойности на общия холестерол над референтната граница. От групата на лекуваните с EFV 33,3 %, а от групата на лекуваните с PIs - 21,7 % от изследваните пациенти са с повишен общ холестерол. Според данните от редица проучвания, PIs са групата ARV, които основно водят до

нарушения в липидния статус (69,70,129,140, 202). Нашите данни не съвпадат с тези проучвания, тъй като при лекуваните с NNRTIs установяваме по-висок процент пациенти с повишен общ холестерол, в сравнение с лекуваните с PIs, разликата обаче не е статистически достоверна.

По отношение на *кръвната захар* не установяваме сигнификантно влияние на провежданата АРТ. Данните ни показват, че 37,5 % от пациентите лекувани с NVP и 36,9 % от пациентите лекувани с EFV са с повишена кръвна захар, докато в групата на лекуваните с PIs с повишена кръвна глюкоза са 24,6 % от пациентите. В литературата отново PIs се посочват като основната група ARV, които водят до нарушен глюкозен толеранс (42,65,82,141,193). Нашите анализи показват по-висок процент пациенти с повишена кръвна захар в групите, лекувани с NNRTIs, въпреки че няма сигнификантна разлика с останалите групи.

Друга задача, която си поставихме е да анализираме честотата на витамин Д дефицит при проследените пациенти. Редица международни проучвания установяват по-висока честота на този дефицит сред HIV-инфектирани (12,23,41,80,124,125,158,170,189,205,208). В нашата литература са публикувани обзорни статии (9), но не са правени проучвания сред български HIV-инфектирани пациенти.

Данните от проучването ни показаха, че значителна част от изследваните пациенти са със серумно ниво на 25(OH)D под нормалните стойности. От всички проследени пациенти, понижени серумни нива на 25(OH)D установихме при 84,8 % като при 12,4% намерихме дефицит, т.е. серумни нива на 25(OH)D < 10 ng/ml. При по-голямата част от изследваните - 72,4% е налице недостиг (серумно нивото на 25(OH)D между 10-30 ng/ml). Едва 15,2 % от изследваните пациенти са с нормални стойности на 25(OH)D. Нашите данни са близки до тези на проучването EuroSIDA, което обхваща

голяма кохорта HIV позитивни пациенти от 31 Европейски страни, Израел и Аржентина (131,182,207).

Сравнихме данните си и с тези, получени за общата популация в България. Проучването на общата популация е проведено през 2012 г. (2,3). Според анализите на това проучване 75,8 % от населението в България е с понижени стойности на 25(OH)D, като основните рискови фактори са женски пол, сезон и местоживеене. Според нашите данни при HIV-инфектирани пациенти в България е по-често понижението на серумните нива на 25(OH)D сравнено с общата популация. Не установихме значими сезонни разлики в серумните нива на 25(OH)D, за разлика от редица други проучвания при HIV – инфектирани (41,68,131,182,205). На всички изследвани пациенти бяха вземани кръвни проби за изследвания през зимните месеци, т.е. сезон с по-малко слънчеви дни. Извършихме и повторно изследване на 25(OH)D на 60 пациента от проследените първоначално. За второто изследване кръвните проби на пациентите бяха вземани в сезон с повече слънчеви дни (м.август – ноември). И при второто изследване 81,6 % от пациентите бяха с по-ниски от нормалните стойности на 25(OH)D. Дори при повторното изследване е по-висок процентът на пациентите с дефицит на 25(OH)D - 41,6%.

Повечето проучвания и на HIV – инфектирани и на неинфектирани установяват, че женският пол е основен рисков фактор за дефицит на 25(OH)D (2,41,68,80,85,131). При нашите пациенти не се установи статистически значимо влияние на фактора женски пол за понижените серумни нива на 25(OH)D. От изследваните жени 83%, а от изследваните мъже 85 % са със стойности на 25(OH)D под референтната (30 ng/ml). Установихме, че средната стойност на 25(OH)D на нелекуваните жени е сигнификантно по-висока от тази на мъжете ( $p=0.050$ ).

По отношение на влиянието на АРТ върху серумното ниво на 25(OH)D, повечето автори установяват редукция на серумните нива на 25(OH)D при

лечение с NNRTIs и по-специално с медикамента Efavirenz (12,47,131,214). Други автори съобщават за аналогичен ефект при лечение с режими, базирани на PIs (33,54). Според нашите данни 94 % от пациентите лекувани с EFV са с намалени стойности на 25(OH)D, като 21 % от тях са с дефицит и 70 % са с недостатъчност. От лекуваните с други NNRTIs ( NVP) 87,7 % са с намалени стойности на 25(OH)D, като 12,5 % са с дефицит и 77,5 % са с недостатъчност. Сигнификантна зависимост от провежданото лечение и конкретно с EFV установяваме само при жените. Сигнификантно по-ниски серумни нива на 25(OH)D се установяват при пациентки на режими с EFV, спрямо нелекувани пациентки ( $p=0.026746$ ).

Холандски автори представят анализи за по-високи нива на 25(OH)D при пациенти, получаващи PIs в сравнение с тези, получаващи NNRTIs (201). При нашите пациенти, лекувани с PIs процентът пациенти с понижени стойности на 25(OH)D е по-нисък от този при лекуваните с NNRTIs, но разликата не е сигнификантна. Не установихме други статистически достоверни различия между групите, разделени според ART.

Друга задача на проучването ни е оценка на т.нар. „некласически” ефекти на 25(OH)D - имунологични и метаболитни, които са в процес на проучване при различни заболявания (14,29,30,171,213). За целта извършихме и корелационни анализи между серумните нива на 25(OH)D и някои биохимични и имунологични показатели при проследените пациенти. Една от проучените взаимовръзки е между серумните нива на 25(OH)D и кръвната глюкоза. При неинфектирани с HIV пациенти, множество проучвания доказват връзка между дефицит на 25(OH)D и 2 тип диабет (43,90,130,159). При пациенти с HIV няма достатъчно проучвания. Нашите анализи показаха, че при жени с дефицит на 25(OH)D кръвната захар е сигнификантно по-висока от тази на жени със серумно ниво на 25(OH)D  $> 10 \text{ ng/ml}$  ( $p=0.045022$ ). При жени с недостиг на 25(OH)D кръвната захар е статистически значимо по-висока от тази на жени с нормални серумни нива

на 25(OH)D ( $p=0.0495088$ ). При извършване на корелационен анализ установихме, че при пациенти с дефицит на 25(OH)D (общо мъже и жени) има значима обратна корелация между стойностите на 25(OH)D и стойностите на кръвната захар ( $r=-0.47$ ,  $p=0.038655$ ). Ниските стойности на 25(OH)D корелират с по-високи стойности на кръвната захар. Аналогични данни получихме и за мъжете с дефицит на 25(OH)D след разделяне на пациентите по пол. При жени с нормални серумни нива на 25(OH)D установяваме противоположен резултат - статистически значима положителна корелация между серумното ниво на 25(OH)D и стойностите на кръвната глюкоза ( $r=0.8$ ,  $p<0.05$ ). Тези данни обясняваме с вероятен дозозависим ефект на 25(OH)D върху кръвната захар. При дефицит на 25(OH)D ( $<10\text{ng/ml}$ ), понижаването на серумните нива на 25(OH)D корелират с повишаване на стойностите на кръвната захар. При нормални стойности на 25(OH)D, повишаването на серумното ниво на 25(OH)D корелира с повишаване на стойностите на кръвната захар. Аналогични данни има публикувани в литературата само от едно холандско проучване при HIV - инфектирани пациенти (201). Данните от това проучване показват, че суплементацията с холекалциферол води до повишена инсулинова резистентност и повишени нива на кръвна глюкоза на гладно, измерени на 24-та седмица. Авторите обясняват това с инхибиране на експресията на специфичен рецептор от 25(OH)D. Активацията на този рецептор води до повишена инсулинова чувствителност.

Анализирахме и възможни корелации между серумното ниво на 25(OH)D и общия холестерол. Такива положителни корелации установяват няколко проучвания (171,213). В нашето проучване установихме умерени корелации между серумното ниво на 25(OH)D и общия холестерол при пациенти във възрастова група 30-40 г., както за цялата подгрупа така и отделно за мъжете на тази възраст ( $r=0.38$ ,  $p<0.05$ ). Значителна корелация между нивата на 25(OH)D и нивата на холестерола установихме във

възрастовата група 50-60 г., но без статистическа достоверност ( $r=0.67$ ,  $p=0.078$ ). Вероятно липсата на статистическа достоверност се дължи на малкия брой пациенти в тази група.

Данните от проучването ни показват и статистически значима обратна корелация между стойностите на 25(OH)D и стойностите на ALT ( $r=-0.58$ ,  $p=0.01356$ ) при пациенти с дефицит на 25(OH)D. Изводът ни е, че ниските серумни нива на 25(OH)D са свързани с повишени стойности на ALT. Едно от възможните обяснения за този резултат е, че повечето от пациентите с дефицит на 25(OH)D са лекувани с нуклеозидния инхибитор Nevirapin. Анализите ни показват, че лечението с този медикамент води до сигнификантно по-високи стойности на ALT. В литературата намерихме проучвания при неинфектирани с HIV пациенти за участието на 25(OH)D в патогенезата на неалкохолната чернодробна стеатоза (61). Ниските серумни нива на 25(OH)D водят до различна степен на инсулинова резистентност и до акумулация на масти в черния дроб. При нашите пациенти вероятно корелацията между понижените серумни нива на 25(OH)D и активираният ALT е с комплексна генеза. От една страна е влиянието на АРТ върху стойностите на ALT, от друга страна е влиянието на 25(OH)D върху глюкозния и липиден метаболизъм и респективно отлагането на масти в черния дроб.

С оглед влиянието на бъбречната функция върху метаболизма на 25(OH)D, анализирахме и възможни корелации между серумните нива на 25(OH)D и серумния креатинин. Мъжете с дефицит на 25(OH)D имат сигнификантно по-ниски средни стойности на креатинин от тези на мъжете с недостиг и нормални стойности ( $p=0.029143$ ,  $p=0.000911$ ). Корелационните ни анализи показват положителна корелация между 25(OH)D и креатинин ( $r=0.75$ ,  $p<0.05$ ) при пациенти с нормални серумни нива на 25(OH)D. Повишаването на серумното ниво на 25(OH)D води до повишение на серумния креатинин. При пациенти с дефицит и недостиг на

25(OH)D обаче не установяваме статистически значими корелации. Данните от едно италианско проучване показват взаимовръзка между серумни нива на 25(OH)D <25 ng/ml и повишен риск от бъбречно заболяване (206). И тук както при корелацията с кръвната глюкоза се обсъжда дозозависим ефект на 25(OH)D върху креатинина, обусловен от рецепторен механизъм.

Друг „некласически“ ефект на 25(OH)D е влиянието му върху вродения и придобит имунитет. С оглед на това анализирахме влиянието на дефицитните състояния на 25(OH)D върху някои имунологични показатели.

Доказано е участието на 25(OH)D в диференцирането на миелоидните прекурсори в костния мозък (110,223). Базирайки се на тези проучвания, анализирахме връзката между броя на левкоцитите и серумните нива на 25(OH)D на изследваните пациенти. Статистически значима зависимост установихме при мъже със серумни нива 25(OH)D <30 ng/ml, т.е. пациенти с недостиг и дефицит. Средните стойности на левкоцитите при тези пациенти са сигнификантно по-ниски от средните стойности на левкоцитите при пациенти с нормални серумни нива на 25(OH)D ( $p=0.039238$ ).

Противоречиви са данните в литературата по отношение на връзката между серумното ниво на 25(OH)D и броят на CD4 клетките. Някои автори съобщават, че при пациенти които провеждат антиретровирусна терапия повече от една година и имат вирусен товар HIV-1 RNA <80 copies/mL, не се установява сигнификантна връзка между броя на CD4 клетките и серумните нива на 25(OH)D (172). В нашето проучване, статистически значима взаимовръзка между броят CD4 клетки/ $\mu$ L и серумните нива на 25(OH)D установяваме при проследените жени. При жени с нормални серумни нива на 25(OH)D, броят на CD4 клетките / $\mu$ L е сигнификантно по-висок от този на пациентки с недостиг ( $p=0.007691$ ) и с дефицит на

25(OH)D ( $p=0.04769$ ). Корелационният анализ показва умерена положителна корелация между броят на CD4 и серумните нива на 25(OH)D за пациентите на възраст 30-40 години и за мъжете в същата възрастова група ( $r=0.37$ ,  $p<0.05$ ). Значителна положителна корелация установяваме и при жени, лекувани с PIs ( $r=0.5$ ,  $p<0.05$ ). Всички тези анализи повърждават тезата, че нормални серумни нива на 25(OH)D корелират с по-добър имунитет.

Една от целите на провежданата АРТ е възстановяване на имунитета. Показател за степента на засягане на имунната система от HIV инфекцията е броят на CD4 клетките. Данните от нашето проучване показват, че средната стойност на CD4 клетките на проследените жени е по-висока от тази на мъжете ( $p=0.050$ ). При разделяне на пациентите по приемана АРТ не установяваме сигнификантни разлики в средните стойности на CD4 клетките според прием и вид на АРТ. Прави впечатление обаче, че най-ниските минимални стойности на CD4 клетките са в групите на пациенти, лекувани с NNRTIs - NVP и EFV. Респективно най-високата максимална стойност на броя на CD4 клетките е в групата на лекуваните с PIs. По-горе в изложението съобщихме данните от проучвания, които показват по-добър имунологичен ефект на лекарствени режими, базирани на PIs в сравнение с режими базирани на NNRTIs (151).

След разделяне на пациентите според серумното ниво на 25(OH)D (дефицит, недостатъчност и нормални серумни нива), анализирахме и връзката със степен на имунен дефицит. Не установяваме статистически значима разлика между средните стойности на броя на CD4 клетките в трите подгрупи пациенти с различни нива на 25(OH)D. Този резултат е очакван, тъй като проследените пациенти са лекувани с ARV за различни периоди от време и имат различни изходни нива на брой на CD4.

Данните ни показват, че пациентите с дефицит и недостиг на 25(OH)D имат по-нисък индекс CD4/CD8, макар и разликата да не е статистически

значима. Всички пациенти с активна вирусна репликация са в групите със серумни нива на 25(OH)D <30 ng/ml. Индексът CD4/CD8 е един от маркерите за персистиращо имунно възпаление, от което следва, че понижените серумни нива на 25(OH)D корелират с персистиращото имунно възпаление (14,16,69,164).

Установяваме също така, че при пациенти с дефицит на 25(OH)D възстановяването на броя на CD4 е по-бавно, отколкото при тези с недостатъчност или нормални стойности. Тези данни съвпадат с данните и на други проучвания на HIV-инфектирани пациенти (172).

Противоречиви са данните от проучвания за връзката между серумните нива на 25(OH)D и плазмените нива на някои проинфламаторни цитокини. Петата задача, която си поставихме е да определим цитокинов профил на проследените пациенти и да анализираме влиянието на понижените серумни нива на 25(OH)D върху него. На тридесет от взетите кръвни проби анализирахме цитокиновия профил след стимулация с фитохемаглутинин, а на други тридесет проби извършихме изследването без стимулация. Целта на стимулацията е да се активират наличните лимфоцити и да се определи техния оптимален цитокинов потенциал. Анализите ни показват, че независимо дали изследването се извършва с или без стимулация, плазмените нива на IL-10 са понижени при пациенти с дефицит на 25(OH)D. Има противоречиви данни в литературата за ролята на IL-10 в хода на HIV – инфекция. Според едни автори високите плазмени нива на IL-10 корелират с прогресия на заболяването, според други автори обаче е точно обратното - корелират с по-бързото възстановяване на броя на CD4 клетките (126,191). Важна е ролята на IL-10 като регулаторен цитокин, която според нашите проучвания е нарушена при състояния на дефицит на 25(OH)D.

При всички наши проследени пациенти установяваме много ниски стойности на IL-2. Този резултат съответства на данните, които съобщават и други автори, че плазмените нива на IL-2 на пациенти, инфектирани с HIV

и лекувани с АРТ, остават ниски години след началото на терапията (94,126). Същите проучвания съобщават, че при част от HIV – инфектираните пациенти плазмените нива на IFN- $\gamma$  са по-високи от тези на контролната група. Анализите ни *ex vivo* (без стимулация с ФХА) показват, че част от проследените пациенти са с много високи плазмени концентрации на IFN- $\gamma$ , значително по-високи от референтните. Тези пациенти имат по-висок брой CD4 клетки и по-ниска средна стойност на IL-4. Съответно при пациентите с висок IFN- $\gamma$  е налице по-високо съотношение IFN- $\gamma$ /IL-4, което отразява силата на Th1 имунния отговор. По-мощният Th1 имуноен отговор води до по-добър антивирусен отговор и по-добра прогноза на HIV-инфекцията. В много проучвания се установява дисбаланс между Th1 и Th2 имунните отговори при напреднала HIV – инфекция. Th2-citoкиновия профил е преобладаващ при тежък имуноен дефицит (142,169,179,217). Данните ни показват големи различия при изследваните пациенти по отношение на стойностите на IFN- $\gamma$ . Освен групата пациенти със стойности над референтните, при други пациенти установяваме много ниски стойности на IFN- $\gamma$ . Анализите показват, че тези две крайни групи пациенти се различават значимо по брой CD4 клетки, плазмени нива на IL-4 и съотношение IFN- $\gamma$ /IL-4, но не и по IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , 25(OH)D, VL и индекс CD4/CD8. Пациентите с високи плазмени концентрации на IFN- $\gamma$  имат повече и по-добре функциониращи в условията на вирусната инфекция CD4 лимфоцити. Това обаче няма непременно връзка със серумното ниво на 25(OH)D и имунното възпаление. При пациентите с много ниски стойности на IFN- $\gamma$  установяваме статистически значима връзка между серумните нива на 25(OH)D и плазмените концентрации на IL-6 и IL-10. Пациентите със стойности на 25(OH)D < 30 ng/ml (дефицит и недостатъчност) се отличават с по-високи плазмени концентрации на IL-6 и по-ниски нива на IL-10 в сравнение с пациентите, които имат нормални стойности на 25(OH)D. Индексът IFN- $\gamma$ /IL-4 е сигнификантно по-нисък при пациенти с

недостатъчност на 25(OH)D. Това показва, че Th1 имунният отговор, който е основен за ерадикация на вирусни инфекции е по-слаб при пациенти с дефицит и недостатъчност на 25(OH)D. Данните ни не съвпадат с данните на други проучвания, показващи че серумните нива на 25(OH)D имат обратнопропорционална корелация с нивата на IFN- $\gamma$ , но не и с нивата на TNF- $\alpha$  или IL-10 (24).

На базата на анализите ни на цитокиния профил *ex vivo*, можем да обобщим, че при състояния на дефицит и недостиг на 25(OH)D е налице по-изразено имунно възпаление (висок IL-6), слаб регулаторен отговор (нисък IL-10) и потискане на Th1 имунен отговор (IFN- $\gamma$ /IL-4). Този цитокинен профил е неблагоприятен в условията на вирусна инфекция и води до нейната прогресия.

При изследването на цитокинен профил след стимулация на кръвните проби с фитохемаглутинин, целта беше да се активират максимален брой от наличните в пробите лимфоцити и да проучим техния оптимален цитокинен потенциал. Резултатите като цяло показаха, че това изследване е по-информативно от изследването без стимулация с фитохемаглутинин.

При пациентите с дефицит на 25(OH)D, намерихме значително по-ниски нива на IL-10, TNF- $\alpha$  и IL-6. И след стимулация с фитохемаглутинин установихме, че съотношението IFN- $\gamma$ /IL-4, отразяващо силата на Th1 имунния отговор е сигнификантно по-високо при пациентите със стойности на 25(OH)D > 20 ng/ml в сравнение с пациентите с дефицит. Установихме и тенденция за по-висок брой на CD4 при пациентите със стойности на 25(OH)D > 20ng/ml.

Проучванията за влиянието на серумните нива на 25(OH)D върху цитокиновия профил не са много на брой и са противоречиви. Някои автори установяват, че 25(OH)D усилва експресията на HIV при високи нива на TNF- $\alpha$ , но инхибира вирусната експресия при високи концентрации на IFN- $\gamma$  и IL-6 (24,53). Аналогични са и данните от нашето проучване по

отношение на IFN- $\gamma$  и IL-6 при изследване *ex vivo*. Според други проучвания 25(OH)D стимулира продукцията на IL-10, т.е. състоянията на дефицит и недостиг корелират с ниски стойности на IL-10 (98). Нашите анализи също показват, че при пациенти с дефицит и недостиг на 25(OH)D са налице сигнификантно по-ниски плазмени концентрации на IL-10, както при изследванията *ex vivo*, така и след стимулация с ФХА. Други автори не намират статистически значима взаимовръзка между нивата на 25(OH)D и TNF- $\alpha$  и IL-6 при HIV – инфектирани пациенти (171). Някои проучвания съобщават за положителна корелация между високите концентрации на TNF- $\alpha$  и дефицит на 25(OH)D, което води до бързо прогресираща HIV инфекция. (80,224). Нашите данни обаче са противоположни - установяваме по-ниски стойности на TNF- $\alpha$  при състояния на дефицит на 25(OH)D. Аналогични на нашите данни за обратнопропорционална зависимост между серумните нива на 25(OH)D и серумните нива на TNF- $\alpha$ , представя едно японско проучване при здрави индивиди. При това проучване обаче не се установяват корелации между серумните нива на 25(OH)D и плазмените концентрации на IL-6 и IL-10 (155).

Обобщено данните от анализите ни на цитокиновия профил при HIV – инфектирани пациенти (с и без стимулация с ФХА) показват, че нарастващият в условията на хронична HIV инфекция дефицит на 25(OH)D задълбочава увреждането на клетъчния имуноен отговор. Ниските серумни нива на 25(OH)D са свързани с повишени стойности на IL-6, понижени стойности на IL-10, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . При понижени серумни нива на 25(OH)D е налице активно имуно възпаление, водещо до стимулирана секреция на регулаторни цитокини и потискане на Th1 антивирусния отговор. Фазата на напреднал дефицит на 25(OH)D се характеризира с паралелно изчерпване на регулаторните и ефекторни възможности на CD4 лимфоцитите. Възстановяването на CD4 лимфоцитния пул е затруднено на фона на по-ниски от нормалните серумни нива на 25(OH)D, независимо от

провежданата антиретровирусна терапия. Компенсирането на този дефицит би подобрило ефекта от специфичната терапия и възстановяването на протективния клетъчен имунитет. Приложението на витамин Д при HIV - инфектирани пациенти с понижени серумни нива на 25(OH)D, паралелно с комбинираната ART би могло да активира Th1 антивирусния отговор и да спомогне за намаляване на вирусните резервоари.

**ОТ НАПРАВЕНИТЕ АНАЛИЗИ МОГАТ ДА СЕ НАПРАВЯТ СЛЕДНИТЕ ИЗВОДИ:**

**ИЗВОДИ:**

**I. При проследените HIV – инфектирани пациенти статистически значимо влияние на провежданата антиретровирусна терапия установихме по отношение показатели на кръвната картина и биохимичните показатели холестерол и ALT.**

- анемията при HIV – инфектирани пациенти е резултат не само на провежданата ART, но и на по-тежък имуен дефицит.

- антиретровирусната терапия води до повишени стойности на ALT при лечение с режим, включващ ненуклеозидния инхибитор NVP.

- антиретровирусната терапия води до сигнификантно по-високи стойности на общия холестерол при лечение с режим, включващ ненуклеозидния инхибитор EFV.

II. При HIV – инфектирани пациенти се установяват по-често понижени серумни нива на 25(OH)D в сравнение с общата популация в България, като факторите, които влияят сигнификантно са степента на имуен дефицит и провеждането на антиретровирусна терапия, докато факторите - пол, възраст и сезон не влияят статистически значимо.

III. Серумните нива на 25(OH)D корелират със стойностите на някои биохимични параметри - кръвна глюкоза и ALT.

- Влиянието на серумните нива 25(OH)D върху кръвната глюкоза е дозозависимо, при дефицит зависимостта е обратнопропорционална, при нормални стойности на 25 (OH)D е правопрпорционална.

- при HIV – инфектирани пациенти с дефицит на на 25(OH)D, понижаването на серумните нива е свързано с повишаване на стойностите на ALT.

IV. Пациенти с дефицит на 25(OH)D имат нарушена имунна регулация (IL-10), персистиращо имунно възпаление (IL-6) и потиснат антивирусен Th1 имуен отговор (IFN- $\gamma$ /IL-4).

V. Суплементацията с витамин Д при състояния на дефицит и недостиг на 25(OH)D ще намали хроничното възпаление и ще

**подобри силата на антивирусния отговор, което от своя страна е предиктор за по-добра прогноза при HIV - инфекция.**

## **ПРИНОСИ**

### **I. Приноси с оригинален научен характер**

**1. Това е първо проучване за серумните нива на 25(OH)D при HIV – инфектирани пациенти в България, като са анализирани основните влияещи фактори.**

**2. Определени са плазмените концентрации на основни цитокини – IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  при пациенти на АРТ.**

**3. Анализирано е влиянието на серумните нива на 25(OH)D върху цитокиновия профил и имунологичния статус на пациентите. Доказана е важната му роля за хода и прогресията на HIV – инфекцията.**

**3. Установено е влиянието на серумните нива на 25(OH)D върху основни биохимични показатели при ХИВ – инфектирани пациенти и респективно съпътстващи коморбидитети.**

**4. Доказана е необходимостта от суплементация с витамин Д при пациенти с понижени серумни нива на 25(OH)D, паралелно с провежданата антиретровирусна терапия за подобряване прогнозата на заболяването.**

## **II. Приноси с научно-приложен характер**

**1. Направено е проучване на 145 HIV – инфектирани пациенти, проследявани амбулаторно в ОПИН на СБАЛИПБ “Проф.Иван Киров”, като са анализирани основни лабораторни и имунологични показатели.**

**2. Оценено е влиянието на факторите: АРТ, степен на имуен дефицит и серумни нива на 25(OH)D върху проследяваните лабораторни показатели.**

## **ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

- 1. Янчева, Н., Еленков И.,** Започване на антиретровирусно лечение при ХИВ – позитивни пациенти – показания и противопоказания. Наука Инфектология и Паразитология, 2011, бр.1
- 2. Янчева Н., Г.Кирилов, З.Абаджиева, Д.Страшимиров, И.Еленков, Т.Томов, Т.Червенякова.** Витамин D дефицит при ХИВ – инфектирани

пациенти в България. Наука Инфектология и Паразитология, 2013,бр.1.

3. **Янчева, Н.** Цитокинов профил при ХИВ –инфекция. Наука инфектология и Паразитология, 2015, бр.1, под печат.
4. **Yancheva, N., I.Elenkov, T.Tomov, D.Strashimirov, M.Yankova, T.Tcherveniyakova.** Antiretroviral therapy – changes on basic laboratory exams in HIV – infected Bulgarian patients. Acta Medica, in press.

### **УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ**

1. **Янчева Н.,** Г.Кирилов, З.Абаджиева, Д.Страшимиров, И.Еленков, Т.Томов, Т.Червенякова.Витамин Д дефицит при ХИВ – инфектирани пациенти в България. VIII – ма конференция по инфекциозни болести, Варна, 10-12 ти октомври 2013 г.
2. Александрова, М.,**Н. Янчева,** О. Ангелова, М. Мухтарова, Т.Червенякова, И. Еленков, М. Николова.Стимулирани /индуцирани цитокинови профили при HIV- инфектирани лица с дефицит на витамин Д. 13 – ти конгрес на БАМ, София, 16-18 ти април 2015 г.

### **Библиография:**

1. Аргирова, Р. Глава 12.Ретровируси. Вирус на човешкия имунен дефицит. Клинична вирусология, София:Мед. и физк.2006,с.145-51.
- 2.Борисова, А-М., А.Шинков, Й.Влахов и сътр. Честота на дефицит, недостатъчност и достатъчност на витамин Д в българската популация. Ендокринология 2012,3,122-134.
- 3.Борисова, А-М., М.Боянов, З.Коларов и сътр. Препоръки за диагностика, профилактика и лечение на дефицит и недостатъчност на витамин Д. 2013 г.

4. Еленков, И., Н. Янчева, Т. Червениякова и сътр. Антиретровирусна терапия- историческо развитие и групи антиретровирусни медикаменти. Български медицински журнал, 4, 2010, №2
5. Кирилов, Г. Лабораторна диагностика на заболяванията на парашитовидните жлези и костно-минералния метаболизъм. В: Хормонална и функционална диагностика на ендокринните заболявания, Парадигма (изд.), 2012, 300-306.
6. Плочев, К. СПИН. 1997 Г., под ред. В. Баев
7. Стойчева, М., В. Георгиева. Приложение на Raltegravir при пациенти с ХИВ и ко-инфекции. Наука Инфектология и паразитология., 2012, бр.2, 24-26.
8. Хинков, А.Д., П. Рачев, К. Генов, Р. Аргирова. Съвременна терапия на HIV – инфекцията. Съвременна медицина, 2008, бр.6, 61-72
9. Червениякова, Т. Витамин D дефицит при пациенти с HIV – инфекция. Наука Инфектология и паразитология., 2011, бр.1, 22-26.
10. Abrescia, P. and P. Golino. Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. Expert Rev. Cardiovasc Ther., 2005, 3: 159-171.
11. Adikwu, E., N. Bramaifa, Deo Oputiri and Oru-Bo Precious Geoffrey. Antiretroviral toxicity and oxidative stress. American Journal of Pharmacology and Toxicology 8 (4): 187-196, 2013 ISSN: 1557-4962
12. Allavena, C., C. Delpierre, L. Cuzin *et al.* High frequency of vitamin D deficiency in HIV-infected patients: effects of HIV-related factors and antiretroviral drugs. J Antimicrob Chemother 2012; 67: 2222–2230
13. Allers, K. *et al.* Evidence for the cure of HIV infection by CCR5-delta-32/delta-32 stem cell transplantation. Blood 117(10):2791–99. March 10, 2011.
14. Ansenmant, T., S. Mahy, C. Piroth *et al.* Severe hypovitaminosis D correlates with increased inflammatory markers in HIV infected patients. BMC Infectious Diseases 2013; 13: 7.

15. Anson, B.D., J.Weaver, M.Ackerman *et al.* Blockade of HERG channels by HIV protease inhibitors. *Lancet* 2005, 365:682-6.
16. Appay, V., D. Sauce. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 2008; 214: 231-241.
17. Archin, N. *et al.* Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4+ T cells. *AIDS* 22(10):1131–35. June 19, 2008.
18. Archin, N. *et al.* Expression of latent HIV induced by the potent HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. *AIDS Research and Human Retroviruses* 25(2): 207–12. February 2009.
19. Arnaudo, E., M.Dalakas, S.Shanske *et al.* Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *Lancet* 1991, 337:508-10.
20. Arnsten, J., R.Freeman, A.Howard *et al.* Decreased bone mineral density and increased fracture risk in aging men with or at risk for HIV infection. *AIDS* 2007;21: 617-623.
21. Atiba, A.S., D.P. Oparinde, A.K. Jimoh *et al.* Oxidative stress and serum selenium in HIV patients on different antiretroviral regimen. *Greener J. Med. Sci.*, 2012, 2: 163-167.
22. Ayoub, A., E. van der Ryst, K.Turner, M.McHale. A review of the markers of immune function during the maraviroc phase 1 and 2a studies. Abstract 509, 14th CROI 2007, Los Angeles.
23. Barbosa, N., L.Costa, M.Pinto *et al.* Vitamin D and HIV Infection: A Systematic Review. *Barbosa, J Immunodeficient Disor* 2014, 3:1
24. Barker, T., T.Martins, H.Hill *et al.* Circulating pro-inflammatory cytokines are elevated and peak power output correlates with 25-hydroxyvitamin D in vitamin D insufficient adults. *Eur. J.Appl. Physiol.* 2013, 113, 1523–1534.

25. Becher, F., A.Pruvost, D.Schlemmer *et al.* Significant levels of intracellular stavudine triphosphate are found in HIV-infected zidovudine-treated patients. *AIDS* 2003, 17:555-61.
26. Ben-Romano, R., A. Rudich, S. Etzion *et al.* Nelfinavir induces adipocyte insulin resistance through the induction of oxidative stress: Differential protective effect of antioxidant agents. *Antivir. Ther.* 2006, 11: 1051-1060.
27. Berhane K, R.Karim, M.Cohen, L.Masri-Lavine *et al.* Impact of highly active antiretroviral therapy on anemia and relationship between anemia and survival in a large cohort of HIV-infected women: Women's Interagency HIV Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004;37(2):1245.
28. Biancotto, A., F.Grivel, L.Gondois-Rey *et al.* Dual ROLE of prostratin in inhibition of infection and reactivation of HIV from latency in primary blood lymphocytes and lymphoid tissue. *Journal Virology* 2004, 78:10507-10515
29. Bikle, D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 26-34.
30. Bischoff-Ferrari, H., E.Giovannucci, *et al.* Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006;84:18–28.
31. Bonora, S., M.Boffito, A.D'Avolio *et al.* Detection of stavudine concentrations in plasma of HIV-infected patients taking zidovudine. *AIDS* 2004, 18:577-8.
32. Brinkman, K., J.Smeitink, J.Romijn, P.Reiss. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* 1999, 354:1112-5.
33. Brown, T., R.Qaquish. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS* 2006; 20: 2165-2174.

34. Brumme, Z., J. Goodrich, H. Mayer *et al.* Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *J Infect Dis* 2005, 192:466-74.
35. Buzón, M. *et al.* HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nature Medicine* 16(4):460–65. April 2010.
36. Cameron, D., M. Heath-Chiozzi, S. Danner *et al.* Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998, 351:543-9.
37. Carr, A., J. Miller, M. Law, D. Cooper. A syndrome of lipoatrophy, lactic acidemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue therapy: contribution to protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome. *AIDS* 2000, 14:F25-F32.
38. Carr, A., D. Cooper. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet* 2001; 356:1423-30.
39. Chan-Tack, K., K. Struble, D. Birnkrant. Intracranial haemorrhage and liver-associated death associated with tipranavir/ritonavir: review of cases from the FDA's Adverse events reporting System. *AIDS Patients care STDS* 2008;11:843-50.
40. Chomont, N. *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine* August 2009, 15(8):893–900.
41. Christine, N., N. Dao, P. Pragnal, E. Turner *et al.* Study to Understand the Natural History of HIV and AIDS in the Era of Effective Therapy (SUN) Investigators. Low Vitamin D among HIV-Infected Adults: Prevalence of and Risk Factors for Low Vitamin D Levels in a Cohort of HIV-Infected Adults and Comparison to Prevalence among Adults in the US General Population. *Clinical Infectious Diseases* Feb, 2011;52(3):396–405

42. Chndra, S., D. Mondal and K.C. Agrawal. HIV-1protease inhibitor induced oxidative stress suppresses glucose stimulated insulin release:Protection with thymoquinone, experim. Biol. Med.2009, 234: 442-453.
43. Chiu, K., A.Chu,V. Go, M. Saad. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and B dysfunction. Am J Clin Nutr 2004; 79:820–5.
44. Chun, T.W. *et al.* Rebound of plasma viremia following cessation of antiretroviral therapy despite profoundly low levels of HIV reservoir: implications for eradication. *AIDS* 24(18): 2803–8. November 27, 2010.
45. Cohen, C., J.Andrade-Villanueva, B.Clotet *et al.* Rilpivirine versus efavirenz with two background nucleoside or NRTIs in treatment-naïve adults infected with HIV- 1(THRIVE): a phase 3, randomized non-inferiority trial. *Lancet* 2011, Jul 16; 378(9787):229-37
46. Concorde: MRC/ANRS randomised double-blind controlled trial of immediate and deferred zidovudine in symptom-free HIV infection. *Lancet* 1994, 343:871-81.
47. Conesa-Botella, A., E.Florence, L. Lynen L *et al.* Decrease ofvitamin D concentration in patients with HIV infectionon a non nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimen. *AIDS ResTher* 2010; 7: 1-6.
48. Connor, R., K.Sheridan, D.Ceradini, S. Choe, N.Landau. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J Exp Med* 1997, 185:621-8.
49. Cossarizza, A. and G. Moyle. Antiretroviral nucleoside and nucleotide analogues and mitochondria. *AIDS* 2004, 18: 137-151. PMID:15075530
50. Côté, H., B.Yip, J.Asselin *et al.* Mitochondrial:nuclear DNA ratios in peripheral blood cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients who received selected HIV antiretroviral drug regimens. *J Infect Dis* 2003, 187:1972-6.

51. Côté, H., A. Magil, M. Harrig *et al.* Exploring mitochondrial nephrotoxicity as a potential mechanism of kidney dysfunction among HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2006, 11:79-86.
52. Coussens, A.Martineau, R.Wilkinson. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Actions of Vitamin D in Combating TB/HIV. Hindawi Publishing Corporation Scientifica Volume 2014, Article ID 903680,
53. Cozzi-Lepri, A., M. French, J.Baxter *et al.* Resumption of HIV replication is associated with monocyte/macrophage derived cytokine and chemokine changes: results from a large international clinical trial. *AIDS* 2011; 25:1207-1217.
54. Cozzolino, M., M.Vidal, M.Arcidiacono, P. Tebas, K.Yarasheski, A.Dusso. HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D. *AIDS* 2003; 17:513–20.
55. Deeks, S. and J.McCune. Can HIV be cured with stem cell therapy? *Nature Biotechnology* 28(8):807–10. August 2010.
56. De Jesus, E., G.Herrera, E.Teofilo *et al.* Abacavir versus zidovudine combined with lamivudine and efavirenz, for the treatment of antiretroviral-naive HIV-infected adults. *Clin Infect Dis* 2004; 39:1038-46.
57. Delta: a randomised double-blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV-infected individuals. *Lancet* 1996, 348: 283-91.
58. Demarest, J., T.Bonny, C.Vavro *et al.* HIV-1 co-receptor tropism in treatment naive and experienced subjects. Abstract H-1136, 44th ICAAC 2004, Washington.
59. Di Giusto, D. *et al.* RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector–modified CD34+ cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Science Translational Medicine* 2(36):p. 36 - 43. June 16, 2010.
60. Dornadula, G., G.Nunnari, M.Vanella *et al.* Human immunodeficiency virus type 1-infected persons with residual disease and virus reservoirs on suppressive

highly active antiretroviral therapy can be stratified into relevant virologic and immunologic subgroups. *J Infect Dis* 2001; 183: 1682-1687.

61. Eliades, M., E.Spyrou, N.Agrawal *et al.* Meta-analysis: Vitamin D and Non - alcoholic Fatty Liver Disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013, 38 (3):246-254

62. Elias, A. and N. Brambaifa, 2013. Concentration-effect, incidence and mechanism of nevirapine hepatotoxicity. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.*, 8: 20-30.

63. Elias, A., O. Deo, O. Geoffrey and D. Enimeya. Nevirapine hepatotoxicity: Implications of risk factors. *Am. J. Pharm. Toxicol.* 2013, 8: 51-63.

64. Elias, A., N.Brambaifa *et al.* Antiretroviral toxicity and oxidative stress. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 8 (4): 187-196, 2013

65. Eron, J. HIV-1 protease inhibitors. *Clin Infect Dis* 2000, 30 Suppl 2: S160-70.

66. Fellay, J., K. Boubaker *et al.* Prevalence of adverse events associated with potent antiretroviral treatment: Swiss HIV Cohort Study, *Lancet* 2001; 27

67. Fischl, M., C.Parker, C.Pettinelli *et al.* A randomized controlled trial of a reduced daily dose of zidovudine in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1990; 323:1009-14.

68. Fox, J., B.Peters, M.Prakash *et al.* Improvement in Vitamin D deficiency following antiretroviral regime change: results from the MONET trial. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010; 26: 1-6

69. French, M., M.King, J.Tschampa, B.Silva, A.Landay. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J Infect Dis* 2009; 200:1212-1215

70. Galli, M., A.Ridolfo, F.Adorni *et al.* Body habitus changes and metabolic alterations in protease inhibitor-naive HIV-1-infected patients treated with two nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *JAIDS* 2002,

71. Galluzzi, L., M.Pinti, L.Troiano *et al.* Changes in mitochondrial RNA production in cells treated with nucleoside analogues. *Antivir Ther* 2005, 10:191-5.
72. Giacomet, V., A.Vigano, V.Manfredini *et al.* Cholecalciferol supplementation in HIV-infected youth with vitamin D insufficiency: effects on vitamin D status and T-cell phenotype: a randomized controlled trial. *HIV Clin Trials*. 2013 Mar-Apr;14(2):51-60.
73. Gil, L., A. Tarinas, D. Hernadez, B.V. Riveron and D.Perez *et al.* 2010 WITHDRAWN: Altered oxidative stress indexes related to disease progression marker in human immunodeficiency virus infected patients with antiretroviral therapy. *Biomed. Pharmacother.*
74. Glesby, D.R., 2002. Overview of mitochondrial toxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors.
75. Guaraldi, G., S. Cocchi, A. Motta *et al.* Efficacy and safety of atazanavir in patients with end-stage liver diseases. *Infection* 2009; Jun; 37(3) 250-5.
76. Hassan, A., A.A. Babadoko, A.I. Mamman and S.Ahmed. Zidovudine induced pure red cell aplasia: A case report. *Niger J. Med.*,2009, 18: 332-333.PMID: 20120657
77. Hammer, S., D.Katzenstein, M.Hughes *et al.* A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. *N Engl J Med* 1996, 335:1081-90.
78. Havlir, D., C.Tierney, G.Friedl *et al.* In vivo antagonism with zidovudine plus stavudine combination therapy. *J Infect Dis* 2000, 182: 321-5.
79. Hazuda, D., P.Felock, M.Witmer *et al.* Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 2000, 287:646-50.
80. Haug, C., F.Muller, P.Aukrust, S.Froland. Subnormal serum concentration of 1,25-vitamin D in human immunodeficiency virus infection:correlation with degree of immune deficiency and survival. *J Infect Dis*1997; 169:889–93.

81. Hicks, C., P.Cahn, D.Cooper *et al.* Durable efficacy of tipranavir-ritonavir in combination with an optimised background regimen of antiretroviral drugs for treatment-experienced HIV-1-infected patients at 48 weeks in the RESIST studies: an analysis of combined data from two randomised open label trials. *Lancet* 2006, 368:466-475
82. Hill, A., W. Sawyer and B. Gazzard. Effects of first-line use of nucleoside analogues: Efavirenz and ritonavir-boosted protease inhibitors on lipid levels. *HIV Clin. Trials*.2009, 10: L1-S12. PMID: 19362991
83. Ho, D. Time to hit HIV, early and hard. *N Engl J Med* 1995, 333:450-1.
84. Ho, D., A.Neumann, A.Perelson *et al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995, 373:123-6.
85. Holick, M. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266–81.
86. Hoffman, Rockstroh. *HIV 2012/2013*.
87. Hou, W., H.Kang, B.Kim. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. *J Exp Med* 2009; 206: 313-328.
88. Hughes, P., E. Cretton-Scott, A. Teague and T.M. Wensel. Protease inhibitors for patients with HIV-1 infection: A comparative overview. *P T.*, 2011, 36: 332-345. PMID: 21785550
89. Hurwitz, B., J. Klaus, M. Llabre, A. Gonzalez and P. Lawrence *et al.* Suppression of human immunodeficiency virus type 1 viral load with selenium supplementation. *Arch. Intern. Med.*,2009, 167: 148-154.
90. Hypponen, E., E. Laara, A. Reunanen, M. Jarvelin, S.Virtanen. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001; 358:1500-1503.
91. Izzedine, H., J.Hulot, D. Vittecoq *et al.* Long-term renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in antiretroviral-naive HIV-1-infected patients. Data from a double-blind randomized active-controlled multicentre study. *Nephrol Dial Transplant* 2005, 20:743-6.

92. James, C., P. Lee and M. Sweet. Rilpivirine: A second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 2012, 69: 857-861.
93. Jena, A., R. Sachdeva, A. Sharma and A. Wanchu. Adverse drug reactions to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based antiretroviral regimen: A 24-week prospective Study. *J. Int. Assoc. Providers of AIDS Care*, 2009, 8: 318-322.
94. Jarett, O. Evaluating the clinical benefit of IL2 plus antiretroviral therapy is raising CD4 Tcell count sufficient. *Curr HIV/AIDS Rep* 2010; Feb (1), 1-3
95. Katlama, L.P., R. Haubrich and J. Lalezaric. Efficacy and safety of etravirine in treatment experienced, HIV-1 patients: Pooled 48-week analysis of two randomized, controlled trials. *AIDS*, 2009, 23: 2289-2300.
96. Kaferle, J. and C. Strzoda. Evaluation of macrocytosis. *Am. Fam. Phys.*, 2009, 1: 203-208.
97. Kempf, D., K. Marsh, G. Kumar *et al.* Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the HIV protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, 41:654-60.
98. Khoo, A., L. Chai, H. Koenen, F. Sweep *et al.* Regulation of cytokine responses by seasonality of vitamin D status in healthy individuals. *Clin. Exp. Immunol.* 2011, 164, 72-79.
99. Kinai, E., H. Hanabusa. Renal tubular toxicity associated with tenofovir assessed using urine-beta 2 microglobulin, percentage of tubular reabsorption of phosphate and alkaline phosphatase levels. *AIDS* 2005
100. Kirk, O., A. Mocroft, T. Katzenstein *et al.* Changes in use of antiretroviral therapy in regions of Europe over time. *AIDS* 1998, 12: 2031-9.
101. Krutik, S., M. Hewison, P. Liu *et al.* IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J Immunol* 2008; 181: 7115-7120.

102. Lallemand, F., Y.Salhi, F.Linard, A.Giami, W.Rozenbaum. Sexual dysfunction in 156 ambulatory HIV infected men receiving HAART combinations with and without protease inhibitors. *J AIDS* 2002, 30:187-90.
103. Lambert, J., M.Seidlin, R.Reichman *et al.* 2',3'-dideoxyinosine (ddI) in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *N Engl J Med* 1990, 322:1333-40.
104. Lataillade, M., M.Kozal. The hunt for HIV-1 integrase inhibitors. *AIDS Patient Care STDS* 2006,20:489-501.
105. Lattuada, E., M.Lanzafame, G.Zoppini *et al.* No influence of nevirapine on vitamin D deficiency in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; 25:849–50.
106. Lennox, J.L., E. DeJesus and A.A. Lazzarin. STARTMRK investigators. Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: A multicentre, double-blind randomised controlled trial. *Lancet*, 2009, 374: 796-806.
107. Lewin, S. and C. Rouzioux. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS* 25(7):885–97. April 24, 2011.
108. Lewis, W. Mitochondrial dysfunction and nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy: Experimental clarifications and persistent clinical questions. *Anti. Res.*2003, 58: 189-197. PMID: 12767466
109. Lewis, M. *et al.* Gold drug auranofin restricts the viral reservoir in the monkey AIDS model and induces containment of viral load following ART suspension. *AIDS* 25(11):1347–56. July 17, 2011.
110. Liu, P., S.Stenger, H.Li, L.Wenzel *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006, 311, 1770–1773.
111. Lundgren, J., P. Reiss and S. Worm. Risk of myocardial infarction with exposure to specific ARV from the PI, NNRTI and NRTI drug classes:the D:A:D

study. Proceedings of the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal, Feb. 8-11,2009, Alexandria, VA, USA., pp: 318-330.

112. Madruga, J.V., P. Cahn, B. Grinztejn, R. Haubrich and J.Lalezari *et al.* Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2007, 370: 29-38. PMID: 17617271

113. Mallon, P., P.Unemori, R. Sedwell *et al.* In vivo, nucleoside reverse-transcriptase inhibitors alter expression of both mitochondrial and lipid metabolism genes in the absence of depletion of mitochondrial DNA. *J Infect Dis* 2005

114. Mandas, A., E. Lorio, M. Congiu, C. Balestrieri and A. Mereu *et al.* Oxidative imbalance in HIV- 1 infected patients treated with antiretroviral therapy. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2009, 18: 67-79.

115. Manfredi, R., L.Calza. Nevirapine versus efavirenz in 742 patients: no link of liver toxicity with female sex, and a baseline CD4 cell count greater than 250 cells/microl. *AIDS* 2006; 14;20:2233-6.

116. Martinez, E., J.Arnaiz, D. Podzamczar *et al.* Substitution of nevirapine, efavirenz or abacavir for protease inhibitors in patients with HIV infection. *N Eng J Med* 2003; 349:1036-46.

117. Marzolini, C., A.Telenti, L.Decosterd *et al.* Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2001; 15:71-75.

118. Masia, M., S. Padilla, E. Bernal, M.V. Almenar and J.Molina *et al.* Influence of antiretroviral therapy on oxidative stress and cardiovascular risk:A prospective cross-sectional study in HIV-infected patients. *Clin. Therap.*, 2007, 29: 448-455.

119. Maxson, C., S.Greenfield, J.Turner. Acute pancreatitis as a common complication of 2',3'- Dideoxyinosine therapy in the acquired Immunodeficiency syndrome. *Am J Gastroenterol* 1992, 87:708-13.

120. Mayer, H., E. van der Ryst, M.Saag *et al.* Safety and efficacy of maraviroc, a novel CCR5 antagonist, when used in combination with optimized background therapy for the treatment of antiretroviral-experienced subjects infected with dual/mixed-tropic HIV-1: 24-week results of a phase 2b exploratory trial. Abstract ThLB0215, XVI IAC 2006, Toronto.
121. Mbuagbaw, L., J.Irlam, A.Spaulding, G.Rutherford, N.Siegfried. Efavirenz or nevirapine in three-drug combination therapy with two nucleoside-reverse transcriptase inhibitors for initial therapy of HIV infection in antiretroviral - naïve individuals. *Cochrane Database Syst Rev* 2010,12:CD004246
122. McKee, E., A.Bentley, M.Hatch *et al.* Phosphorylation of thymidine and AZT in heart mitochondria: elucidation of a novel mechanism of AZT cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2004, 4:155-67.
123. Meanwell, N.A. and J.F. Kadow. Maraviroc, a chemokine CCR5 receptor antagonist for the treatment of HIV infection and AIDS. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 2007, 8: 669-681.
124. Mehta, S., D.Spiegelman, F.Magusi, E.Giovanucci, G.Msmanga, W.Fawzi. Vitamin D HIV-related complications and HIV disease progression women in Tanzania. In: Program and abstracts of the 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections (San Francisco, CA). 2010.
125. Mehta, S., E.Giovanucci, F.Mugusi, D.Spiegelman, S.Aboud *et al.* Vitamin D status of HIV-infected women and its association with HIV disease progression, anemia, and mortality. *PLoS One* 2010; 5: e8770.
126. Meira DA, Almeida RAMB, Barbosa NA, Souza LR, Olivo TET, Henriques RMS, et al. Assessment of cytokine values in serum by RT-PCR in HIV-1 infected individuals with and without highly active anti-retroviral therapy (HAART). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2008; 14:685-702.
127. Milazzo, L., B. Menzaghi, I. Caramma, M. Nasi and O.Sangaletti *et al.* Effect of antioxidants on mitochondrial function in HIV-1-related lipodystrophy: A pilot study. *AIDS* 2010, 26: 1207-1214.

128. Miossec, P., T.Korn, V.Kuchroo. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 2009, 361, 888–898.
129. Miro, O., S.Lopez, E.Pedrol *et al.* Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART related lipodystrophy. *Antivir Ther* 2003, 8:333-8.
130. Mitri, J., M.Muraru, A.Pittas. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65: 1005-1015.
131. Mocroft, A., C.Katlama, A.Johnson *et al.* AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study. *Lancet* 2000, 356:291-6.
132. Molina, J., P.Cahn, B.Grinsztejn, A.Lazzarin, A. Mills *et al.* Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment naïve adult infected with HIV-1(ECHO): a phase 3 randomised double - blind active- controlled trial. *Lancet* 2011, Jul16;378(9787):238-46.
133. Moyle, G., M.Sadler. Peripheral neuropathy with nucleoside antiretrovirals: risk factors, incidence and management. *Drug Safety* 1998, 19:481-94.
134. Moyle, G., A.Wildfire, S.Mandalia *et al.* Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005, 191:866-72.
135. Mueller, N., C.Fux, B.Ledergerber *et al.* High prevalence of severe vitamin D deficiency in combined antiretroviral therapy-naïve and successfully treated Swiss HIV patients. *AIDS* 2010; 24:1127–34.
136. Nair, V. HIV integrase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol* 2002, 12:179-93.
137. Ngondi, J., J. Oben, D.Forkah, L.Etame and D.Mbanya. The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. *AIDS Res. Therap.*, 2006, 3: 19-26.
138. Nikolova, M., M. Carriere, M. Jenabian *et al.* Adenosine Pathway Is Involved in AIDS Progression. *PLoS Pathog.* 2011Jul;7(7):e1002110 (IF 9.34)

139. Nixon, D., A.Landay. Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5: 498-503.
140. Nolan, D. Metabolic complications associated with HIV protease inhibitor therapy. *Drugs* 2003, 63:2555-74.
141. Noor, M. The role of protease inhibitors in the pathogenesis of HIV-associated insulin resistance: Cellular mechanisms and clinical implications. *Curr. HIV/AIDS Rep.*, 2007, 4: 126-134
142. Norris, P., B.Pappalardo, B.Custer *et al.* Elevations in IL-10, TNF $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  from the earliest point of HIV Type 1 infection. *AIDS Res Hum Retrov* 2006; 22:757-762.
143. Nunnari, G, Y. Xu, E. Aheampong *et al.* Exogenous IL-7 induces Fas-mediated human neuronal apoptosis: potential effects during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Neurovirol* 2005; 11: 319-328.
144. Nunnari, G., R.Pomerantz. IL-7 as a potential therapy for HIV-1-infected individuals. *Expert Opin BiolTher* 2005; 5: 1421-1426.
145. Nunez, M. Clinical syndromes and consequences of antiretroviral-related hepatotoxicity. *Hepatology* September 2010, Vol 52, Issue 3: 1143 - 1155
146. Oldfield, V., G.Keating, G.Plosker. Enfuvirtide: A Review of its Use in the Management of HIV Infection. *Drugs* 2005, 65:1139-60.
147. Omdahl, J., H.Morris, B.May. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression,function, and regulation. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:139-166.
148. Onen, N., A.Agbebi, E.Shacham, K.Stamm, A.Onen, E.Overton. Frailty among HIV-infected persons in an urban outpatient care setting. *J Infect* 2009; 59:346–52.
149. Otero, M., G.Nunnari, D.Leto, J.Sullivan *et al.* Peripheral blood Dendritic cells are not a major reservoir for HIV type 1 in infected individuals on virally suppressive HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003; 19: 1097-1103.

150. Ouyang, D., D.Shapiro, M.Lu *et al.* Increased risk of hepatotoxicity in HIV - infected pregnant women receiving antiretroviral therapy independent of nevirapine exposure. *AIDS* 2009;23:2425-2430.
151. Pablo, B., V. Sorianoa, E. Casasb, J. Gonzalez-Lahoza. Different degree of immune recovery using antiretroviral regimens with protease inhibitors or non-nucleosides.*AIDS*2002;16:245-249
152. Perelson, A., A.Neumann, M.Markowitz, J.Leonard, D.Ho. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearancerate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996, 271:1582-6.
153. Peters, C., T.Kawabata, P.Syntin *et al.* Assessment of immunotoxic potential of maraviroc in cynomolgus monkeys. Abstract 1100, 45th ICAAC 2005, Washington.
154. Peters, P., J.Striner, M.McConnell *et al.* Nevirapine-associated hepatotoxicity was not predicted by CD 4 count>250 cells/ml, among women in Zambia, Thailand and Kenya. *HIV Med* 2010;11:650-60
155. Peterson, C., M.Heffernan. Serum tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women. *J. Inflamm.* 2008, 5, 10.
156. Peyriere, H., J.Reyne *et al.* Renal tubular dysfunction associated with tenofovir therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:269–73.
157. Pineda, J., J.Santos, A.Rivero *et al.* Liver toxicity of antiretroviral combinations including atazanavir/ ritonavir in patients co-infected with HIV and hepatitis viruses: impact of pre-existing liver fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2008, Apr;61(4):925-32.
158. Pinzone, M., M.DiRosa, M.Malaguarnera, D.Madeddu *et al.* Vitamin D deficiency in HIV infection: an underestimated and undertreated epidemic. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2013; 17: 1218-1232

159. Pittas, A., S.Harris, P.Stark, B.Dawson-Hughes. The effects of calcium and vitamin D supplementation on blood glucose and markers of inflammation in non-diabetic adults. *Diabetes Care* 2007; 30: 980-986.
160. Pocernich, C., R. Sultana, H. Mohmmad-Abdul, A.Nath and A. Butterfield, 2005. HIV-dementia, Tat induced oxidative stress and antioxidant therapeutic considerations. *Brain Res. Rev.*, 50: 14-26.
161. Podzamczar, D., E.Ferrer, E.Consiglio *et al.* A randomized clinical trial comparing nelfinavir or nevirapine associated to zidovudine/lamivudine in HIV-infected naive patients (the Combine Study). *Antivir Ther* 2002, 7:81-90.
162. Pommier, Y., A.Johnson, C.Marchand. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4:236-48.
163. Redig, A., N.Berliner. Pathogenesis and clinical implications of HIV-related anemia in 2013. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:377-81.
164. Regidor, D., R.Detels, E.Breen, D.Widney *et al.* Effect of highly active Antiretroviral therapy on biomarkers of B-lymphocyte activation and inflammation. *AIDS* 2011, :303-314.
165. Reuse, S. *et al.* Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: implications for treatment of latent infection. *PLoS One* 4(6):e6093. June 30, 2009.
166. Richman, D. *et al.* The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* 323(5919):1304–7. March 6, 2009.
167. Rieg, G., M.Yeaman, A.Lail *et al.* Hemophilia Growth and Development Study (HGDS). Platelet count is associated with plasma HIV type 1 RNA and disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Oct;23(10):1257-61.
168. Rivero, A. and A. Jose. Liver toxicity induced by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 59: 342-346.
169. Roberts, L., J.Passmore, C.Williamson *et al.* Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS* 2010; 24:819-831.
170. Rodriguez, M., B.Daniels, S.Gunawardene, G.Robbins. High frequency of

vitamin D deficiency in ambulatory HIV-positive patients. *AIDS ResHum Retroviruses* 2009; 25:9–14.

171. Ross, A., S.Judd, T.Ziegler *et al.* Risk Factors for Vitamin D Deficiency and Relationship with Cardiac Biomarkers, Inflammation, and Immune Restoration in HIV-Infected Youth. *Antiviral therapy* 2012;17(6):1069-1078.

172. Ross, A., S.Judd, M.Kumari *et al.* Vitamin D is linked to carotid intima-media thickness and immune reconstitution in HIV-positive individuals. *Antivir Ther.* 2011; 16:555–563.

173. Saada, A., A.Shaag, H.Mande, Y.Nevo, S.Eriksson, O.Elpeleg. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 2001, 29:342-4

174. Saint-Marc, T., J.Touraine. The effects of discontinuing stavudine therapy on clinical and metabolic abnormalities in patients suffering from lipodystrophy. *AIDS* 1999, 13:2188-9.

175. Sánchez-Duffhues, G. *et al.* Activation of latent HIV-1 expression by protein kinase C agonists: a novel therapeutic approach to eradicate HIV-1 reservoirs. *Current Drug Targets* 12(3):348–56, March 1, 2011.

176. Sanne, I., H.Mommeja-Marin, J.Hinkle *et al.* Severe hepatotoxicity associated with nevirapine use in HIV-infected subjects. *J Infect Dis* 2005;191:825-9.

177. Sato, M., T.Motomura, H.Aramaki *et al.* Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. *J Med Chem* 2006, 49:1506-8.

178. Savarino, A. *et al.* “Shock and kill” effects of class I-selective histone deacetylase inhibitors in combination with the glutathione synthesis inhibitor buthionine sulfoximine in cell line models for HIV-1 quiescence. *Retrovirology* 6:52. June 2009.

179. Scarlatti, G., E.Tresoldi, A.Bjorndal *et al.* In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 1997, 3:1259-65.

180. Setzer, B., M.Schlesier, U.Walker. Functional impairment of NRTI-related mitochondrial DNA depletion in primary human T-lymphocytes. *J Infect Dis* 2005, 191:848-855
181. Schafer, J., R.Saranuy *et al.* The expanding class of NNRTI for the treatment of HIV- 1 infection. *P.T* 2011, Jun; 36(6);346-348;357-364
182. Shepherd, L., J.Souberbielle, J.Bastard *et al.* EuroSIDA in EuroCOORD. Prognostic value of vitamin D level for all-cause mortality, and association with inflammatory markers, in HIV-infected persons. *J Infect Dis.* 2014 Jul 15;210(2):234-43.
183. Sheran, M. The NNRTIs efavirenz and nevirapine in the treatment of HIV. *HIV Clin Trials* 2005, 6:158-68
184. Schneider, C. and A. De Oliveira. Oxygen free radicals and exercise: Mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev. Bras.Med. Esporte*, 2004, 10: 314-318.
185. Schrooten, W., R.Colebunders, M. Youle *et al.* Sexual dysfunction associated with protease inhibitor containing HAART. *AIDS* 2001, 15: 1019-23.
186. Siliciano, J., J.Kajdas, D.Finzi *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nature Med* 2003;9:727-728.
187. Simpson, D., M.Tagliati. Nucleoside analogue-associated peripheral neuropathy in human immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1995, 9:153-61.
188. Steel, H. Special presentation on aplaviroc-related hepatotoxicity. 10th EACS 2005, Dublin.
189. Stephensen, B., G. Marquis, L.Kruzich, S.Douglas, G.Aldrovandi and C.Wilson. Vitamin D status in adolescents and young adults with HIV infection. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1135–41.

190. Storfer, S., J.Leith, P.Piliero, D.Hall. Analysis of hepatic events within the 2NN study: controlling for ethnicity and CD4+ count at initiation of nevirapine therapy. Abstract PE9.6/2. 10th EACS 2005. Dublin.
191. Stylianou, E., P.Aukrust, D.Kvale, F.Müller, S.Frøland. IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression-down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. Clin Exp Immunol 1999; 116:115-120.
192. Sundaram, M., S. Saghayam, B. Priya, K. Venkateshand, P. Balakrishnan. Changes in antioxidant profile among HIV-infected individuals on generic highly active antiretroviral therapy in Southern India. Int. J. Infect. Dis., 2008, 12: 61-66.
193. Tebas, P. Insulin resistance and diabetes mellitus associated with antiretroviral use in HIV-infected patients: Pathogenesis, prevention and treatment options. J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.2008, 49: S86-92.
194. Terry, L., E. Sprinz, R. Stein, N. Medeiros and J.Oliveira *et al.* Exercise training in HIV-1- infected individuals with dyslipidemia and lipodystrophy. Med. Sci. Sports. Exerc.2006, 38: 411-417.
195. Torti C, S.Costarelli, A.De Silvestri *et al.* Analysis of severe hepatic events associated with nevirapine-containing regimens: CD4 + Th cell count and gender in hepatitis C seropositive and seronegative patients. Drug Saf 2007, 30:1161-9
196. Torti, C., G.Lapadula, A.Antinori, T.Quirino *et al.* Hyperbilirubinemia during atazanavir treatment in 2404 patients in the Italian atazanavir expanded access program and MASTER Cohorts. Infection 2009 Jun; 37(3); 244-9
197. Torre, D., A.Pugliese. Interleukin-18: a proinflammatory cytokine in HIV-1 infection. Curr HIV Res 2006; 4:423-430
198. Trinchieri, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. Adv Immunol 1998; 70:83-243.

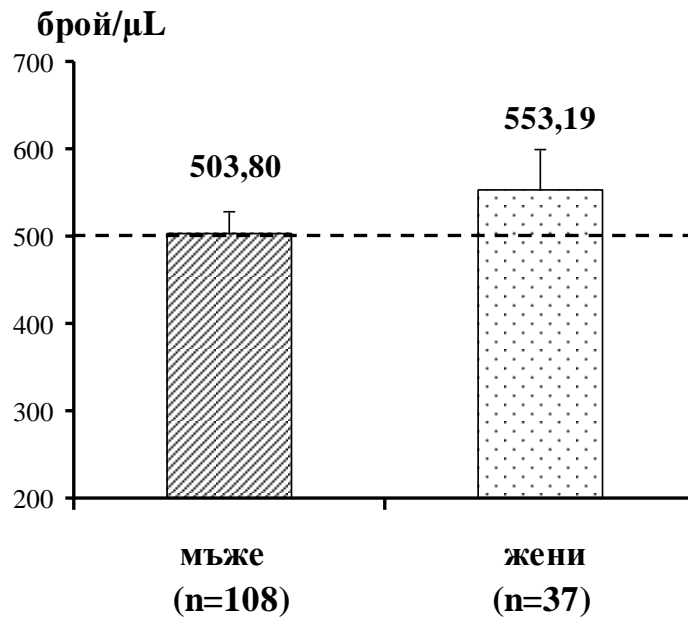
199. Trottier, B., S.Walmsley, J.Reynes *et al.* Safety of enfuvirtide in combination with an optimized background of antiretrovirals in treatment-experienced HIV-1-infected adults over 48 weeks. *JAIDS* 2005,40:413-21.
200. Turatti, L, E.Sprinz, R.Lazzaretti *et al.* Short communication: UGT1A1\*28 variant allele is a predictor of severe hyperbilirubinemia in HIV-infected patients on HAART in Southern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 2012 Sep; 28(9):1015-8.
201. Van Den Bout-Van Den Beukel, C., L.Fievez, M.Michels *et al.* Vitamin D deficiency among HIV Type 1-infected individuals in the Netherlands: effects of antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*2008; 24:1375–82.
202. Van der Valk, Reiss P. Lipid profiles associated with antiretroviral drug choices. *Curr Opin Infect Dis*2003, 16: 19-23.
203. Vandergeeten, C., R.Frometnit *et al.* IL 7 promotes HIV persistence during ART. *Blood Journal* 2013, vol121, 4321-4329
204. Vassena, L., M.Proschan, A.Fauci, P.Lusso. Interleukin 7 reduces the levels of spontaneous apoptosis in CD4+ and CD8+ T cells from HIV-1-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:2355-2360
205. Vellozzi, C., J.Brooks, T.Bush *et al.* The study to understand the natural history of HIV and AIDS in the era of effective therapy (SUNstudy). *Am J Epidemiol* 2009; 169:642–52.
206. Vescini,F., A.Cozzi-Lepri, M.Borderi *et al.* Prevalence of hypovitaminosis D and factors associated with vitamin D deficiency and morbidity among HIV-infected patients enrolled in a large Italian cohort. *J.AIDS*, 2011,Oct.1;58(2),163-72
- 207.Viard, J., J.Souberbielle, O.Kirk *et al.* For the EUROSIDA study group. Vitamin D and clinical disease progression in HIV infection: results from the EuroSIDA study.*AIDS* 2011; 25: 1305-1315.

208. Villacres, M., N.Kono, W.Mack, M.Nowicki, K.Anastos, M.Augenbraun *et al.* Interleukin 10 responses are associated with sustained CD4 T-cell counts in treated HIV infection. *J Infect Dis* 2012; 206:780-789.
209. Villamor, E. A potential role for vitamin D on HIV infection? *Nutr Rev* 2006; 64:226–33.
210. Volberding, P., S.Lagakos, M.Koch *et al.* Zidovudine in asymptomatic HIV infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. *N Engl J Med* 1990,322:941-9.
211. Walker, U., B.Setzer, N.Venhoff. Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* 2002, Nov8;16(16):2165-73
212. Walker, U., C.Hofmann, M.Enters *et al.* High serum urate in HIV-infected persons. The choice of the antiretroviral drug matters. *AIDS* 2006a, 13: 1556-8.
213. Wang, T., M.Pencina, S.Booth *et al.* Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117: 503-511.
214. Welz, T., K.Childs, F.Ibrahim, M.Poulton, F.Post. Efavirenz use is associated with severe vitamin D deficiency in a large, ethnically diverse urban UK HIV cohort. In: Program abstracts of the 5th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention (Cape Town, South Africa). 2009.
215. Westby, M., M.Lewis, J.Whitcomb *et al.* Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* 2006, 80:4909-20.
216. Wilkin, T., Z.Su, D.Kuritzkes *et al.* Co-receptor tropism in patients screening for ACTG 5211, a phase 2 study of vicriviroc, a CCR5 Inhibitor. Abstract 655, 13th CROI 2006, Denver.

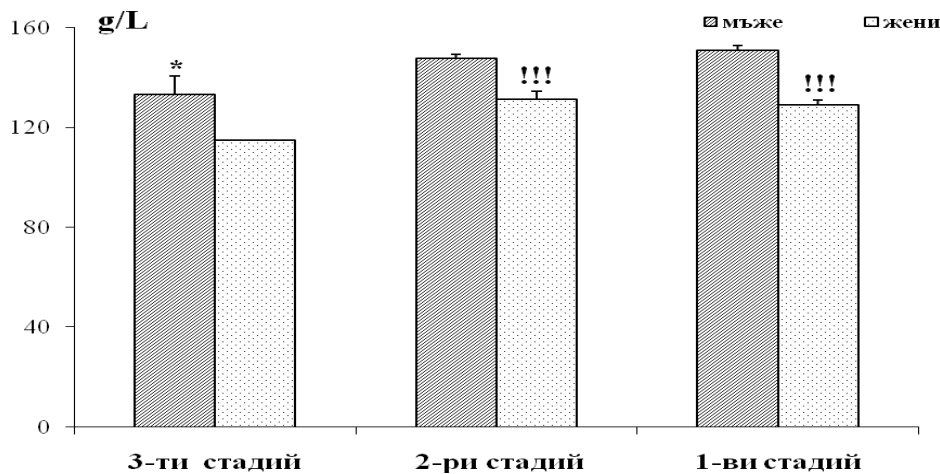
217. Wolschendorf, F. *et al.* Hit-and-run stimulation: a novel concept to reactivate latent HIV-1 infection without cytokine gene induction. *Journal of Virology* 84(17):8712–20. September 2010.
218. Woodward, C., A.Hall, I.William *et al.* Tenofovir-associated renal and bone toxicity. *HIV Med* 2009; 10:482–85
219. Wren, L., M.Parsons, G.Isitman, R.Center, A.Kelleher, I.Stratov *et al.* Influence of cytokines on HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity activation profile of natural killer cells. *PLoS ONE* 2012; 7:e38580
220. Xiaomin, S., C.Zhen-Bo, Y. Zhang, Y. Ishimi, I. Tabata and M. Higuchi. Association between Serum 25-Hydroxyvitamin D and Inflammatory Cytokines in Healthy Adults. *Nutrients* 2014, 6, 221-230
221. Youle, M., S.Staszewski, B.Clotet *et al.* Concomitant use of an active boosted protease inhibitor with enfuvirtide in treatment-experienced, HIV-infected individuals: recent data and consensus recommendations. *HIV Clin Trials* 2006; 7: 86-96.
222. Yousefi, S., A. Hadadi, A. Ostovar, B.E. Noor and M.Rasoolinejad *et al.* Protocol of determining the Effect of selenium supplementation on CD4 + Tlymphocyte count in HIV/AIDS patients: A randomized double blind placebo controlled trial. *Adv. Infect. Dis.* 2011, 1: 20-26.
223. Yuzefpolskiy, Y., F.Baumann, L.Penny, G.Studzinski, V.Kalia, S. Vitamin D receptor signals regulate effector and memory CD8 T cell responses to infections in mice. *J Nutr.* 2014 Dec;144(12):2073-82. doi: 10.3945/jn.114.202895. Epub 2014 Oct 15
224. Yusupov, E., M.Li-Ng, S.Pollack, J.Yeh, M.Mikhail, J.Aloia. Vitamin D and Serum Cytokines in a Randomized Clinical Trial. *International Journal of Endocrinology* Volume 2010 (2010), ArticleID 305054

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

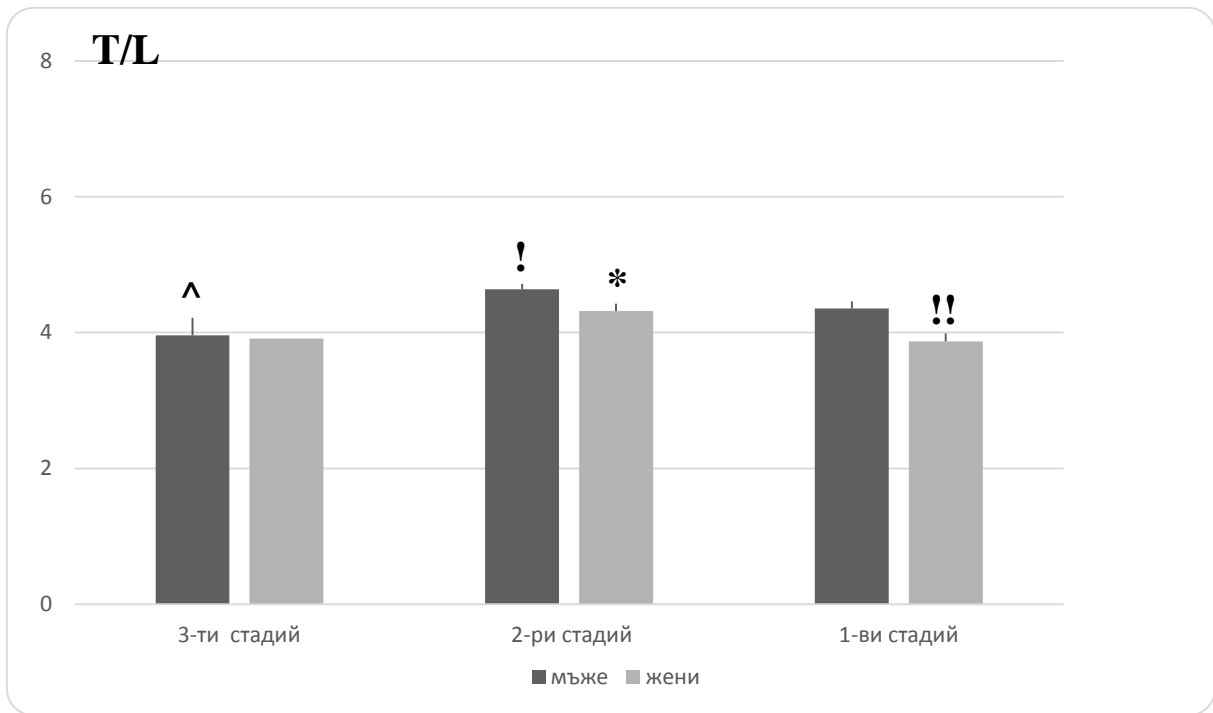
### 1.1. Фигури отпаднали след последната редакция на дисертационния труд.



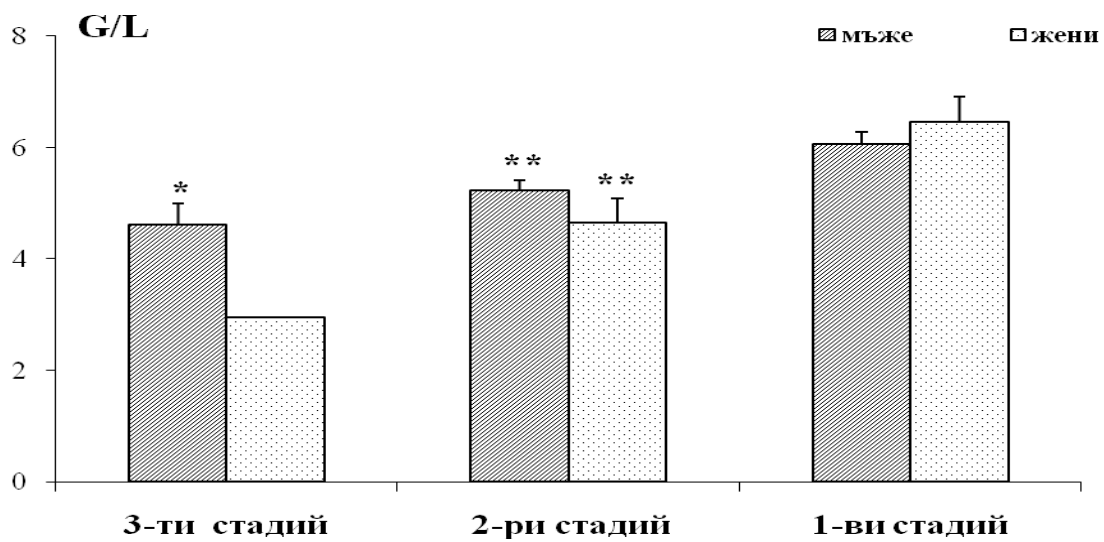
Фиг.1 CD4 клетки (mean ± SE) на изследваните пациенти, разделени според пола.



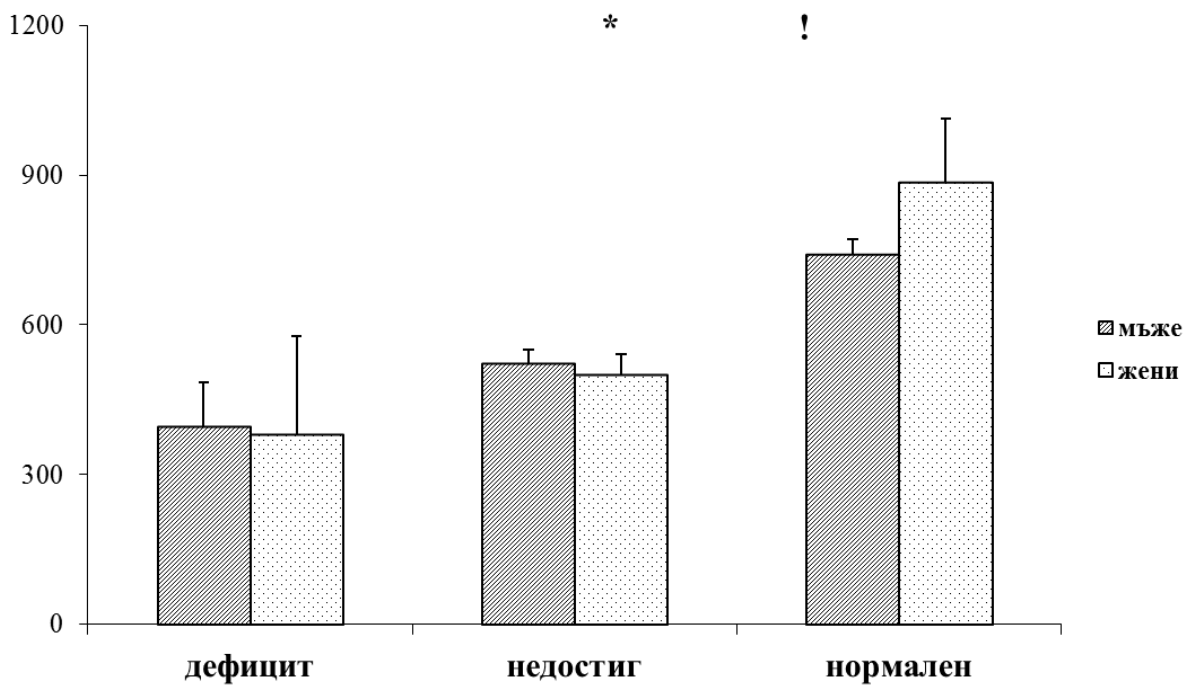
Фиг.2. Хемоглобин (mean ± SE) на изследваните пациенти, разделени според степента на имунен дефицит. Всяка група е разделена и по пол. \* -  $p < 0.05$ , ! - достоверни разлики между половете.



Фиг.3 Еритроцити (mean ± SE) на изследваните пациенти, разделени според степен на имунен дефицит. \*\* -  $p < 0.01$ .

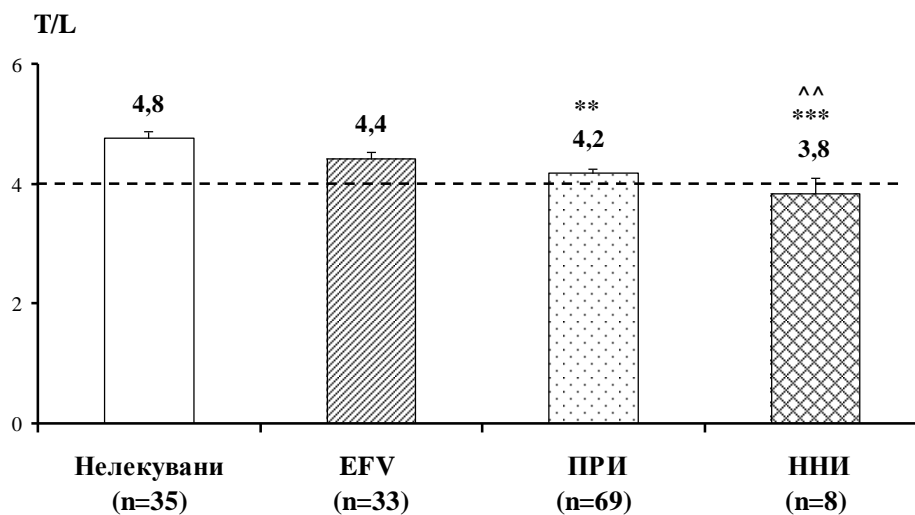


Фиг.4 Левкоцити (mean ± SE) на изследваните пациенти, разделени спрямо тежестта на имунния дефицит. \* -  $p < 0.05$  и \*\* -  $p < 0.01$ .

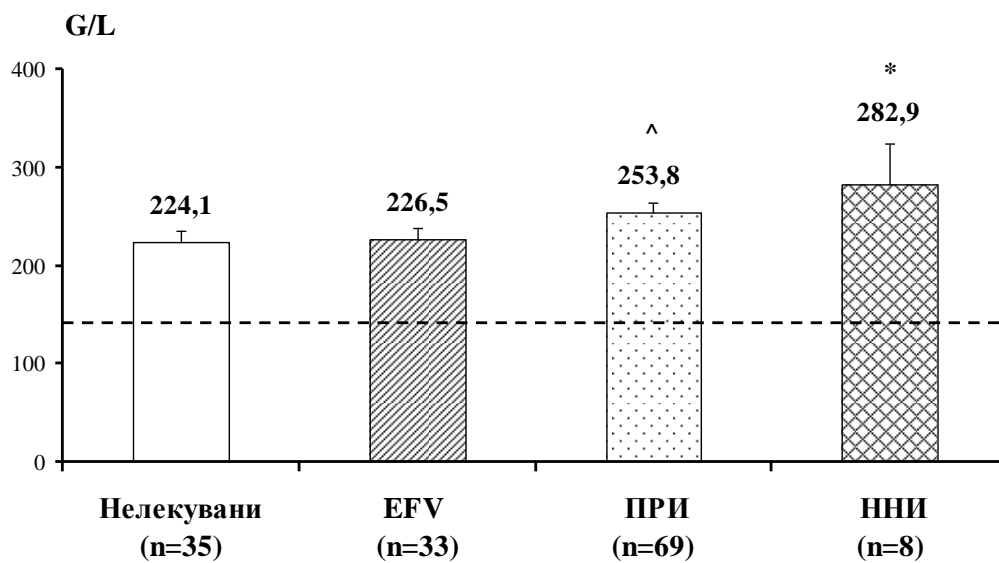


Фиг.5 CD4 клетки (mean ± SE) на изследваните пациенти, разделени спрямо серумните нива на 25(OH)D (дефицит <10 ng/ml, недостиг - 10-30 ng/ml и нормален > 30 ng/ml).

\* -  $p < 0.05$  и ! - достоверни разлики между половете.



Фиг.6 Еритроцити (mean ± SE) на изследваните пациенти, разделени в четири групи, според приложеното лечение. Достоверните разлики между групата наивни и останалите три групи са означени с \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ , а между лекувани с EFV и ННИ - ^^ ( $p < 0.01$ ).



Фиг.7 Тромбоцити (mean ± SE) на изследваните пациенти, разделени според приложеното лечение. EFV-efavirenz, ПРИ - протеазни инхибитори, ННИ – ненуклеозидни инхибитори (NVP). Достоверните разлики между групата, нелекувани и останалите групи са означени със \* -  $p < 0.05$ , а с ^ - между лекувани с EFV и ПРИ.

**1.2. Таблицы отпаднали след последната редакция на дисертационния труд.**

*Таблица 1. Средни стойности на проследените лабораторни и имунологични показатели при мъжете, разделени според серумното им ниво на 25(OH)D*

25 (OH)D	Hb	Er	Leu	Thr	glu	chol	creat	ALT	CD4
Дефицит <10 ng/ml	141.40	4.13	4.59	241.20	5.85	4.70	64.69	45.10	395.50
Недостиг 10-30 ng/ml	148.69	4.51	5.64	228.36	5.72	4.80	68.32	39.64	523.43
Достатъчно >30 ng/ml	151.00	4.36	6.07	238.09	5.80	5.60	67.08	33.93	740.56

*Таблица 2. Средни стойности на проследените лабораторни и имунологични показатели при жените, разделени според серумното им ниво на 25(OH)D*

25 (OH)D	Hb	Er	Leu	Thr	glu	chol	creat	ALT	CD4
Дефицит <10 ng/ml	131.67	3.93	6.75	224.00	5.95	4.60	52.20	29.33	380.00
Недостиг 10-30 ng/ml	130.00	4.05	5.41	259.29	5.54	5.60	58.85	24.50	500.39
Достатъчно >30 ng/ml	126.17	4.10	6.14	328.67	4.84	5.60	62.57	24.83	886.17

**Таблица 3. Средни стойности на проследените показатели на пациентите, разпределени според прием и вид на АРТ.**

АРТ	Hb	Er	Leu	Thr	glu	chol	creat	ALT	CD4	25(OH)D
Наивни пациенти n=35	146.60	4.80	5.70	224.10	5.90	4.50	68.70	34.60	527.20	21.30
Лекувани с EFV n=33	146.40	4.40	5.20	226.50	5.70	5.60	64.20	49.30	431.70	17.10
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=8	137.40	3.80	5.00	282.9	6.20	5.50	66.20	50.9	533.00	20.40
Лекувани с PIs n=69	140.80	4.20	5.80	253.80	5.80	5.10	68.20	29.40	549.50	23.00

**Таблица 4. Средни стойности на проследените показатели на изследваните мъже, разпределени според прием и вид на АРТ**

АРТ	Hb	Er	Leu	Thr	glu	chol	creat	ALT	CD4	25(OH)D
Наивни пациенти n=30	150.10	4.80	5.60	217.30	5.80	4.40	70.70	34.60	498.00	19.40
Лекувани с EFV n=24	152.30	4.60	5.20	226.00	5.60	5.60	67.90	57.10	430.10	18.50
Лекувани с NNRTIs (NVP) n=4	142.80	3.80	4.40	262.00	6.00	4.50	81.20	75.30	482.00	17.50
Лекувани с PIs n=50	145.10	4.20	5.80	243.90	5.80	4.90	70.00	32.00	544.40	23.50

*Таблица 5. Средни стойности на проследените показатели на изследваните жени, разпределени според прием и вид на АРТ*

<b>АРТ</b>	<b>Hb</b>	<b>Er</b>	<b>Leu</b>	<b>Thr</b>	<b>glu</b>	<b>chol</b>	<b>creat</b>	<b>ALT</b>	<b>CD4</b>	<b>25(OH)D</b>
<b>Наивни пациенти n=5</b>	<b>125.40</b>	<b>4.60</b>	<b>6.00</b>	<b>265.20</b>	<b>6.20</b>	<b>4.60</b>	<b>56.20</b>	<b>26.60</b>	<b>702.20</b>	<b>32.40</b>
<b>Лекувани с EFV n=9</b>	<b>130.70</b>	<b>3.90</b>	<b>5.10</b>	<b>227.70</b>	<b>5.80</b>	<b>5.70</b>	<b>54.20</b>	<b>28.40</b>	<b>435.80</b>	<b>13.40</b>
<b>Лекувани с NNRTIs (NVP) n=4</b>	<b>132.00</b>	<b>3.90</b>	<b>5.60</b>	<b>303.80</b>	<b>6.40</b>	<b>6.50</b>	<b>51.20</b>	<b>26.50</b>	<b>584.00</b>	<b>23.40</b>
<b>Лекувани с PIs n=19</b>	<b>129.50</b>	<b>4.00</b>	<b>5.80</b>	<b>279.70</b>	<b>5.50</b>	<b>5.40</b>	<b>63.50</b>	<b>22.50</b>	<b>563.10</b>	<b>21.80</b>