

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

Д-р Нина Стоянова Янчева – Петрова

УСЛОЖНЕНИЯ НА АНТИРЕТРОВИРУСНАТА ТЕРАПИЯ ПРИ
ХИВ-ПОЗИТИВНИ ПАЦИЕНТИ

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

София, 2015

Дисертацията съдържа 167 страници, 40 таблици и 46 фигури. В библиографията са включени 224 заглавия, от които 9 на кирилица и 215 на латиница.

Дисертационната работа е извършена в СБАЛИПБ“Проф.Ив. Киров“ЕАД, Отделение за лечение на придобита имунна недостатъчност.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина, проведен на 25.03.2015 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 20.07.2015 г. от 13.00 ч. в зала №1 на Катедрата по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина, гр.София, бул.,„Акад.Ив.Ев.Гешов“№17, съгласно чл.76 и чл.77 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ-София и въз основа на Заповед № РК 36-648/16.04.2015г. на МУ-София, пред научно жури в състав:

Председател: Проф.д-р Татяна Петрова Пенкова-Червенякова, дмн

Членове: Проф.д-р Марияна Стойчева Въртигова, дмн

Проф.д-р Камен Сотиров Плочев, дмн

Проф.д-р Мария Християнова Николова, дмн

Проф.д-р Майда Михайлова Тихолова-Митова, дм

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по инфекциозни болести, паразитология и тропическа медицина и са публикувани на интернет страницата на МУ-София.

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

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

Д-р Нина Стоянова Янчева – Петрова

УСЛОЖНЕНИЯ НА АНТИРЕТРОВИРУСНАТА ТЕРАПИЯ ПРИ
ХИВ-ПОЗИТИВНИ ПАЦИЕНТИ

АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

Научна специалност: Инфекциозни болести
Шифър 7.1. Медицина

Научен ръководител
Проф.Д-р Татяна Червенякова, д.м.н

Официални рецензенти:
Проф.Д-р Камен Плочев, д.м.н.
Проф.д-р Марияна Стойчева – Въртигова, д.м.н.

София, 2015

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 – фузеонни инхибитори

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

HAART – Високоактивна антиретровирусна терапия

HDAC - инхибитори на хистондеацетилазата

HIV – Човешки имунодефицитен вирус

IFN- γ – интерферон гама

II – интегразни инхибитори

IL – интерлевкин

MAC - mycobacterium avium complex

NNRTIs – ненуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза

NRTIs – нуклеозидни инхибитори на обратната транскриптаза

NVP – nevirapin

PIs – протеазни инхибитори

RIA - радиоимунологичен анализ

RPV - rilpivirine

TDF – tenofovir disoproxil fumarate

TLR - toll like рецептори

Treg - Т регулаторни клетки

TNF- α – 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 показаха, 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.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ: Целта на настоящата работа е да се проследят и анализират отклоненията в основни лабораторни и имунологични показатели и серумните нива на 25(OH)D 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- α и IFN- γ).

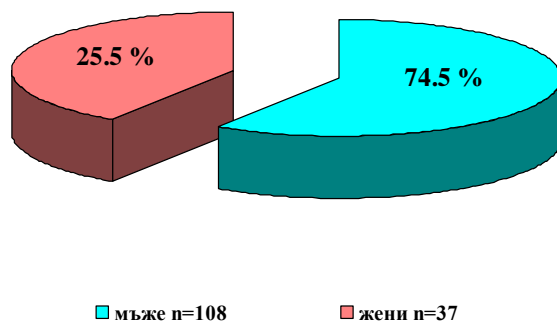
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

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.1



Фиг.1 Разпределение по пол на изследваните HIV - инфектирани пациенти

Средната обща възраст на всички изследвани лица е 34.9 ± 9.3 години.

Средната възраст на мъжете е 34.8 ± 9.2 години, а на жените 35.2 ± 9.5 .

Пациентите са проследявани амбулаторно. Не са наблюдавани усложнения на терапията, налагащи хоспитализация. От проследените пациенти, по-голяма част 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 извършвано специализирано

изследване на серумното ниво на 25(OH)D, като кръвните проби за целта са събирани в месеците от ноември до март. Целенасочено са 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 са 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 е 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 е осъществено 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 са проведени в сектор Клинична лаборатория на СБАЛИПБ”Проф.Иван Киров”сътс 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 160g/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 лейкоцити 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 μmol/l, а за жени между 44 - 96 μmol/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 (25OHVitaminDtotal-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 предварително са 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 е тестът VIDAS® 25OH Vitamin D Total, произведен от bioMérieux, Франция. Тестът е количествен и използва технологията на ензимно свързано 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".

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 абсолютният 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 Cantotm7-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.

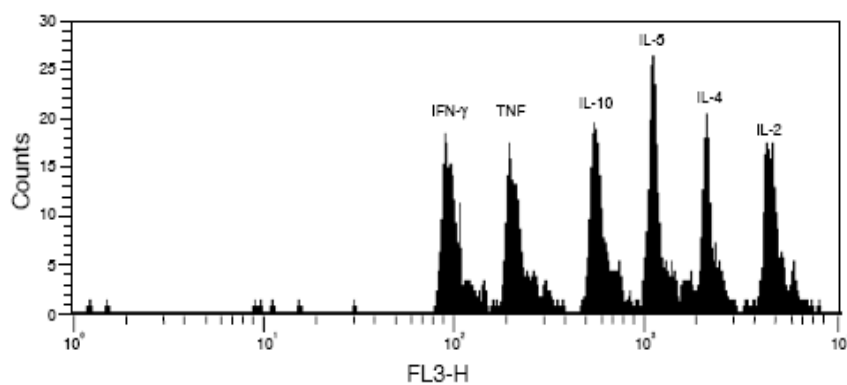
2.3.2. Определяне на Th1/Th2 цитокинов профил с ”Human Th1/Th2 Cytokine Kit”BDTM CBA(Cytometric Bead Array)

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 *invitro* 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 некрозис 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 антитяло за един от цитокините IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α и IFN-γ (фиг. 2). 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 антители), 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™ CBA в една епруветка могат едновременно да бъдат определени количествено IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α и IFN- γ .



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

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

FACSCComp – специализиран софтуер на BD Biosciences за CellQuestPro™ ver. 5.1 - специализиран софтуер на BD Biosciences за PC 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 χ^2 Тест.
5. Доказване на достоверните разлики в съответните променливи за групите изследвани пациенти беше извършено чрез непараметрични тестове (Mann-Whitney Utest за независими променливи и еднофакторна ANOVA).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Пожизненият прием на комбинирана антиретровирусна терапия изисква използването на медикаменти с минимални странични ефекти и минимална дългосрочна токсичност.

I. Оценка на влиянието на провежданата ART върху стойностите на основни лабораторни показатели.

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

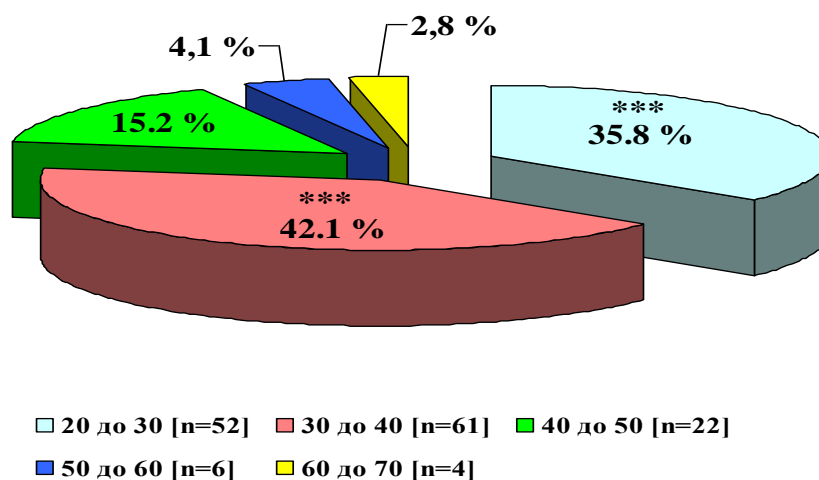
2 група - от 30 до 40 години

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 (χ^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.3).



Фиг.3 Процентно разпределение на изследваните пациенти, разделени във възрастови групи.

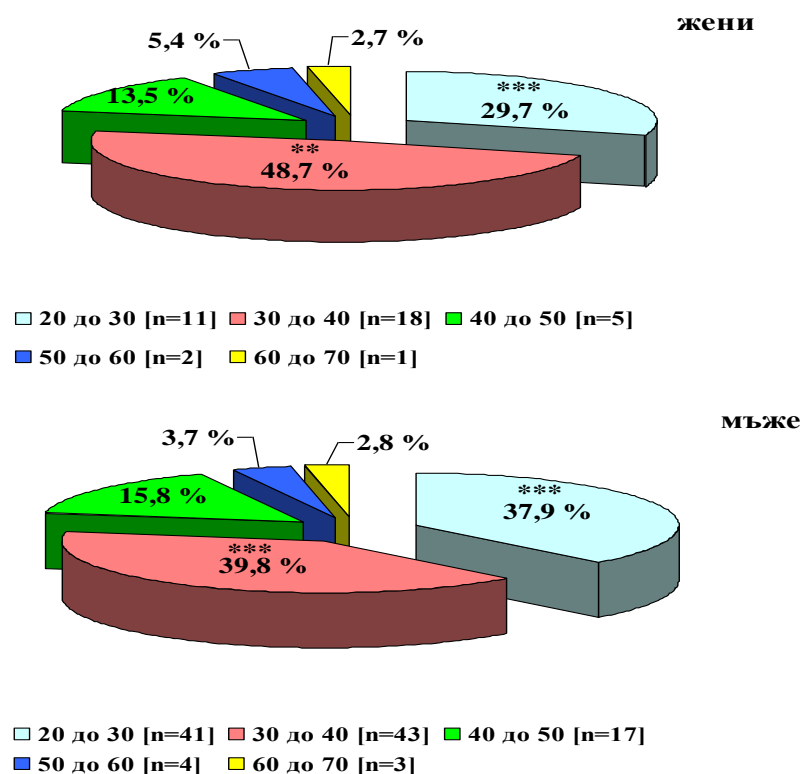
Значимата разлика е отбелязана със звездичка ($p > 0.001$)

Референтните граници за някои от изследваните лабораторни параметри имат различия в зависимост от пола. Поради тази причина направихме 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 (χ^2 тест, $p= 0.0001$), докато при жените процентът в втората група е достоверно (χ^2 тест, $p= 0.006$) по-голям от този на трета и на четвърта групи (χ^2 тест, $p= 0.0011$) (фиг.4).

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



Фиг.4 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).

2. Механизъм на инфектиране с HIV на проследените 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 1.

Таблица 1

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 %

3. Анализи на получените резултати

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 са използвани непараметрични тестове.

На таблици 2 и 3 са представени основните проследени показатели със съответните минимални, максимални и средни стойности, стандартните им отклонения, както и броя и % мъже и жени с отклонения в тези показатели.

Таблица 2. Проследени показатели при изследваните мъже

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

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

Таблица 3. Проследени показатели при изследваните жени

Показатели Жени n=37	Min	Max	Mean	SD	Abnormal n	Abnormal %
Hb	102	151	129.51	10.97	8	21.1
Er	3.00	5.47	4.05	0.53	6	16.1
Leuco	2.25	12.00	5.64	2.07	6	16.1
Thr	139	511	267.68	75.10	0 / 1>	0/ 2.7
ALT	11	62	24.95	36.13	5	13.2
Glu	3.69	8.01	5.80	0.98	13	35
Chol	3.16	10.20	5.51	1.63	11	30
Creat	36.10	100	58.91	12.94	0	0
25(OH)D	7.40	90.10	21.36	14.36	31	83
CD4	63	1283	553.19	279.11	16	40.5

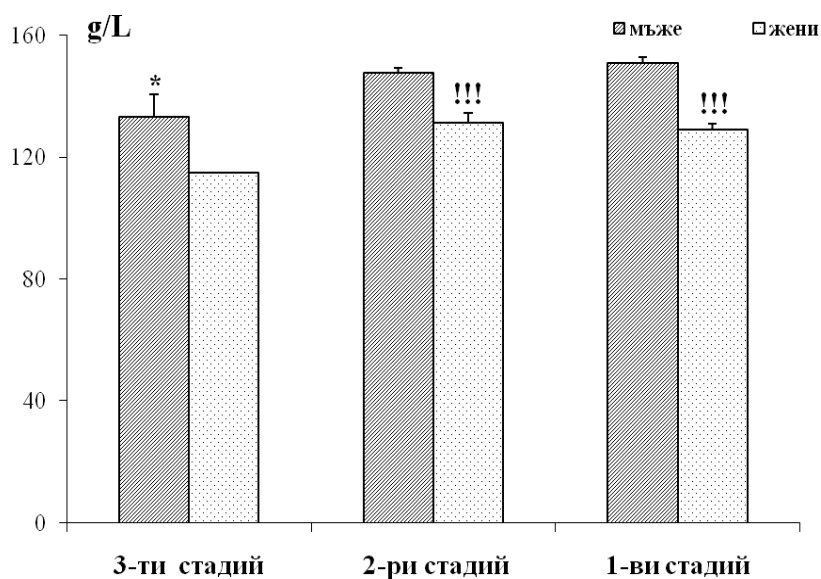
*Със знак >е отбелязан броят на жените със стойности на тромбоцитите над горна граница, няма жени с по-ниски от нормалните стойности на тромбоцитите

Нашите данни показаха абнормни стойности по отношение на показателите на кръвната картина и някои биохимични показатели – кръвна захар, холестерол и ALT. Не за всички отклонения установихме статистически значимо влияние на провежданата АРТ.

От показателите на кръвната картина установихме отклонения в *хемоглобина* и *еритроцитите* при значителна 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 със стойности на *еритроцитите* по-ниски от нормалните.

Анализите на данните показаха, че значим фактор влияещ на стойностите на хемоглобина и еритроцитите е броят на CD4 клетките, т.е. степента на имунен дефицит. Мъжете в трети стадий на HIV – инфекция (CD4 клетки <200/ μ l) имат сигнификантно по-нисък хемоглобин от пациентите с по-висок брой CD4 клетки, т.е. с по-добър имунитет ($p=0.01826$) (фиг.5). Аналогични са данните ни и по отношение на броя на еритроцитите. Отново мъжете в трети стадий на инфекцията с брой на CD4 < 200/ μ l, имат статистически значимо по-ниски средни стойности на еритроцитите ($p = 0.02578$) спрямо пациентите с по-висок брой CD4 клетки (таб.4).



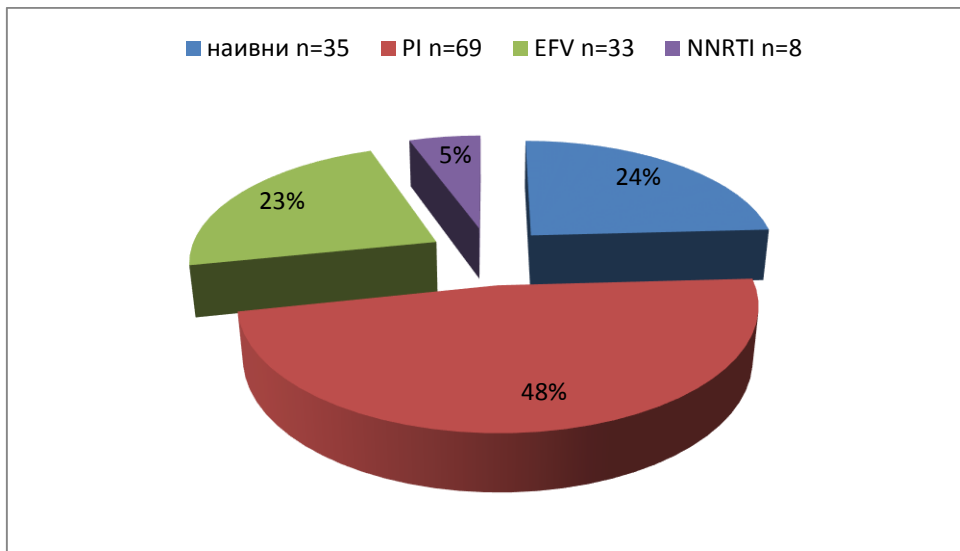
фиг.5. Хемоглобин (mean \pm SE) на изследваните пациенти, разделени според степента на имунен дефицит. * $p<0.05$. ! - достоверни разлики между половете.

Таблица 4. Средни стойности на еритроцити, според степен на имунен 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	мъже p=0.02578 (трети спрямо втори стадий) жени p = 0.01826 (втори спрямо първи стадий) p = 0.00979 (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	

Сигнификантни разлики в средните стойности на хемоглобина и еритроцитите между мъже и жени не се установяват в групите с напреднал имунен дефицит (CD4<200/ μ l). Тези данни биха могли да се обяснят с липса на физиологичната разлика по пол в стойностите на тези показатели при напреднал имунен дефицит.

Доколко провежданата антиретровирусна терапия оказва влияние на стойностите на еритроцитите и хемоглобина анализирахме след разделяне на пациентите 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 6.

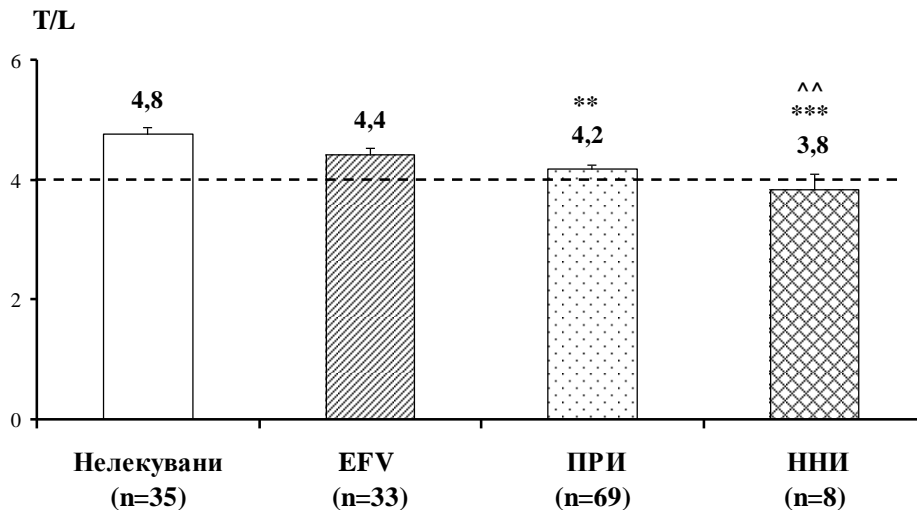


Фиг. 6 Разпределение на изследваните пациенти (общо жени и мъже), според приложеното лечение. Наивни – нелекувани, EFV - efavirenz, PIs - протеазни инхибитори, NNRTIs – нуклеозидни инхибитори.

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).

Анализите на влиянието на провежданата терапия върху показателите на кръвната картина показва, че няма статистически значими разлики в средните стойности на *хемоглобина* и *левкоцитите* при разделянето на пациентите според прием и вид на АРТ.

Сигнификантни разлики между групите установихме по отношение на средните стойности на *еритроцитите*. Еритроцитите на нелекуваните пациенти са статистически значимо по-високи от тези на лекуваните пациенти, както с нуклеозидни инхибитори ($p=0.0007$), така и с протеазни инхибитори ($p=0.004238$) (фиг.7).



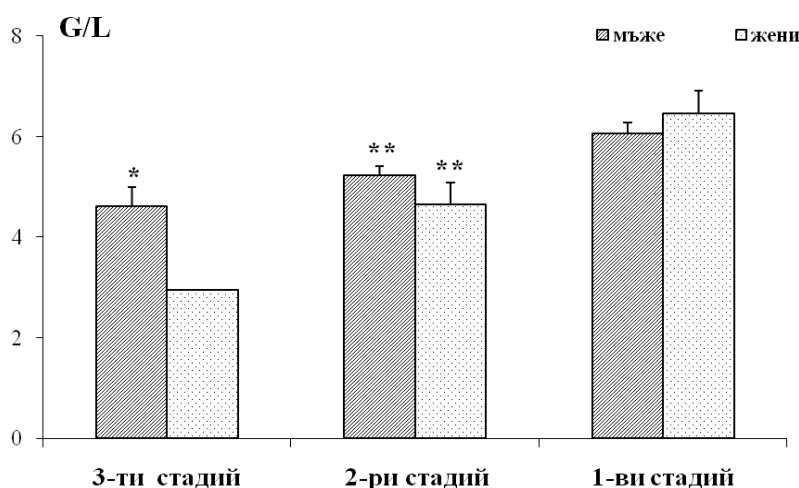
Фиг.7 Еритроцити (mean±SE) на изследваните пациенти, според приложеното лечение. EFV-efavirenz, ПРИ - протеазни инхибитори, ННИ – ненуклеозидни инхибитори. Между наивни пациенти и останалите три групи лекувани пациенти ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$, между лекувани с EFV и ННИ ^^ - $p < 0.01$.

Анализирайки данните, че стойностите на еритроцитите на нелекуваните пациенти са сигнификантно по-високи от тези на лекуваните, можем да твърдим, че факторът АРТ при проследените пациенти води до понижаване на стойностите на еритроцитите. Общото в терапевтичните режими на лекуваните пациенти е наличието на комбинация от два нуклеозидни инхибитора. Разликата между лекуваните пациенти е по третия компонент на терапията. По литературни данни основно нуклеозидните инхибитори (NRTIs) имат миелосупресивен ефект при пациенти на АРТ, като най-изразен е този ефект при лечение с медикамента AZT. Механизмът, по който се развива тази миелотоксичност е чрез увреждане на митохондриалната функция и натрупване на оксидативен стрес.

Според нашите данни, стойностите на еритроцитите при пациенти лекувани с ненуклеозидния инхибитор Nevirapin са сигнификантно по-ниски, в сравнение с пациентите лекувани с друг представител на групата NNRTIs - Efavirenz ($p=0.003276$). На въпроса дали полученият резултат не

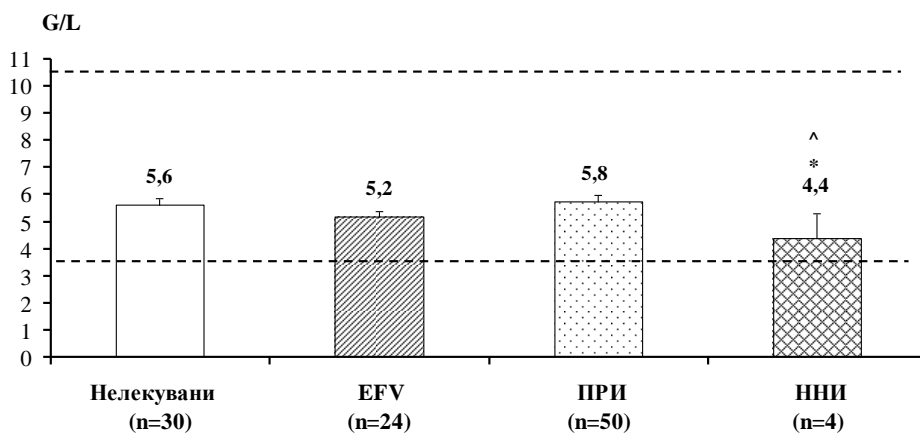
се дължи на приема на AZT, отговорихме като анализирахме каква част от тези пациенти имат в антиретровирусната си комбинация медикамента AZT. В групата на пациентите, лекувани с Efavirenz, 12,1 % имат в комбинацията си AZT, а в групата на пациентите, лекувани с Nevirapine 12,5 %. Няма статистически значима разлика и резултатът не може да бъде обяснен с преобладаване на лечение с AZT в една от двете групи. Не намерихме данни в литературата за сравнение на горните два медикамента по отношение на влиянието им върху стойностите на еритроцитите.

По отношение на стойностите на *левкоцитите* установихме влияние на няколко фактора. Степента на имуен дефицит е един от факторите, който е със статистически значимо влияние. Средните стойности на левкоцитите при мъжете в трети и втори стадий на HIV инфекция (CD4 <200 и 200-400 / μ l) са сигнификантно 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 сигнификантно по-висока ($p=0.004081$) от тази на пациентките във втори и трети стадий на HIV инфекция (фиг.8).



фиг.8 Левкоцити (mean \pm SE) на изследваните пациенти, според тежест на имуен дефицит. * - $p<0.05$ и ** - $p<0.01$.

При анализ на влиянието на АРТ върху стойностите на левкоцитите намерихме достоверни различия в групата на мъжете. Средните стойности на левкоцитите на нелекуваните мъже и лекуваните с PIs са значимо по-високи ($p=0.042414$, $p=0.0301124$) от тези на мъжете, лекувани с NNRTIs (фиг.9). Тези данни биха могли да се обяснят по следния начин. Нелекуваните пациенти са все още със съхранена костномозъчна функция, съответно по-висок общ брой левкоцити и CD4 клетки, затова при тях все още не е започната терапия. По отношение съпоставката PIs и NNRTIs, нашите данни корелират с данните на други автори за по-добро възстановяване на общия брой левкоцити и респективно брой на CD4 клетките при лечение с PIs сравнено с лечение с NNRTIs.



Фиг.9 Левкоцити (mean±SE) на изследваните мъже, разделени според АРТ. EFV-efavirenz, ПРИ-протеазни инхибитори, ННИ–нуклеозидни инхибитори (NVP). Достоверните разлики между групата ННИ и групите нелекувани и ПРИ са означени с * и ^ - $p < 0.05$.

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

Анализите ни показаха, че фактор, който влияе статистически значимо на стойностите на тромбоцитите е степента на имуен дефицит. Установихме, че средните стойности на тромбоцитите при пациенти с брой на CD4 клетки под 499/ μ l (т.е. втори и трети стадий на HIV инфекция) са значимо по-ниски ($p=0.009855$, $p=0.008510$) от съответните за пациентите с нормален брой CD4 клетки (таб.5).

Таблица 5. Средни стойности на тромбоцити, според степен на имуен 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)

Анализите за влиянието на АРТ показаха, 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 статистически значима разлика между лекувани и нелекувани пациенти. Лекуваните пациенти са с по-нисък вирусен товар от нелекуваните. Според данните от други проучвания броят на тромбоцитите има обратнопропорционална връзка с вирусния товар на HIV. Нашите данни корелират с данните от тези проучвания - по-високи стойности на тромбоцити при лекувани в сравнение с нелекувани пациенти. Друг резултат от нашите анализи е, че средните стойности на тромбоцитите на пациенти, лекувани с PIs са сигнификантно по-високи от тези на лекуваните с Efavirenz (таб.6). Този резултат може да се обясни с по-добър вирусологичен отговор при лечение с PIs. Стойностите на тромбоцитите се влияят обратнопропорционално от вирусния товар. 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.

Таблица 6. Средна стойност на тромбоцитите, стандартни отклонения и брой и % пациенти с отклонения в стойностите на тромбоцитите

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	

Отклонения 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*.

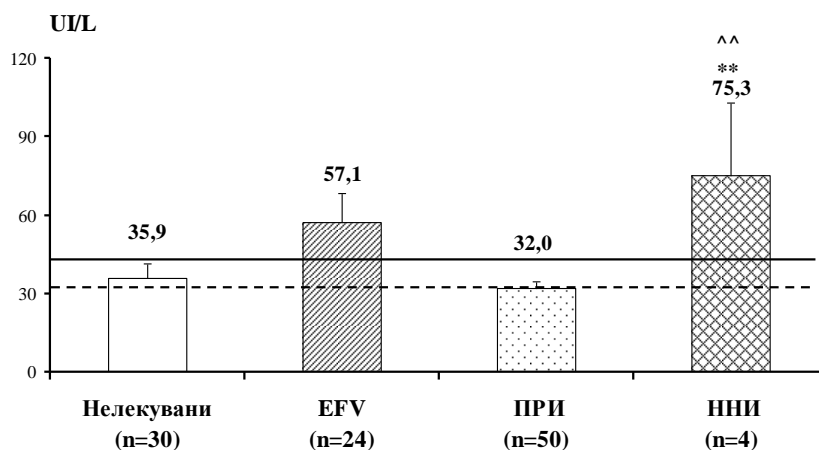
Установихме сигнификантно влияние на някои *ARV* върху стойностите на *ALT*. Сигнификантно по-висока е средната стойност на *ALT* при пациенти, лекувани с ненуклеозидния инхибитор Nevirapin ($p=0.049865$) сравнено с лекуваните с протеазни инхибитори. В групата на лекуваните с *NVP* при 37,5 % установяваме повишени стойности на *ALT*, докато 14,4 % от лекуваните с *PIs* са с повишени стойности на *ALT* (таб.7).

Таблица 7. Средни стойности и стандартни отклонения на ALT, според прием и вид АРТ

АРТ	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	

По литературни данни един от рисковите фактори за хепатотоксичност на медикамента *NVP* е женският пол. 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($p=0.005635$)(фиг.10). Данните ни съвпадат с тези на редица проучвания, показващи че лечението с NVP води до повишена активност на ALT. Има и автори, които обаче не установяват такъв ефект.



Фиг.10 ALT (mean±SE) на изследваните мъже, според приложеното лечение. EFV-efavirenz, ПРИ - протеазни инхибитори, ННИ – нуклеозидни инхибитори (NVP). Достоверната разлика между групата ННИ и групите нелекувани и ПРИ са означени с ** и ^^ - $p < 0.01$. Долната граница за стойностите на ALT са отбелязани с пунктирна линия за жените, а за мъжете - с непрекъснатата.

Според някои изследователи при коинфекция с хепатит С има по-висок риск от клинично изявена токсичност при лечение с NVP. 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 *креатинина*, при мъжете средната стойност беше 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, АРТ няма нефротоксичен ефект.

Общо 12,4 % от проследените пациенти са с повишени стойности на общия *холестерол*. От изследваните жени 30 % са с повишени стойности на холестерола, докато при мъжете повишени стойности имат 15,5 % от изследваните. Анализите ни показват, че средната стойност на общия холестерол на пациентите, лекувани с EFV е сигнификантно по-висока от тази на нелекуваните ($p = 0.04986$)(таб.8). Може да се тълкува, че лечението с посочения по-горе нуклеозиден инхибитор води до повишение на общия холестерол.

Таблица 8. Средни стойности и стандартни отклонения на общия холестерол, според 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	

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. 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.

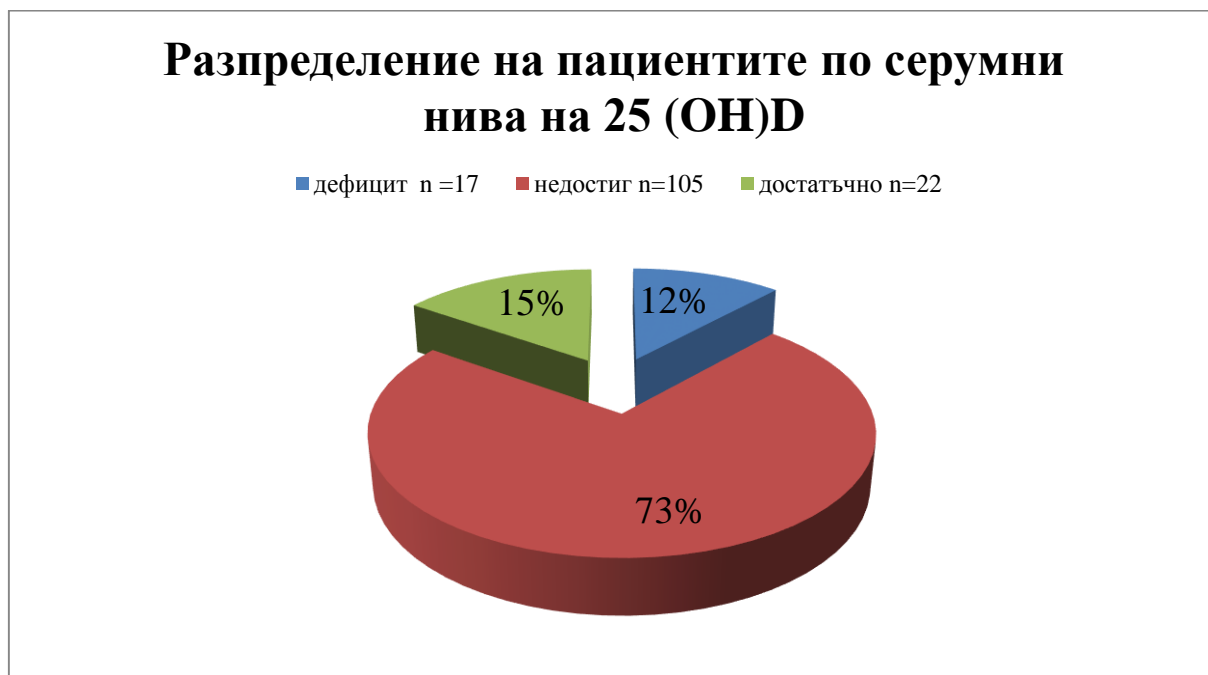
По отношение на *кръвната захар* не установяваме статистически достоверно влияние на провежданата АРТ. Анализите ни показват, че 37,5 % от пациентите лекувани с NVP и 36,9 % от пациентите лекувани с EFV са с повишена кръвна захар, докато в групата на лекуваните с PIs с повишена кръвна глюкоза са 24,6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

II. Определяне на серумните нива на 25(OH)D при HIV-инфектирани пациенти и оценка на факторите, оказващи влияние.

Друга задача, която си поставихме е да анализираме честотата на *витамин Д* (25(OH)D) дефицит при проследените пациенти. Редица международни проучвания установяват по-висока честота на този дефицит сред HIV-инфектирани пациенти. В нашата литература са публикувани обзорни статии, 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 % от тях 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 (фиг.11).

Сравнихме данните си и с тези, получени за общата популация в България. Проучването на общата популация е проведено през 2012 г.

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.



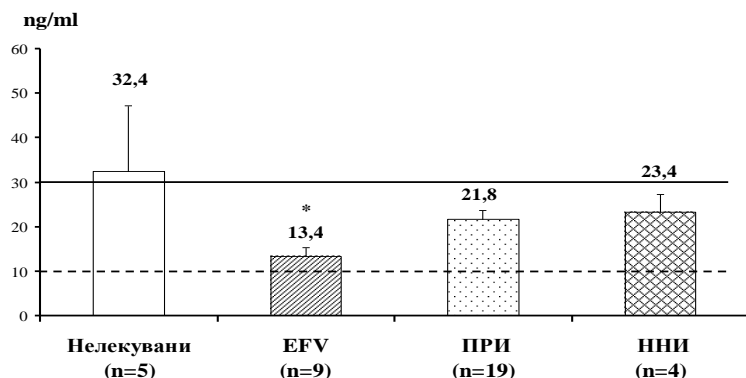
Фиг.11 Разпределение на пациентите според серумното им ниво на 25(OH)D

При проследените от нас пациенти не се установиха значими сезонни разлики в серумните нива на 25(OH)D. При първоначалното изследване на всички проследени пациенти са вземани кръвни проби през зимните месеци, т.е. сезон с по-малко слънчеви дни.

Извършихме повторно изследване на 25(OH)D на 60 пациента от проследените първоначално. За второто изследване кръвните проби на пациентите са вземани в сезон с повече слънчеви дни (м.август – ноември). И при второто изследване 81,6 % от пациентите са 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 пациенти установяват, че женският пол е основен рисков фактор за дефицит на 25(OH)D. 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. Други автори съобщават за аналогичен ефект при лечение с режими, базирани на PIs. 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 ($p=0.026746$) (фиг.12). Не установихме други статистически достоверни различия между групите, разделени според АРТ.



Фиг.12 25(OH)D (mean±SE) на изследваните жени, според АРТ. EFV-efavirenz, ПРИ - протеазни инхибитори, ННИ - нуклеозидни инхибитори (NVP). 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.

III. Анализ на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху биохимични показатели – холестерол, кръвна глюкоза, ALT, креатинин

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. 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. 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 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 (таб.9). 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 ($r=0.8$, $p<0.05$)(таб.10). 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. Възможното обяснение на този ефект на 25(OH)D върху кръвната захар, дадено от авторите на споменатото проучване, е инхибиране на експресията на специфичен рецептор от 25(OH)D. Активацията на този рецептор води до повишена инсулинова резистентност.

Умерени корелации намерихме и 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.

Таблица 9. Корелации между серумно ниво на 25(OH)D и биохимични показатели на цялата група пациенти

Серумно ниво на 25(OH)D	glu	chol	ALT	creat	p
Дефицит <10 ng/ml (n=13)	-0.47	0.309	-0.58	-0.242	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)	0.36	-0.025	0.09	0.35	

Таблица 10. Корелации между серумно ниво на 25(OH)D и биохимични 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)	0.8	-0.16	-0.259	0.775	

На таблица 9 е представена и установената 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 от нашите данни е, че ниските серумни нива на 25(OH)D са свързани с повишени стойности на ALT. Едно от възможните обяснения за този

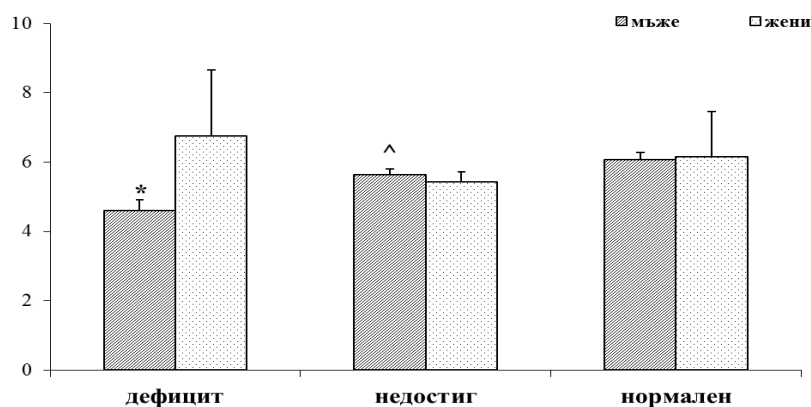
резултат е, че повечето от пациентите с дефицит на 25(OH)D са лекувани с нуклеозидния инхибитор Nevirapin. Данните ни показаха, че лечението с този медикамент води до сигнификантно по-високи стойности на ALT. В литературата намерихме проучвания при неинфектирани с HIV пациенти за участието на 25(OH)D в патогенезата на неалкохолната чернодробна стеатоза. 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.

На таблица 10 е представена и установената от нас 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 пациентите 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. И тук както при корелацията с кръвната глюкоза се обсъжда дозозависим ефект на 25(OH)D върху креатинин, обусловен от рецепторен механизъм.

IV. 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

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. 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 ($p=0.039238$) (фиг.13).



Фиг.13 Левкоцити (mean±SE) на изследваните пациенти, според серумните нива на 25(OH)D. * - $p<0.05$.

Противоречиви са данните в литературата по отношение на връзката между серумното ниво на 25(OH)D и броят на CD4 клетките. В нашето проучване, статистически значима взаимовръзка между броят CD4 клетки/ μ 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 / μ L е сигнификантно по-висок от този на пациентки с недостиг ($p=0.007691$) и с дефицит на 25(OH)D ($p=0.04769$) (таб.11).

Таблица 11. Средни стойности на CD4 клетките и стандартни отклонения, според серумното ниво на 25(OH)D

25 (OH)D	CD4/μl 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	

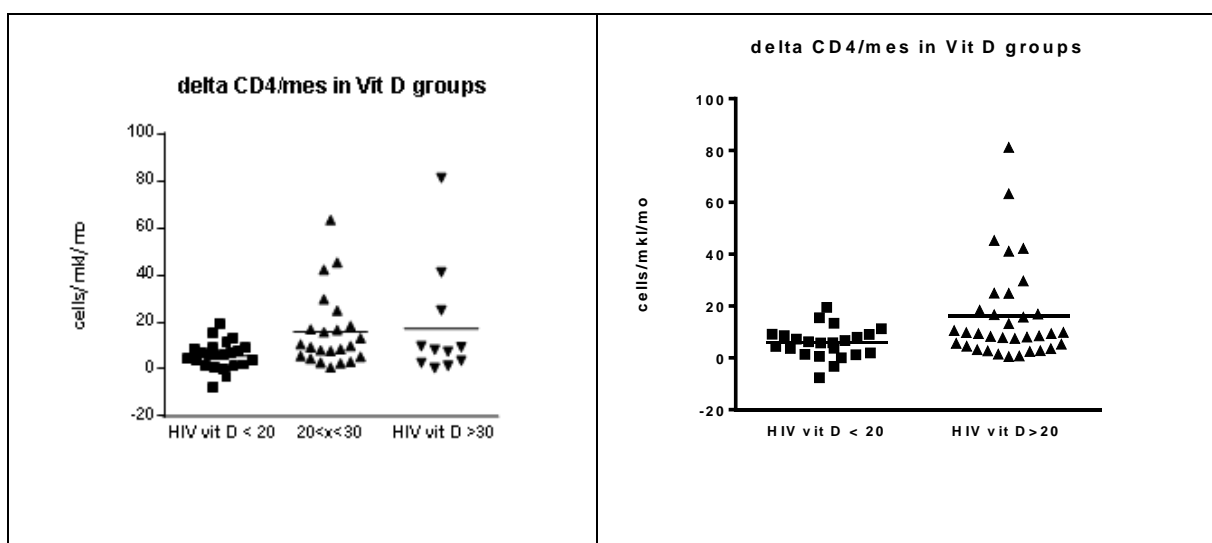
Корелационният анализ показва умерена положителна корелация между броя на CD4 и серумните нива на 25(OH)D за пациентите на възраст 30-40 години и за мъжете в същата възрастова група ($r=0.37$, $p<0.05$). Значителна положителна корелация установихме при жени, лекувани с PIs ($r=0.5$, $p<0.05$).

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.

След разделяне на пациентите според серумното ниво на 25(OH)D (дефицит, недостатъчност и нормални серумни нива), анализирахме и връзката със степен на имуен 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 имуно възпаление, от което следва, че понижените серумни нива на 25(OH)D корелират с персистиращото имуно възпаление. 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 (фиг.14). Тези данни съвпадат с данните и на други проучвания на HIV-инфектирани пациенти.



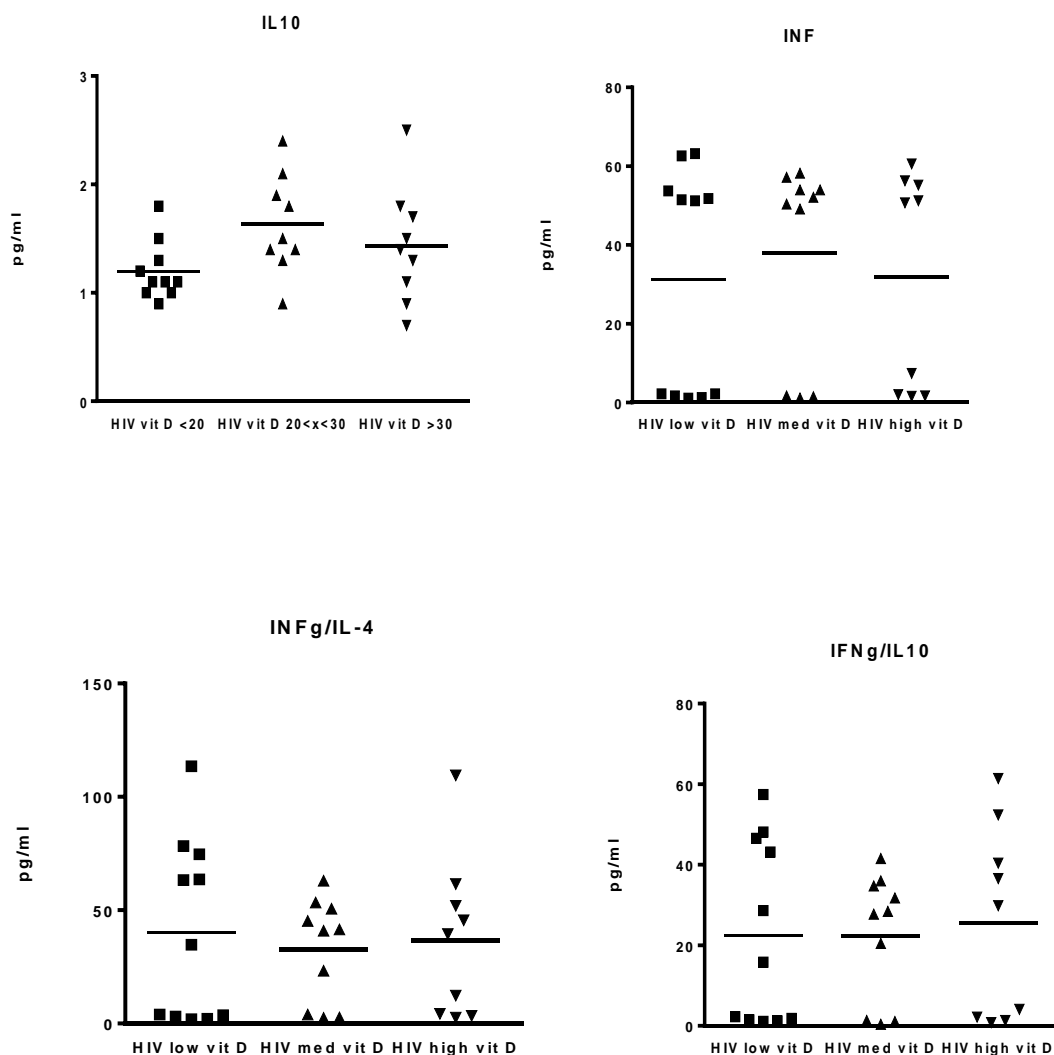
Фиг.14. Възстановяване на броя на CD4 клетките в зависимост от серумните нива на 25(OH)D.

V.Изследване на цитокинов профил. Оценка на влиянието на серумното ниво на 25(OH)D върху цитокиновия профил при HIV-инфектирани

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. Важна е ролята на IL-10 като регулаторен цитокин, която според нашите анализи е нарушена при състояние 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. Същите проучвания съобщават, че при част от HIV – инфектираните пациенти плазмените нива на IFN- γ 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- γ , значително по-високи от референтните. Тези пациенти имат по-висок брой

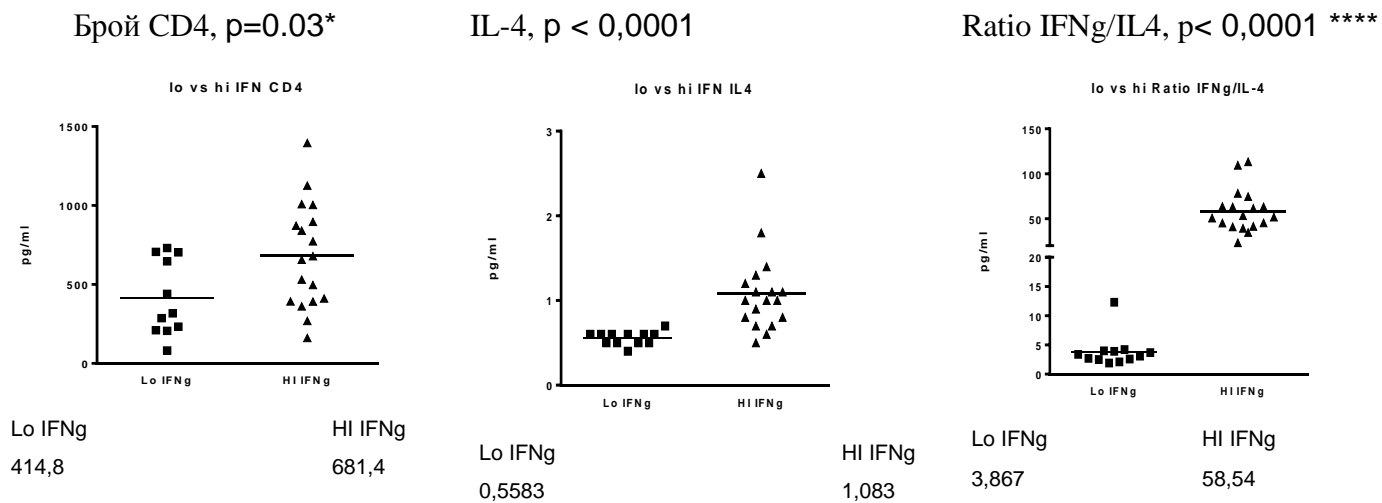
CD4 клетки и по-ниска средна стойност на IL-4. Съответно при пациентите с висок IFN- γ е налице по-високо съотношение IFN- γ /IL-4, което отразява силата на Th1 имунния отговор (фиг.15). По-мощният Th1 имуен отговор води до по-добър антивирусен отговор и по-добра прогноза на HIV-инфекцията.



Фиг.15. Цитокинов профил ex vivo (без стимулация с фитохемаглутинин)

Данните ни показват големи различия при изследваните пациенти по отношение на стойностите на IFN- γ . Освен групата пациенти със стойности над референтните, при други пациенти установяваме много ниски

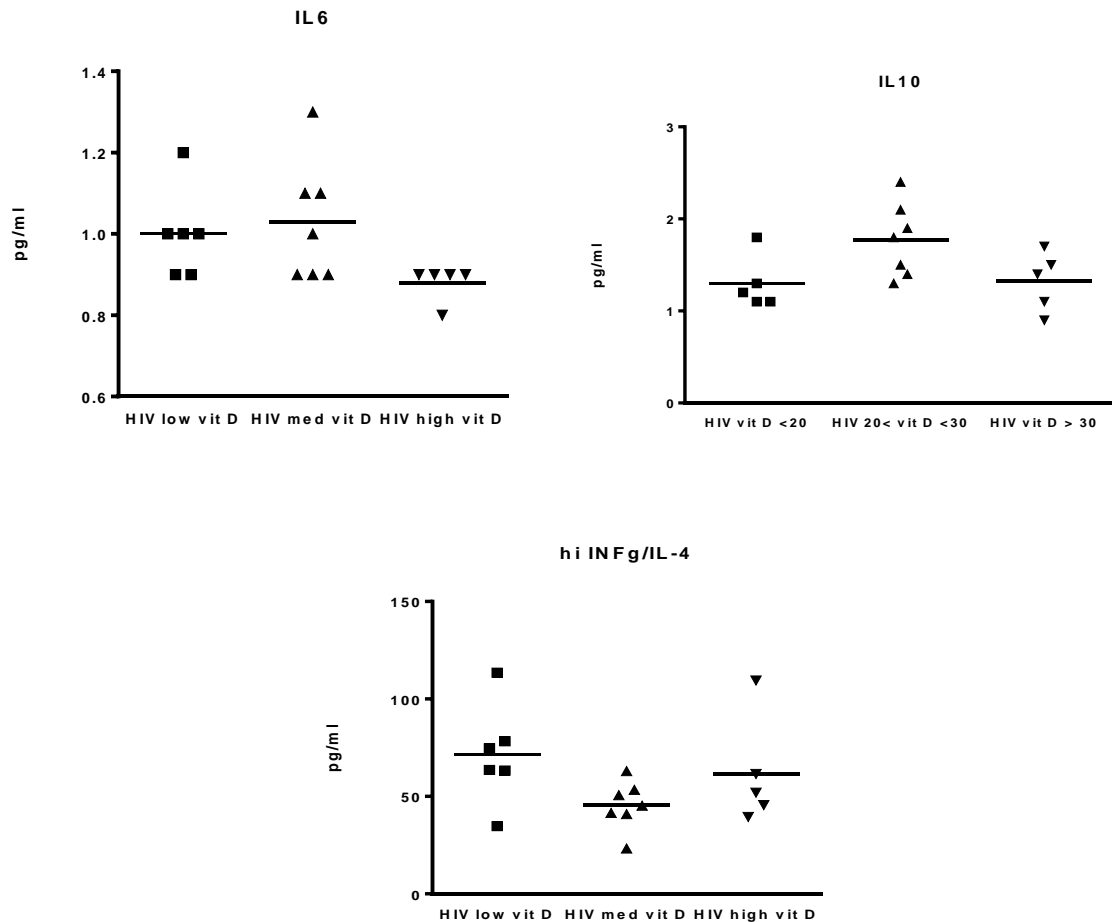
стойности на IFN- γ . Анализите показват, че тези две крайни групи пациенти се различават значимо по брой CD4 клетки, плазмени нива на IL-4 и съотношение IFN- γ /IL-4, но не и по IL-6, IL-10, TNF- α , 25(OH)D, VL и индекс CD4/CD8 (фиг.16). Пациентите с високи плазмени концентрации на IFN- γ имат повече 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.



Фиг.16 Сигнификантни разлики по отношение брой CD4, IL-4 и IFN- γ /IL-4 между двете подгрупи с нисък и висок IFN- γ .

При пациентите с много ниски стойности на IFN- γ 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- γ /IL-4 е сигнификантно по-нисък при пациенти с недостатъчност на 25(OH)D (фиг.17). 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 < 30 ng/ml.

Данните ни не съвпадат с данните на други проучвания, показващи че серумните нива на 25(OH)D имат обратнопропорционална корелация с нивата на IFN- γ , но не и с нивата на TNF- α или IL-10.

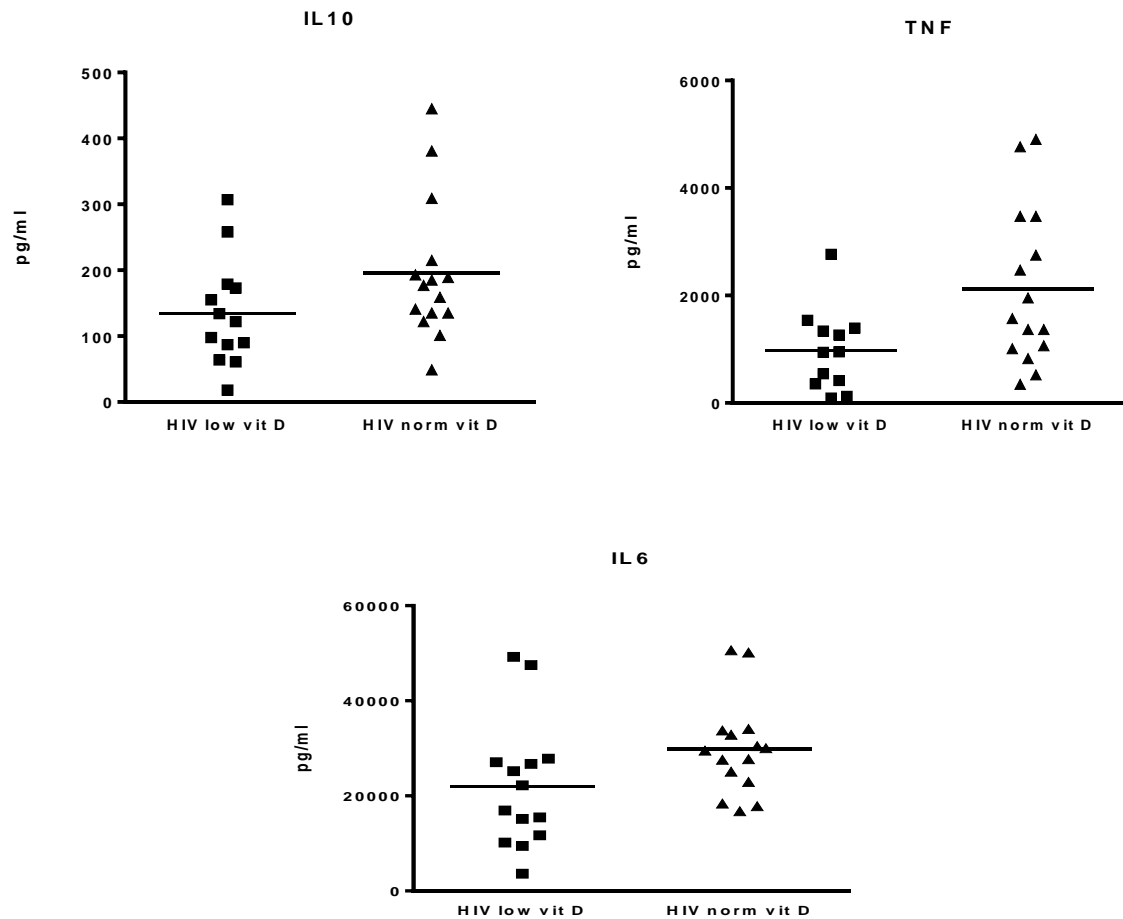


Фиг.17 Зависимост между серумните нива на 25(OH)D и плазмените нива на IL-6, IL-10 и съотношението IFN- γ /IL-4 в подгрупата с нисък IFN- γ .

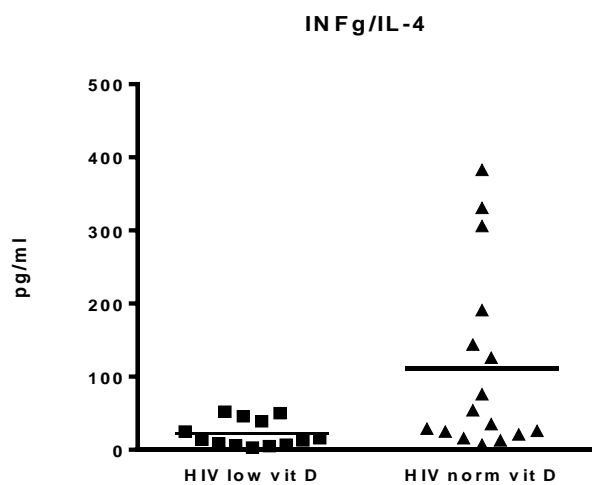
На базата на анализите ни на цитокиния профил *ex vivo*, можем да обобщим, че при състояния на дефицит и недостиг на 25(OH)D е налице по-изразено имунно възпаление (висок IL-6), слаб регулаторен отговор (нисък IL-10) и потискане на Th1 имунен отговор (IFN- γ /IL-4). Този цитокинен профил е неблагоприятен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

При изследване на цитокинен профил след стимулация на кръвните проби с фитохемаглутинин установяваме следните резултати. При пациенти с дефицит на 25(OH)D са налице значително по-ниски нива на IL-10, TNF- α

и IL-6 (фиг.18). Съотношението IFN- γ /IL-4, отразяващо силата на Th1 имунния отговор е сигнификантно по-високо при пациенти със стойности на 25(OH)D > 20 ng/ml спрямо пациенти с дефицит (фиг.19).



Фиг.18. Цитокинов профил след стимулация с фитохемаглутинин



Фиг.19 Различия в индекса IFN- γ /IL-4, отразяващ силата на Th1 имунния отговор в групите с дефицит и без дефицит на 25(OH)D.

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- α , но инхибира вирусната експресия при високи концентрации на IFN- γ и IL-6. Аналогични са и данните от нашето проучване по отношение на IFN- γ 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. 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.

Някои проучвания съобщават за положителна корелация между високите концентрации на TNF- α и дефицит на 25(OH)D, което води до бързо прогресираща HIV инфекция. Нашите данни обаче са противоположни - установяваме по-ниски стойности на TNF- α 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- α , 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.

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 имуен отговор. Ниските серумни нива на 25(OH)D са свързани с повишени стойности на IL-6, понижени стойности на IL-10, IFN- γ и TNF- α . 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 АРТ 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- γ /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- γ , TNF- α 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 имунен 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.Tchervenyakova. 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 D 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 D. 13 – ти конгрес на БАМ, София, 16-18 ти април 2015 г.