



**UNIVERZITET U KRAGUJEVCU**  
**FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA**

**Refet Gojak**

**ZNAČAJ CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> KOLIČNIKA I C-REAKTIVNOG PROTEINA U  
PRAĆENJU KARDIOVASKULARNOG RIZIKA KOD HIV  
POZITIVNIH PACIJENATA TOKOM cART TERAPIJE**

**Doktorska disertacija**

**Mentor: dr sci.med. Željko Mijailović, vanredni profesor**

**Sarajevo - Kragujevac, juni 2019. godine**



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Рефет Гојак**

**ЗНАЧАЈ  $CD_4/CD_8$  КОЛИЧНИКА И С-РЕАКТИВНОГ ПРОТЕИНА У  
ПРАЋЕЊУ КАРДИОВАСКУЛАРНОГ РИЗИКА КОД HIV  
ПОЗИТИВНИХ ПАЦИЈЕНАТА ТОКОМ cART ТЕРАПИЈЕ**

**Докторска дисертација**

**Ментор: др сци. мед. Жељко Мијаиловић, ванредни професор**

**Сарајево - Крагујевац, јуни 2019. године**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>
<b>Име и презиме:</b> Рефет Гојак
<b>Датум и место рођења:</b> 12.05.1975. Гојаковићи, Пријепоље, Р Србија
<b>Садашње запослење:</b> Клинички центар Универзитета у Сарајеву (КЦУ Сарајево), Клиника за инфективне болести
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
<b>Наслов:</b>
Значај CD <sub>4</sub> /CD <sub>8</sub> количника и С-реактивног протеина у праћењу кардиоваскуларног ризика код HIV позитивних пацијената током сART терапије
<b>Број страница:</b> 143
<b>Број слика:</b> 28 графикана, 25 табела, 3 слике;
<b>Број библиографских података:</b> 157
<b>Установа и место где је рад израђен:</b> Клинички центар Универзитета у Сарајеву
<b>Научна област (УДК):</b> Медицина
<b>Ментор:</b> Проф. др Жељко Мијаиловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу; научна област Инфективне болести
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
<b>Датум пријаве теме:</b> 14.02.2017.
<b>Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације:</b> IV-03-713/6 од 13.07.2017.г.
<b>Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф. др Предраг Чановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, председник</li> <li>2. Проф. др Олгица Гајовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан</li> <li>3. Проф. др Маја Јовановић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Инфективне болести, члан</li> </ol>
<b>Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Проф. др Предраг Чановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, председник</li> <li>2. Проф. др Олгица Гајовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Инфективне болести, члан</li> <li>3. Доц. др Маја Ружић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Инфектологија, члан</li> </ol>
<b>Датум одбране дисертације:</b>

## SAŽETAK

**Uvod:** HIV-infekcija se karakteriše progresivnim manjkom CD4<sup>+</sup> T-ćelija zbog njihove smanjene sinteze, povećanog uništavanja i izrazite aktivacije i ekspanzije CD8<sup>+</sup> T limfocita. CD4/CD8 odnos (količnik, *engl.* ratio) se sve više pojavljuje kao marker različitih ishoda kod HIV-inficiranih pojedinaca. S druge strane CRP je tradicionalno opisivao kao dobar marker akutne upale i danas je jedan od standardnih testova koji se koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi, za postavljanje dijagnoze i praćenje prognoze upale. Međutim, uloga CRP-a u različitim fiziološkim procesima, naročito kod perzistentne infekcije i imunske aktivacije nije do kraja jasna. Efikasnom i savremenom terapijom HIV-a život ovakvih pacijenata je značajno produžen. Primarni cilj antiretrovirusne terapije (ART) je spriječiti HIV-povezane bolesti i smrtnost, a sekundarni cilj je da se smanji rizik od prijenosa HIV-a. Ovaj cilj se najbolje postiže pomoću efikasne cART, kojom se maksimalno inhibira HIV replikacija, tako da plazmatska HIV RNK (viremija) ostaje ispod nivoa kojeg je moguće detektovati pomoću komercijalno dostupnih testova.

**Cilj:** Osnovni cilj ovog istraživanja je da se ispita kolika je moć CD4/CD8 odnosa i CRP-a da predvidi razvoj rizika kardiovaskularne bolesti (KVB) kod HIV pozitivnih pacijenata koji primaju cART terapiju.

**Materijal i metode:** U retrospektivno-prospektivnoj kohortnoj studiji ponovljenih mjerenja bilo je uključeno 76 HIV pozitivnih ispitanika. Za određivanje udjela (procenta) CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija, iz periferne krvi pacijenata, korištena je metoda protočne citometrije. U ovoj studiji evaluirane su vrijednosti biohemijskih parametara (CRP-a, lipidnog statusa), parametara krvne slike (eritrociti, hemoglobin, hematokrit, trombociti), leukociti i leukocitarna formula te sedimentacija kao nespecifični parametri akutne upale, potom imunološki parametar CD4/CD8 odnos, antropometrijska mjerenja- ITM, te vrsta cART terapije. Za statističku analizu korišten je softver SPSS, odnosno parametrijski i neparametrijski testovi, Spirmanova (rho) korelacija, standardna regresiona analiza i ROC kriva.

**Rezultati:** U istraživanje je uključeno 76 ispitanika, 67 (88,2 %) muškaraca i 9 (11,8 %) žena. Ispitanici su prosječne starosti 35,2±8,7 godina, najmlađi ispitanik imao je 18, a najstariji 57 godina. Standardnom regresionom analizom, ispitanici su uticali na nezavisnih prediktora (starosti, pola, navike pušenja, familijarne anameze za KVB, ITM, cART,

sistolnog i dijastolnog pritiska, holesterola, triglicerida, HDL-a, ŠUK-a, CRP-a, CD4 i CD4/CD8) na zavisno promjenljivu rizik za KVB bazično i nakon 3, 6, 12, 18 i 24 mjeseca cART. Od 12. do 24. mjeseca osim standardnih rizikofaktora za predikciju razvoja KVB, CD4/CD8 odnos i CRP se javljaju kao značajni prediktori. Nakon 24 mjeseca cART, CRP se pokazao kao najbolji prediktor rizika za KVB (beta=0,224; p=0,026), veće vrijednosti ovog parametara utiču na veći rizik za KVB, potom CD4/CD8 odnos (beta=-0,200; p=0,025), s tim da veći odnos smanjuje vjerovatnoću za rizik KVB. Terapija (cART) u ovom regresionom modelu prvi put je nakon 24 mjeseca pokazala statistički značajan uticaj na rizik za KVB (beta=0,197; p=0,013). Ispitanici koji su u kombinovanoj terapiji imali PI, imaju veći rizik za KVB. Od 18. mjeseca cART CRP može biti marker srednjeg rizika za KVB, a nakon 24 mjeseca vrijednosti CRP-a od 5,31 mg/L ima najveću senzitivnost 78,3% i najveću specifičnost 86,8%, kao marker srednjeg u odnosu na niski rizik za KVB (p=0,0001; AUC=0,882). Od 12 mjeseca cART CD4/CD8 odnos može biti marker niskog rizika za KVB. Nakon 24 mjeseca terapije prosječna vrijednost CD4/CD8 odnosa od 0,53 ima najveću senzitivnost 66,0% i najveću specifičnost 73,9%, kako marker niskog u odnosu na srednji rizik za KVB (p=0,001; AUC =0,762).

**Zaključci:** Količnik CD4/CD8 i CRP su se pokazali se kao značajni prediktori za rizik KVB, i kao markeri koji mogu razlikovati nizak/srednji rizik za KVB kod HIV pacijenata nakon 12 mjeseci cART.

**Ključne riječi:** CD4/CD8 odnos, C-reaktivni protein, HIV, AIDS, kardiovaskularna bolest, cART

## **ABSTRACT**

**Introduction:** HIV infection is characterized by a progressive deficiency of CD4+ T cells due to their reduced synthesis, increased destruction and marked activation and expansion of CD8+ T lymphocytes. The CD4/CD8 ratio is increasingly emerging as a marker of different outcomes in HIV-infected individuals. On the other hand, CRP has traditionally been described as a good marker of acute inflammation and is today one of the standard tests used in everyday clinical practice to diagnose and monitor inflammation prognosis. However, the role of CRP in various physiological processes, especially in persistent infections and immune activation, is not entirely clear. The primary goal of antiretroviral therapy (ART) is to prevent HIV-related diseases and mortality, and the secondary goal is to reduce the risk of HIV transmission. This goal is best achieved by using efficient combination ART (cART), which maximally inhibits HIV replication, so that plasma HIV RNA (viral load) remains below the level that can be detected by commercially available tests.

**Aim:** The main objective of this study is to examine the power of the CD4/CD8 ratio and CRP in predicting the risk of development of cardiovascular disease (CVD) in HIV positive patients receiving cART therapy.

**Methods:** In the retrospective-prospective cohort study of repeated measurements, 76 HIV positive subjects were included. The method of flow cytometry was used to determine the percentage of CD4+ and CD8+ cells in the peripheral blood of patients. In this study the values of biochemical parameters (CRP, lipid status), blood parameters (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, platelets), leukocytes, leukocyte formula, and sedimentation as non-specific parameters of acute inflammation were evaluated, followed by immunocompetent CD4/CD8 ratio, anthropometric measurements - ITM, and cART therapy type. For statistical analysis SPSS software was used, i.e. parametric and nonparametric tests, Spearman's (rho) correlation, standard regression analysis and ROC curve.

**Results:** The study included 76 subjects, 67 (88.2%) males and 9 (11.8%) women. The average age of subjects was  $35.2 \pm 8.7$  years; the youngest subject was 18 and the oldest 57 years old. By standard regression analysis, the influence of independent predictors (age, gender, smoking habits, familial anamnesis for CVD, ITM, cART, systolic and diastolic

pressure, cholesterol, triglycerides, HDL, blood sugar, CRP, CD4 and CD4/CD8 ratio) on the dependent variable risk of CVD, baseline and after 3, 6, 12, 18 and 24 months of cART was examined. From 12 to 24 months apart from the standard risk factors for predicting the development of CVD, CD4/CD8 ratio and CRP appear as significant predictors. After 24 months of cART, CRP proved to be the best risk predictor of CVD (beta = 0.224; p = 0.026), higher values of this parameter affect higher risk for CVD, then CD4/CD8 ratio (beta -0.200, p = 0.025), with a higher ratio decreasing the likelihood of CVD risk. Therapy (cART) in this regression model showed the first time after 24 months a statistically significant impact on CVD risk (beta = 0.197; p = 0.013). Subjects who had PI in combination therapy had a higher risk for CVD. From 18 months of cART CRP may be a medium risk marker for CVD, and after 24 months the CRP value of 5.31 mg/L has the highest sensitivity of 78.3% and the highest specificity of 86.8%, as a marker of medium compared to low risk for CVD (p = 0.0001; AUC = 0.882). After 12 months of cART CD4/CD8 ratio can be a low risk marker for CVD. After 24 months of therapy, the average CD4/CD8 ratio of 0.53 had the highest sensitivity 66.0% and the highest specificity was 73.9%, as the marker of low compared to medium risk for CVD (p = 0.001, AUC = 0.762).

**Conclusion:** CD4/CD8 ratio and CRP counts have been shown to be significant CVD risk predictors, and as markers that may differentiate low and intermediate risk for CVD in HIV patients after 12 months of cART.

**Key words:** CD4/CD8 ratio, C- reactive protein, HIV, AIDS, cardiovascular disease, cART

## **ZAHVALNICA**

*Ovaj rad ne bi bio moguć bez velikog odrcanja i podrške moje uže porodice, supruge Hanele, ćerki Hene i Sane, kao i sina Zarifa, stoga sam im neizmjereno zahvalan.*

*U naučnom smislu, zahvalnost za edukaciju dugujem svim predavačima-profesorima na doktoralnim studijama Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu, posebno prof.dr. Dragić Bankoviću i prof.dr Slobodanu Jankoviću.*

*Veliki trud i napor kroz ovaj projekat zajedno sa mnom prosao je moj mentor, sada prijatelj, prof.dr Željko Mijailović, hvala Željko na svemu!*

*HIV/AIDS je posebna nauka u Infektologiji, ovaj rad ne bi bio moguć bez velike kliničke podrške prim. dr Vesne Hadžiosmanović, šefa odjela za HIV/AIDS, Klinike za infektivne bolesti, hvala još jednom.*

*Sigurno ne bih bio infektolog, da nisam 2006. godine upoznao tadašnjeg šefa klinike, prof.dr Sajmu Krkić-Dautović, koja je bila i profesor i majka u isto vrijeme, hvala profesorice na svemu.*

*Za izradu samog rada dugujem zahvalnost sadašnjem menadžmentu KCU Sarajevo, posebno prof.dr Enri Suljić, direktorici discipline za nauku i razvoj.*

*U stručnom obrazovanju zahvalan sam svim kolegama Klinike za infektivne bolesti.*

*Posebnu zahvalnost dugujem prijateljima, koji su bili uz mene, naročito u teškim trenucima kada je bilo upitno da li uopšte nastaviti doktorske studije.*

***Na kraju, ovu disertaciju posvećujem svojim rahmetli roditeljima, majci Muli i babu Ilijazu.***

*Sarajevo, juni 2019. godine*

*Refet Gojak*



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	11
1.1. AIDS i starenje.....	13
1.2. Terapija HIV/AIDS-a .....	14
1.2.1. Klinički vodiči za tretman HIV/AIDS bolesnika u BIH.....	17
1.3. Kardiovaskularni rizici i kardiovaskularna oboljenja.....	18
1.3.1. Hipertenzija .....	19
1.3.2. Pušenje.....	19
1.3.3. Gojaznost.....	20
1.3.4. Dislipidemija .....	21
1.4. HIV infekcija i kardiovaskularna oboljenja.....	21
1.5. HIV i endotelna disfunkcija.....	22
1.6. Imunski sistem i limfociti .....	23
1.7. CD4/CD8 odnos.....	24
1.7.1. CD4/CD8 odnos kao marker HIV inficiranih i efekta cART .....	24
1.7.2. CD4/CD8 odnos, starenje i imunska aktivnost.....	25
1.7.3. CD4/CD8 odnos i oksidativni stres .....	27
1.7.4. CD4/CD8 odnos i kardiovaskularni rizik .....	28
1.7.5. CD4/CD8 odnos i metabolički sindrom .....	29
1.8. C-reaktivni protein.....	30
1.8.1. CRP i infekcija .....	33
1.8.2. CRP i kardiovaskularni rizik .....	33
1.8.3. CRP i HIV infekcija .....	34
1.8.4. CRP i metabolički sindrom .....	34
2. FORMULACIJA PROBLEMA .....	36
3. DEFINICIJA PROBLEMA.....	40
4. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	41
5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	42
6. ISPITANICI I METOD RADA.....	43
6.1. Ispitanici.....	43
6.2. Metod rada .....	44
6.3. Statistička obrada podataka.....	51
7. REZULTATI RADA.....	52

7.1.	Opšte karakteristike uzorka. ....	52
7.2.	Analize prediktora na razvoj rizika za KVB, bazično i tokom cART. ....	54
7.3.	CRP i CD4/CD8 kao markeri niskog/srednjeg rizika za KVB. ....	62
7.4.	Analiza trenda CD4/CD8 odnosa, CRP-a i rizika za KVB, bazično i tokom 24 mjeseca cART.....	74
7.5.	Analiza trenda promjena nespecifičnih parametara upale tokom ART .....	81
7.6.	Analiza trenda promjena krvne slike bazično i tokom cART.....	86
7.7.	Analiza trenda promjena lipidograma i ITM, bazično i tokom cART.....	90
8.	DISKUSIJA .....	96
9.	ZAKLJUČCI .....	113
10.	LITERATURA .....	115
	SKRAĆENICE .....	132
	BIOGRAFIJA .....	135
	BIBLIOGRAFIJA .....	136
	PRILOG.....	137
	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA.....	137
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	137
	KEY WORDS DOCUMENTATION.....	140
	Mišljenje etičkog komiteta KCU Sarajevo.....	143
	Potvrda o izvodljivosti studije istraživanja za doktorsku disertaciju .....	144

## 1. UVOD

Virus humane imunodeficijencije-HIV (eng. Human Immunodeficiency Virus) je virus, koji kod neliječenih pacijenata uzrokuje stečeni sindrom imunodeficijencije-AIDS (eng. Acquired Immunodeficiency Syndrome). Bolest je praćena stanjem opadanja imunog sistema pacijenata, dovodeći ih u rizik za nastanak po život opasnih oportunističkih infekcija (1, 2).

Prema literaturnim podacima, godina 1981. se smatra početkom epidemije HIV, iako istraživači smatraju da je ovaj virus postojao i puno godina prije. Virus humane imunodeficijencije prvi put je izolovan 1983. godine, kod pacijenta sa limfadenopatijom, da bi se godinu dana poslije ustanovilo da ovaj virus izaziva AIDS (3).

Virus humane imunodeficijencije i AIDS su trenutno jedni od najvećih zdravstvenih problema današnjice, od kojih je do sada umrlo više od 35,4 miliona ljudi, a prema najnovijim statističkim podacima u svijetu od ovog virusa zaraženo je 36,9 miliona osoba (4). HIV virus je po strukturi RNK virus, i pripada porodici retrovirusa, odnosno porodici Orthorethrovirinae i rodu Lentivirus. Virusi ovog roda odlikuju se dugim trajanjem inkubacije, odnosno periodom od ulaska virusa u ćelije domaćina pa do razvoja simptomatske bolesti. Specifičnost za retrovire je da sadrže ribonukleinsku kiselinu (RNK), a ne deoksiribonukleinsku kiselinu (DNK). Oni se ne mogu replicirati izvan živih ćelija domaćina, ali su u mogućnosti koristiti svoju RNA i DNK domaćina kako bi napravili virusnu DNK kroz model obrnute transkripcije. Ovaj proces se odvija pod djelovanjem enzima virusne RNK-zavisne DNK polimeraze, poznatijeg pod nazivom reverzna transkriptaza (RT). Kada se virus nalazi unutar ćelije domaćina, virusna čestica ogoli svoju sfernu ovojnicu čime oslobađa svoju RNA, a nove ćelije domaćina koristi da se stalno replikuje. Virus je diploidan i sadrži dvije identične jednolančane RNK kopije pozitivnog lanca. RNK genom kodira najmanje 9 proteina, uključujući: *Gag*, *Pol*, *Env*, *Tat*, *Ref*, *Nef*, *Vif*, *Vpu* i *Vpr*. Tri glavna gena su *gag*, *pol* i *env*. *Gag* kodira proteinske jezgre, *pol* gen kodira enzime reverzne transkriptaze, proteaze i integraze, dok *env* gen kodira HIV strukturne komponente poznatije kao glikoproteini. Drugi RNK genomi su važni za replikaciju virusa i povećanje stope infektivnosti HIV-a. Virus HIV-a se sastoji od cilindričnog središta okruženog sferičnim lipidnim dvoslojem. Dva su glavna virusna glikoproteina u ovom lipidnom dvosloju, i to: *gp120* i *gp41*. Glavna funkcija ovih proteina je posredovanje u prepoznavanju CD4+ (engl. Cluster of Differentiation 4) ćelija i hemokinskih receptora, uglavnom CCR5 i CXCR4, čime je omogućeno vezanje virusa i napadanje ćelija

domaćina. Druge ćelije koje posjeduju hemokinske receptore su također pogođene, uključujući: monocite, makrofage i dendritičke ćelije. Virus HIV-a postoji u dvije forme i to: HIV 1 i HIV 2, te postoji uvjerenje da i jedan i drugi mogu biti preneseni krvnim putem sa afričkih ne primata na ljude (5, 6).

Prva faza HIV infekcije je period povezan sa intenzivnom replikacijom virusa. HIV infekcija se karakteriše progresivnim smanjenjem CD4+ T-ćelija zbog njihove smanjene sinteze i povećanog uništavanja i izrazite aktivacije i ekspanzije CD8+ T-ćelijskog odjeljka (7, 8). Jednom uspostavljena HIV provirusna DNK unutar genomom inficirane ćelije domaćina ne može se eliminisati ili uništiti osim uništavanjem same ćelije. HIV provirusna DNK zatim usmjerava svoju replikaciju u inficiranim ćelijama domaćina. Ova replikacija prvi put se pojavljuje unutar upalnih ćelija na mjestu infekcije ili unutar mononuklearnih ćelija (CD4 limfociti i monociti) periferne krvi, a zatim glavno mjesto replikacije brzo se prebacuje u limfoidno tkivo tijela (limfni čvorovi i gastrointestinalni trakt). Nakon početne ekspanzije virusne replikacije koja slijedi odmah nakon infekcije, nastavlja se replikacija na nižem nivou, što objašnjava klinički očiglednu dugu inkubaciju bolesti. Međutim, replikacija virusa je stimulirana različitim citokinima kao što su interleukini i faktor nekroze tumora, koji aktiviraju CD4 limfocite i čine ih osjetljivijima na HIV infekciju. Aktivacija virusne sinteze dovodi do oslobađanja novih infektivnih čestica iz ćelija domaćina. Replikacija također može uzrokovati lizu ćelija oslobađanjem dodatnih infektivnih virusnih čestica. Smrt ćelije domaćina može biti posredovana preko nekoliko različitih mehanizama, kao što su: direktni citopatski učinci virusa, fuzija s multinuklearnim divovskim ćelijama, citotoksični imuni odgovor drugih limfocita (CD8 + citotoksični T-limfociti), autoimuni mehanizmi, ometajuća interakcija proteina omotača HIV-a sa ćelijskom membranom, imunološki klirens uslovljen promjenom antigenosti ćelija domaćina, aktivacija apoptoze (programirana ćelijska smrt), ili toksično nakupljanje virusne DNK, RNK ili proteina (9).

HIV infekcija u početnom stadijumu je asimptomatska, kada klinički znaci nisu prisutni, ali je bolest moguće dokazati laboratorijskim analizama kada postoje elementi slabljenja imunog sistema. Međutim, vremenom imunski sistem još više slabi pa bolest ulazi u simptomatsku fazu koja je praćena pojavom oportunističkih infekcija ili nastankom tumora (10).

## 1.1. AIDS i starenje

Proces starenja kod bolesnika s HIV infekcijom, bilo da su na dugotrajnoj antiretrovirusnoj terapiji (ART) ili ne, još uvijek je slabo shvaćen, pa se trenutno provode brojna istraživanja. Mnoge abnormalnosti imunskog sistema su povezan sa HIV infekcijom, koje su jako slične abnormalnostima imunskog sistema pri starenju. Oni podrazumijevaju nizak broj CD4 ćelija, visoke stope imunske aktivnosti, te smanjenu aktivnost timusne žlijezde. Hronična infekcija sama po sebi ubrzava starenje. Osim toga, još jedan proces starenja, poznatiji kao oksidativni stres, je naglašen, kojeg karakteriše višak slobodnih radikala koji posljedično ugrožava imunski sistem, čime stvaraju povoljne uslove za razmnožavanje samog virusa. Infekcija sa HIV-om i proces starenja su uzročno-posljedično povezani i mogu pogoršavati jedni druge (11).

S obzirom na to da se dugotrajnim korištenjem ART potiskuje viremija i poboljšava broj CD4 ćelija, to bi moglo značiti da patološka stanja povezana sa AIDS-om bi mogu postati rjeđa. Međutim, zbog povećanja očekivanog životnog vijeka komplikacije povezane sa starenjem postaju sve češće. Nekoliko studija je zaključilo da je nivo postignutog broja CD4 na ART značajan prediktor učestalosti takvih komplikacija, koji se jednim imenom nazivaju ne-AIDS stanja ili komorbiditeti. Oni uključuju bolesti jetre, zatim kardiovaskularne bolesti poput visokog krvnog pritiska, moždanog ili srčanog udara, zatim bolesti bubrega, maligne bolesti, osteoporozu, gubitak memorijskih i drugih moždanih funkcija i intelektualno propadanje (12).

Na početku primjene ART, terapijski protokol liječenja ovih bolesnika išao je po principu visokih doza lijekova koje su uzrokovale veći broj njihovih neželjenih pojava, što je dovelo do slabijeg pridržavanja terapije od strane pacijenata, kao i smanjenja dugoročnog preživljavanja. Tokom godina, broj lijekova koje su uzimali dnevno i doze samog lijeka su se reducirale. Mnogi moderni terapijski protokoli su se sveli na samo jednu ili dvije tablete dnevno, čime su znatno smanjili neželjenih dejstava. Paradoksalno, pacijenti sa HIV infekcijom postajali su stariji, jer su duže živjeli. Prema podacima Ujedinjenih nacija (UN), procjenjuje se da je u području subsaharske Afrike u 2015. godini više od 2 miliona ljudi sa HIV infekcijom živjelo sa u prosjeku preko 50 godina. U Južnoj Africi je 10,8% pacijenata bilo starosne dobi od 50 do 54 godine, 4,5% su u dobi od 55 do 59 godina, a 3,9% u dobi od 60 godina ili starije. Međutim, starenjem se povećavao broj bolesti povezanih s godinama, a sami pacijenti su bili prinuđeni da počnu uzimati lijekove za smanjenje masnoća u krvi, antihipertenzive, itd (13).

## 1.2. Terapija HIV/AIDS-a

Antiretrovirusna terapija (ART), odnosno kombinacija antiretrovirusnih lijekova (cART- engl. Combination antiretroviral therapy) preporučuje se za sve inficirane bolesnike HIV virusom kako bi se smanjio rizik od napredovanja bolesti. Primarni cilj ART je spriječiti HIV-povezane bolesti i smrtnost, a sekundarni cilj je da se smanji rizik od prijenosa HIV-a. Ovaj cilj se najbolje postiže pomoću efikasne ART, kojom se maksimalno inhibira HIV replikacija, tako da plazmatska HIV RNK (viremija) ostaje ispod nivoa kojeg je moguće detektovati pomoću komercijalno dostupnih testova. Supresija virusa poboljšava imunski sistem i ukupni kvalitet života, te smanjuje rizik za nastanak i AIDS i ne-AIDS-definisanih bolesti, čime se značajno utiče na produženje životnog vijeka ovakvih bolesnika (14, 15). Efikasnom i savremenom terapijom za HIV/AIDS-a život ovakvih pacijenta je značajno produžen. Globalno, smrtnost povezana s AIDS-om opada, i to uglavnom kao posljedica primjene antiretrovirusne terapije (16).

Terapijske smjernice u liječenju HIV infekcije su se mijenjale, modifikovale pronalaskom novih lijekova. Naši kliničari u terapiji i praćenju HIV/AIDS su se pridržavali evropskih smjernica EACS-a (engl. EACS - The European AIDS Clinical Society). Evropsko kliničko udruženje za AIDS (EACS) predstavlja organizaciju čija je uloga promovisanje dostignuća u standardima brige, istraživanja i obrazovanja u vezi sa HIV infekcijom i koinfekcijama, kao i aktivno uključivanje u formulisanje politike javnog zdravlja, smanjenju incidence HIV-a u Evropi (17).

Faktori koje treba uzeti u obzir prilikom odabira početnog terapijskog režima. Izbor početnog ART određivao se individualno za svakog pacijenta, a zasnovan je na nekoliko faktora vezanih za pacijenta, kao i za same lijekove (Tabela 1.).

Tabela 1. Faktori koje je potrebno razmotriti prilikom započinjanja ART kod terapijski naivnih pacijenata

<b>Faktori povezani s pacijentom</b>
• Spremnost pacijenta da započne ART i drži se doživotne terapije
• Genotipski profil rezistencije
• Socijalno i psihološko stanje pacijenta (npr. zloupotreba droga, depresija)
• Životno okruženje pacijenta i socijalna podrška
• Faktori rizika (npr. kardiovaskularna bolest, jetrena/bubrežna i/ili gastrointestinalna bolest)
• Komorbiditeti (npr. HBV/HCV infekcija, kardiovaskularna bolest, tuberkuloza, bubrežna ili jetrena bolest)
• Trudnoća
<b>Faktori povezani sa lijekom</b>
• Potencijalni neželjeni efekti
• Interakcija s drugim lijekovima
• Pogodnost (opterećenje tabletama, frekvencija doziranja i restrikcija ishrane)

Smjernice za liječenje HIV infekcije preporučuju različite klase lijekova kao opcije prve terapijske linije. One uključuju nenukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze (NNRTI), nukleotidne inhibitore reverzne transkriptaze (NRTI), inhibitori proteaze, (PI; sa ili bez pojačavanja ritonavira) i inhibitori prijenosa integracije niti (INSTI). Generalno, smjernice širom svijeta se ne razlikuju i preporučuju upotrebu kombinacije lijekova sa dvostrukim NRTI kao osnovom (kičmom) terapije, zajedno sa jednim od slijedećih lijekova: NNRTI, PI pojačane ritonavinom (PI/r) ili INSTI (Tabela 2.) (18).

Tabela 2. Evropsko kliničko društvo za AIDS preporučilo je početne režime kombinovanja antiretrovirusne terapije za naivne odrasle pacijente (18 godina ili starijih) sa HIV infekcijom

<b>Odabrati jedan lijek iz kolone A i jedan lijek iz kolone B</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Preporučene doze</b>
Preporučeno	NNRTIs	TDF/FTC	
	EFV <sup>a</sup>	ABC/3TC <sup>bc</sup>	
	NVP <sup>d</sup>		
	Ili Ritonavir pojačani PI		
	ATV/r		ATV/r: 300/100mg 1x dnevno
	DRV/r		DRV/r: 800/100mg 1x dnevno
	LPV/r <sup>e</sup>		LPV/r: 400/100mg 2x dnevno ili 800/200mg 1x dnevno
Alternativno	INSTI		
	RAL		RAL: 400mg 2x dnevno
	SQV/r	AZT/3TC	SQV/r: 2000/100mg 1x dnevno
	FPV/r	ddl/3TC ili FTC <sup>f</sup>	FPV/r: 700/100mg 2x dnevno or 1400/200mg 1x dnevno
	MVC		Doza zavisi od glavnog lijeka

3TC: lamivudin; ABC: abacavir; ATV: atazanavir; AZT: zidovudine; ddI: didanosine; DRV: darunavir; EFV: efavirenz; FPV: fosamprenavir; FTC: emtricitabine; LPV: lopinavir; MVC: maraviroc; NNRTIs: nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; NRTI: nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; NVP: nevirapin; RAL: raltegravir; SQV: saquinavir; TDF: tenofovir disoproxil fumarate.

a) EFV nije preporučen kod trudnica ili žena koje ne koriste kontracepciju; nije aktivan za HIV-2 i HIV-1 grupu O.

b) ABC/3TC je kontraindikovan ako je HLA B 5701 pozitivan. Čak i ako je HLA B 5701 negativan, potrebno je savjetovanje o riziku nastanka hipersenzitivne reakcije.

c) ABC bi trebao biti korišten sa oprezom kod pacijenata sa visokim kardiovaskularnim rizikom i/ili kod pacijenata sa viremijom > 100 000 kopija/mL.

d) NVP koristiti s velikim oprezom kod žena sa CD4+ brojem ćelija većim od 250 /ml i kod muškaraca sa CD4+ brojem ćelija većim od 400 /ml; nije aktivan u HIV-2 i HIV-1 grupi O.

e) LPV/r (Kaletra1) je jedini PI koformulisan sa ritonavirovom.

f) ddl/3TC ili FTC jedino ako nisu dostupni ili je pacijent netolerantan na preporučene NRTIs (17, 18).



### 1.2.1. Klinički vodiči za tretman HIV/AIDS bolesnika u BIH

Od 2003. godine antiretrovirusna terapija dostupna je u Bosni i Hercegovini (BIH). Odabir inicijalne ART zavisio je od broja CD4, nivoa viremije, prisustva/odsustva HIV rezistencije, prognoze adherencije, komorbiditeta, neželjenih dejstava lijekova, interakcije sa drugim lijekovima kao i same cijene lijeka. Zbog relativno malog broja HIV inficiranih, neki antiretrovirusni lijekovi nisu se mogli registrovati u BIH (visoka cijena registracije, mala potrošnja, neisplativost proizvođača), samim tim imali smo manji broj raspoloživih lijekova u odnosu na EU (Evropsku uniju), cijena nekih lijekova je jako visoka za zemlju poput BIH, te se terapijski izbor svodio na odabir povoljnih (jeftinijih) i dostupnih lijekova (Tabela 3.) (19, 20).

Tabela 3. Antiretrovirusna terapija dostupna u BIH

Naziv lijeka( Internacionalni nezaštićeni)	Akronim lijeka
Zidovudin	ZDV
Didanozin	Ddl
Stavudin	D4T
Lamivudin	3TC
Abakavir	ABC
Zidovudin/Lamivudin	Combivir
Nevirapin	NVP
Efavirenz	EFV ili EFZ
Lopinavir/Ritonavir	LPV/r
Indinavir	IDV
Ritonavir	RTV
Nelfinavir	NFV
Saquinavir	SQV
Tenofovir	TDF
Tenofovir/Emtricitabin	TDF+FTC
Abakavir/Lamivudin	ABC/3TC
Raltegravir	RAL

Za inicijalni ART tretman korišteni su klinički vodiči u skladu sa smjernicama EACS, odnosno dvije kombinacije, PI ili NNRTI plus kombinacija dva NRTI kao osnova cART za većinu pacijenata (21, 22).

### **1.3.Kardiovaskularni rizici i kardiovaskularna oboljenja**

Uprkos mnogim značajnim naprecima u liječenju kardiovaskularnih bolesti (KVB), ova oboljenja i dalje su najčešći uzrok smrtnosti u svim zemljama. U razvijenim zemljama od KVB umire više ljudi nego od bilo koja druge bolesti, a u zemljama s niskim i srednjim dohotkom smrtnost je u porastu. Stopa smrtnosti od ishemijske bolesti srca i moždanog udara povećala su se širom svijeta. Čak i u Sjedinjenim američkim državama (SAD), gdje su stope smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti postepeno opadale u odnosu na svoj vrhunac u 1960-im godinama prošlog vijeka. Ova stopa pada značajno se usporila od 1990. godine, mada se vjeruje da će do 2030. godine, 40,5% populacije imati neki oblik kardiovaskularne bolesti. Prihvaćeno je mišljenje da je kardiovaskularna bolest posljedica niza hroničnih stanja koja nastaju uslijed složene interakcije između genetske predispozicije i uticaja okoline koji dovode do progresivnog pogoršanja strukture i funkcije kardiovaskularnog tkiva. Uopšteno je vjerovanje da iako genetski defekti leže u osnovi nekih rijetkih oblika srčanih bolesti, većina kardiovaskularnih oboljenja nastaje zbog interakcija između genetske predispozicije i načina života. Iako je specifičan doprinos gena i okoline i dalje slabo shvaćena, smatra se da faktori okoline i način života imaju dominantnu ulogu u razvoju ovih oboljenja. To vjerovanje se temelji na rezultatima mnogih studija koje pokazuju da se kardiovaskularna oboljenja u velikoj mjeri mogu spriječiti zdravim načinom života (23).

Otkrivanje i kontrola kardiovaskularnih faktora rizika ostaju ključna strategija u prevenciji KVB. U tom smislu, pušenje, hipertenzija, hiperholesterolemija, te šećerna bolest su klasični, dobro uspostavljeni, modifikovani faktora rizika. Gojaznost je jedan od glavnih učesnika, bilo kao nezavisni riziko-faktor za kardiovaskularna oboljenja, bilo kroz njegovu povezanost s drugim faktorima rizika, uključujući hipertenziju, dislipidemiju, itd. U novije vrijeme, visok nivo visoko-senzitivnog C-reaktivnog proteina (hsCRP), kao biomarkera sistemske upale niskog stepena dovodi se u vezu sa gojaznošću i obilježjima metaboličkog sindroma, stoga se pominje se kao novi prediktor za nastanak kardiovaskularnih oboljenja (24).

### **1.3.1. Hipertenzija**

U svijetu sada od hipertenzije boluje oko milijardu ljudi. Od toga, 95% ima hipertenziju nepoznate etiologije, nazvanu esencijalna hipertenzija, a takvi bolesnici su zavisni svakodnevno od antihipertenziva (25).

Višak soli u hrani, nizak unos kalijuma hranom, prekomjerna težina i gojaznost, fizička neaktivnost, konzumiranje alkohola, pušenje duhana, socioekonomski status, psihosocijalni faktori, stres i šećerna bolest smatraju se faktorima rizika za nastanak arterijske hipertenzije (26).

Mnogi signalni putevi uključeni su u regulaciju krvnog pritiska u esencijalnoj hipertenziji. To uključuje: angiotenzin II-simpatički nervni-CD4+ T ćelijski sistem, put koji se sastoji od niza gena koji učestvuju u kontroli regulacije soli u bubrezima i puteva koji posreduju u konstrikciji i dilataciji glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova. Disfunkcija bilo kojeg od ovih puteva dovodi do povećanja tonusa u arterijama, što rezultira visokim krvnim pritiskom. Tačna etiologija i patogeneza esencijalne hipertenzije slabo je shvaćena, što dovodi do nespecifičnog i manje efikasnog liječenja. U SAD, 50% bolesnika sa hipertenzijom nema dobro kontrolisani krvni pritisak, a oko 5 miliona pacijenata je otporno na antihipertenzivne lijekove, pa se liječe kombinacijom najmanje tri antihipertenzivna lijeka. Nedostatak dobro kontrolisanog visokog krvnog pritiska dovodi do oštećenja ciljnih organa. Tako je esencijalna hipertenzija postala glavni faktor rizika za srčani udar, moždani udar, hronično oslabljenje srca i bubrega (25).

### **1.3.2. Pušenje**

Nijedna navika nema više negativan utjecaj na bolesti srca i pluća od navike pušenja duhana. U prosjeku, odrasli sa ovim navikama, umiru 13 do 14 godina ranije nego nepušači. U SAD-u pušenje se dovodi u vezu s 443.000 prijevremenih smrtnih ishoda godišnje, što predstavlja godišnji gubitak od preko 5 miliona potencijalnih godina života i 193 milijarde dolara direktnih troškova liječenja i gubitka produktivnosti. Iako pušenje povećava rizik od razvoja raka pluća i respiratornih bolesti, gotovo polovina prerane smrtnosti povezana s pušenjem je posljedica je kardiovaskularnih bolesti. Pušači imaju gotovo dvostruko veći rizik od srčane bolesti i deset puta veći rizik za razvoj bolesti krvnih sudova od nepušača (arterija i vena). Pušači su također podložni nastanku aritmija, moždanih udara i iznenadne srčane smrti. Pušenje značajno (45-80%) povećava rizik od

zastoja srca. U poređenju s nepušačima, čak i pušači koji puše 6 do 9 cigareta na dan imaju veći rizik za srčani udar. Čak i pasivno pušenje (izloženost duhanskom dimu) može povećati rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Velika tendenca pušača da obole od srčanih oboljenja temelji se na osjetljivosti kardiovaskularnih tkiva na udisanje drugih zagađivača. Uzimajući u obzir vrijeme izloženosti, studije o zagađenju vazduha, izloženosti pasivnom pušenju i pušenju dosljedno su pokazale veće posljedice na kardiovaskularni sistem u odnosu na one koje su povezane s rakom pluća ili čak respiratornim bolestima (23).

### **1.3.3. Gojaznost**

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) definiše gojaznost ili prekomjernu tjelesnu težinu kao abnormalno ili prekomjerno nakupljanje masti i predstavlja rizik za kardiovaskularne bolesti i smrtnost. Indeks tjelesne mase (ITM): težina osobe (u kilogramima) podijeljena sa visinom na kvadrat (u metrima), dobro je prihvaćena i postala je tradicionalna mjera gojaznosti. Osoba s ITM od 20-25 kg/m<sup>2</sup> smatra se normalno uhranjenom, a iznad 25 do 30 kg/m<sup>2</sup> smatra se prekomjernom težinom. Nadalje, gojaznost je podijeljena u tri kategorije prema ITM: klasa I (sa ITM od 30 do 35 kg/m<sup>2</sup>), klasa II (sa ITM od 35 do 40 kg/m<sup>2</sup>) i klasa III (sa ITM >40 kg/m<sup>2</sup>). Nedavno je identifikovana nova metoda za mjerenje rizika specifično povezanog s abdominalnom gojaznošću, poznata kao indeks oblika tijela (eng. Body Shape Index). On se zasniva na odnosu obima struka i proizvodu 2/3 ITM i polovine visine tijela. Vjeruje se da je bolji prediktor raznih oboljenja od klasičnog ITM, kao najčešće mjere koja se koristi za definisanje i praćenje gojaznosti. U posljednjih nekoliko godina, evidentno je da su neaktivni način života, nezdrava ishrana obogaćena obrađenom i konzervirisanom hranom, nedostatak sna i tjelesne aktivnosti doveli do epidemije gojaznosti. Gojaznost utiče na hroničnu upalu niskog stepena koja dovodi do razvoja metaboličkog sindroma. U opštoj populaciji prekomjerna tjelesna težina povećava rizik za nastanak aterogeneze, infarkta miokarda i posljedične hronične srčane insuficijencije sa ili bez metaboličkog sindroma (MS) (27).

### **1.3.4. Dislipidemija**

Dislipidemija je definisana kao poremećaj nivoa jednog ili više lipoproteina u krvi, kao što su povišeni ukupni holesterol, lipoproteinski holesterol niske gustine (LDL) i/ili povećan nivo triglicerida, kao i/ili niski nivo holesterola visoke gustine (HDL). Rezultati velikog broja studija pokazali su da mnoge osobe sa dislipidemijom su bile nedovoljno dijagnostikovane i procjenjuje se da će se prevalenca dislipidemije u SAD i Zapadnoj Evropi povećati po stopi na 1,76% godišnje i premašiti 500 miliona u 2022. godini. Očekuje se da će broj osoba s dislipidemijom preći 78 miliona u razvijenim zemljama do 2022. godine. Prevalenca dislipidemije je visoka i kontinuirano raste u mnogim zemljama u razvoju i nerazvijenim zemljama kao posljedica loše prehrane, gojaznosti, starenja stanovništva, smanjene tjelesne aktivnosti i drugih nepovoljnih promjena u načinu života. Dislipidemija je i jedan od najvažnijih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, koje su takođe glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta u svijetu (28).

### **1.4. HIV infekcija i kardiovaskularna oboljenja**

Srce nije često mjesto gdje se dešavaju oportunističke infekcije i neoplastički procesi kod bolesnika s AIDS-om. Aterosklerotska kardiovaskularna bolest, koja dovodi do srčane ishemije i infarkta, može biti i prisutna i kod pacijenata sa AIDS-om. U svim zemljama postoji trend rasta HIV inficiranih osoba na cART, kojima je produžen životni vijek. Klinički, bolesti srca kod ovakvih pacijenata mogu biti popraćeni bolovima u prsima, tahikardijom, raznim aritmijama, izljevima i kongestivnim popuštanjem srca. Može doći i do blage kardiomegalije. Srčane manifestacije kod djece sa AIDS-om slične su onima kod odraslih. Vjerovatnije je da će djeca sa HIV-om pokazati prijevremenu aterosklerozu. Takođe preovladava dislipidemija među djecom koja žive s HIV-om, bez obzira da li su na ART ili ne. Gotovo trećina djece koja prima ART može razviti lipodistrofiju. Prije uvođenja ART-a do 25% djece zaražene HIV-om imalo je kardiovaskularne simptome, uključujući smanjenu funkciju i hipertrofiju lijeve komore. U eri ART-a, HIV-om zaražena djeca imala su veću učestalost dijastolne disfunkcije i značajno povećan indeks mase lijeve komore u poređenju sa HIV negativnim kontrolama (29).

HIV inficirane osobe imaju povećan rizik za koronarnu arterijsku bolest u odnosu na zdrave ljude. HIV infekcija može dovesti do imunske aktivacije i hronične upale niskog stepena koja potiče aterosklerozu. Ovi faktori međusobno su jako povezani. Patološka

oštećenja, položaj oštećenja i sastav aterogenog plaka su slični aterosklerozi kod HIV-negativnih pacijenata. Osobe sa HIV infekcijom na ART, posebno oni koji su liječeni inhibitorima proteaze (PI) starije generacije kao što su ritonavir i indinavir, su izloženi povećanom riziku za razvoj KVB zbog sindroma lipodistrofije i viremijske endotelne disfunkcije koja potiče aterogenezu na krvnim sudovima. U ovom sindromu postoji umjerena hiperholesterolemija i izražena hipertrigliceridemija zajedno sa inzulinskom rezistencijom i intolerancijom na glukozu, koji su tipični za šećernu bolest. To su zapravo nalazi karakteristični za metabolični sindrom (10).

### **1.5. HIV i endotelna disfunkcija**

Glikoprotein HIV virusa Gp120 je povezan sa apoptozom, ekspresijom adhezijskih molekula, produkcijom upalnih citokina i propusnošću endotelnih ćelija. Gp120 je prisutan na površini virusno inficiranih ćelija, ili kao slobodni topljivi protein uzrokuje endotelnu apoptozu pretežno direktnom interakcijom s koreceptorom, CXCR4. Gp120 inducira apoptozu endotelnih ćelija ljudskog koronarnog sistema, endotelnih ćelija ljudske umbilikalne vene, endotelnih ćelija plućne i moždane mikrovaskularizacije. Apoptoza endotelnih ćelija je važan proces, u početku u nastanku aterosklerotskog plaka, a kasnije i napredovanje u veći stadijum ateroskleroze, kada plakovi postaju osjetljivi i pucaju. Molekularni mehanizam pomoću kojeg gp120 ispoljava svoju endotelnu toksičnost, može uključivati aktivaciju kaspaze-3, regulaciju Baxa, aktivaciju protein kinaze C i signalizaciju p38 mitogeno-aktivirane proteinske kinaze. Gp120 takođe inducira povećanje reaktivnih vrsta kiseonika, odnosno povećanje oksidativnog stresa u endotelnim ćelijama. Oksidativni stres izazvan stvaranjem viška reaktivnih kiseonikovih vrsta je ključan u procesu razvoja ateroskleroze. HIV-om inducirana produkcija reaktivnih vrsta kisika vjerojatno doprinosi disfunkciji endotela direktnim učincima na endotel i/ili indirektno preko monocita/makrofaga koji dodiruju krvne sudove. Virusni glikoprotein takođe može povećati sekreciju endotelina-1 (ET-1) i promovisati površinsku ekspresiju aktivisanog monocitnog endotelnog polipeptida II. Endotelin-1 posreduje u smanjenju proizvodnje vaskularnog azotnog oksida endotelnih ćelija, što dovodi do proliferacije glatkih mišića i migracije, i na kraju do arterijske vazokonstrikcije. Endotelni polipeptid II aktivacije monocita oslobađa se kao odgovor na stres, kao što su hipoksija, mehanička napetost ćelija i apoptoza, te djeluje kao pro-apoptotički faktor. Osim toga, skorašnje istraživanje je pokazalo da HIV gp120 (X4 i R5) potiče starenje endotelnih ćelija i oštećuje regulacijsku

mikro-RNK povezanu sa starenjem. Starenjem endotelne ćelije razvijaju disfunkcionalni fenotip koji dobiva proinflamatorna, prooksidantna, vazokonstriktivna i protrombotička svojstva (30).

### **1.6. Imunski sistem i limfociti**

Imunski sistem se razvio kao odbrana organizma od zaraznih bolesti. Osobe sa izrazito slabim imunim odgovorom ukoliko se neadekvatno liječe, podliježu brojnim infekcijama u ranom životu. Iako je za veći dio imunskog odgovora zadužen stečeni imunitet, koji djeluje preko antitijela i aktiviranih limfocita, neizostavno je spomenuti i urođeni imunitet koji je filogenetski stariji i važan je u smislu brzine odgovora, mada s manjom efektivnošću. Urođeni imunitet učestvuje u mehanizmima, kao što su: fagocitoza bakterija putem tkivnih makrofaga, uništavanjem progutanih uzročnika bolesti preko probavnih enzima i želučane kiseline, zaštitnička funkcija kože i putem krvi koja posjeduje određene hemijske sastojke koji mogu uništavati strana tijela i toksine. Za stečeni imunitet odgovorni su limfociti. Limfociti su agranulocitni leukociti koji se dijele na: limfocite B, limfocite T i ćelije „prirodne ubice“ (eng. natural killer; NK-ćelije). Stečeni imunitet se može podijeliti na humoralni i ćelijski imunitet. Humoralni imunitet karakteriše stvaranje antitijela na određeni antigen. Antitijela su proteini plazme, poznatiji pod nazivom imunoglobulini (Ig). Limfociti koji proizvode imunoglobuline, a koji zavise od koštane srži, poznati su kao B limfociti. Odgovarajući na stimulaciju antigena, B limfociti će sazrijeti do plazma ćelija koje zatim stvaraju imunoglobuline. Poznato je nekoliko klasa imunoglobulina, a to su: M, G, A, D i E (31).

Ćelijski imunitet se postiže tako što se stvaranjem većeg broja aktiviranih specifičnih limfocita uništavaju strani agensi. U ovom tipu imuniteta posreduju T limfociti. Kao dobar primjer ćelijskog imuniteta može se navesti odbacivanje transplantata od strane domaćina. T Limfociti čine najveći udio limfocita, i to 60-70%. Nalaze se u limfnim čvorovima, tonzilama, limfatičnom tkivu pridruženom sluznicama disajnog i gastrointestinalnog sistema, timusu i slezeni. Na svojoj površini imaju T ćelijski receptor (TCR) kojim prepoznaju antigen predočen od strane antigen prezentujućih ćelija u sklopu HLA sistema. Prema molekulama na površini koje su bitne za funkciju limfocita, dijelimo se na CD4 i CD8 limfocite. Njihov odnos iznosi 2:1 (32).

CD4 limfociti T su pomoćni limfociti, jer izlučuju citokine kojim mogu aktivirati druge ćelije imunog sistema. CD8 limfociti još se nazivaju i citotoksičnim, jer neposredno uništavaju ćelije zaražene virusom. CD4 limfociti dijele se dalje u dvije podgrupe, a to su TH1 limfocite koji izlučuju citokine interleukin-2 (IL-2) i interferon gama, čime aktiviraju makrofage i NK ćelije, i TH2 limfocite koji izlučuju citokine IL-4, IL-5, IL-10, a koji potiču humoralni imunitet (33).

## **1.7. CD4/CD8 odnos**

CD4 pomoćne/inducirane ćelije i CD8 citotoksične/supresorske ćelije su dva fenotipa T limfocita. Odlikuju se izražajnim površinskim markerima i funkcijama koje se uglavnom ispoljavaju u limfnim čvorovima, ali i cirkulirajućoj krvi. Normalan odnos CD4/CD8 kod zdravih ljudi nije u potpunosti definisan. Odnos CD4/CD8 između 1,5 i 2,5 uopšteno se smatra normalnim; međutim, postoji široka heterogenost u tome, jer pol, dob, etnička pripadnost, genetika, izloženost i infekcije mogu uticati na ovaj odnos. Normalni odnosi CD4/CD8 mogu se obrnuti kroz izolovanu i ciljanu ćelijsku smrt cirkulišućih CD4 ćelija, odnosno kroz rast CD8 ćelija ili kombinacijom ova dva fenomena. Niži ili inverzni odnos CD4/CD8 je imuno-rizični fenotip i povezan je s promijenjenom imunom funkcijom, imunskim starenjem i hroničnom upalom kod HIV inficiranih osoba (34).

### **1.7.1. CD4/CD8 odnos kao marker HIV inficiranih i efekta cART**

Prirodni tok neliječene HIV infekcije ima suprotne efekte na cirkulišuće CD4 i CD8 limfocite. Prije nego što virus HIV-a smanji broj CD4 ćelija, cirkulišuće CD8 ćelije će se obično povećati kao odgovor na infekciju, što će rezultirati niskim CD4/CD8 odnosom. U kontekstu ART-a, neki pacijenti će vratiti broj CD4, ali će doživjeti pad broja CD8, što dovodi do normalizacije odnosa. Međutim, za druge pojedince, usprkos suzbijanju viremije ART-om i poboljšanju broja CD4 ćelija, održavaju se visoki nivoi CD8 ćelija u cirkulaciji, te se odnos ne može poboljšati. Skorašnja studija presjeka kod 334 pacijenta kod kojih je HIV virus potisnut terapijom, pokazuju da niži odnos CD4/CD8 tokom liječenja predviđa održivu HIV viremiju (35). Da li je ta održiva viremija uzrok ili učinak nižeg odnosa CD4/CD8 ostaje nepoznato, ali povezanost naglašava nesklad između imunske aktivacije i imunskog starenja kod pacijenata koji su na ART. Danas sve više istraživača se fokusira



na korisnost CD4/CD8 odnosa kao biomarkera ili surogat markera i ispituje povezanost istog i ishoda u populaciji HIV inficiranih (36, 37).

CD4/CD8 odnos je tradicionalno opisivao kao marker imunostarenja u opštoj populaciji i on se sve više pojavljuje kao surogat marker u populaciji HIV-inficiranih, jer se pokazalo da identifikuje pojedince sa kontinuiranom imunskom disfunkcijom koji su kao takvi od većeg rizika za AIDS, ne-AIDS bolesti i smrtnost uprkos normalizaciji CD4 nivoa tokom ART. Dokazano je da odmah započeta terapija (ART) je povezana sa bržim porastom broja CD4, kao i porastom CD4/CD8 odnosa (38).

Međutim, u studiji Serrano-Villar i sar., na HIV-inficiranim pojedincima tretiranim unutar 6 mjeseci u poređenju sa HIV inficiranim koji su tretirani 2 godine, odnos CD4/CD8 je ostao nizak i nije se normalizovao kod rane terapijske grupe, nakon serkonverzija (39).

Suprotno njihovim rezultatima, Hoenigl i sar., su pronašli da su odnosi CD4/CD8 bili niži kod pojedinaca sa simptomatskom akutnom HIV infekcijom i da je isti bio u korelaciji sa trajanjem simptoma akutne HIV infekcije. Pokazano je da je rano započeta terapija (ART-započeta unutar 40 dana od procijenjenog datuma infekcije) jako povezana sa značajnim povećanjem odnosa CD4/CD8. Njihovi podaci upućuju na to da se CD4/CD8 odnos brzo smanjuje tokom akutne HIV infekcije, ali se može značajno povećati kada se rano započne ART. Autori sugerišu da rani početak ART može dovesti do značajnog povećanja CD4/CD8 odnosa i smanjiti rizik za ne-AIDS bolesti i smrtnost (40).

### **1.7.2. CD4/CD8 odnos, starenje i imunska aktivnost**

Prevalenca inverznog CD4/CD8 odnosa raste sa starošću i u opštoj populaciji. Pokazano je da je obrnuti odnos zastupljen kod 8% osoba starosne dobi od 20 do 59 godina, te 16% u dobi od 60 do 94 godina. U pogledu polnih razlika osobe ženskog pola u svim dobnim grupama imaju manju vjerovatnoću za obrnuti CD4/CD8 odnos u odnosu na osobe muškog pola. Atrofija timusa uzrokovana starošću i hormonima mogla bi objasniti polne razlike u ovom odnosu. Hormonski uticaj na CD4/CD8 odnos je dokazan korelacijom između niske plazmatske koncentracije estradiola, visokih nivoa cirkulišućeg CD8 i niskog odnosa CD4/CD8 kod žena sa preuranjenom disfunkcijom jajnika. Eksperimentalni modeli na miševima dodatno naglašavaju povezanost starosti i estrogena, na način da je niži odnos CD4/CD8 zabilježen kod životinja nakon prirodne menopauze i ovariektomije. Perzistencija timusa povezana je s boljim oporavkom odnosa CD4/CD8 tokom liječenja HIV-a (34).

Castilho i sar. su dokazali značajnu negativnu korelaciju između odnosa CD4/CD8 i starosne dobi. Dosadašnjim istraživanjima uočeno je da HIV-om zaraženi pacijenti pokazuju promjene u stečenom imunskom sistemu koji su ujedno karakteristični i za starije osobe. Shodno tome, istraživači su predložili uvođenje novih pojmova kao što su: inflamacija kao rezultat starenja (*eng.* inflammaging) i imunostarenje, mada je ovakav imunski fenotip specifičan, kako za pacijente zaražene HIV-om, tako i za starije osobe (41). Kod HIV neinficiranih, inverzija odnosa CD4/CD8, odnosno sa vrijednosti manje od 1, smatraju se stanjem imunskog rizika i predstavlja značajan biomarker imunostarenja. Vjeruje se da je ovako nizak odnos CD4/CD8 prediktor veće smrtnosti HIV inficiranih. Važno je naglasiti da većina HIV inficiranih bolesnika prije početka same ART pokazuje nizak odnos CD4/CD8. Tokom ART dolazi do postepenog povećanja broja CD4 limfocita, ali značajan broj pacijenata na dugogodišnjem liječenju još uvijek pokazuje nizak odnos, iako se broj CD4 normalizuje. Vjeruje se da je razlog takvog niskog odnosa tokom terapije u činjenici da u ovoj HIV inficiranoj populaciji postoje elementi naglašene hronične imunске aktivnosti kao i imunostarenje: pokazano je da je odnos CD4/CD8 nezavisni prediktor aktivacije imunskog sistema kod pacijenata sa suprimiranom HIV infekcijom. Kod djece i adolescenata na ART-u utvrđeno je da je odnos CD4/CD8 bio povezan s povišenim nivoima CD8 limfocita koji imaju fenotip po tipu aktivacije/iscrpljivanja (perzistentne aktivacije), što je važna karakteristika imunostarenja (40).

U studiji, koju su sproveli Serrano-Villar i sar., pokazana je značajna negativna korelacija između odnosa CD4/CD8 i parametra urođene imunске aktivacije, uključujući topive CD14, CRP i IL-6 kod HIV-inficiranih odraslih pacijenata koji su bili podvrgnuti ART-u. (39).

Iako postoje određene razlike u formi imunostarenja kod pacijenata sa HIV i osoba starije životne dobi, i jedne i druge imaju slične karakteristike: skraćivanje telomera, akumulaciju disfunkcionalnih i starosnih CD28-T-ćelija, ekspanziju CMV-specifičnih CD8+ T-ćelija i povećanje upalnih markera (42).

### 1.7.3. CD4/CD8 odnos i oksidativni stres

Iako je mehanizam nedovoljno razjašnjen, ipak je pokazano da oksidativni stres ubrzava starenje. Također pokazano je da oksidativni stres predstavlja rizik za nastanak velikog broja oboljenja, uključujući: kardiovaskularne bolesti, akutnu i hroničnu bolest bubrega, neurodegenerativne bolesti, makularnu degeneraciju, hroničnu opstruktivnu plućnu bolest, diabetes mellitus, maligne bolesti i dr. (43).

Dosadašnja istraživanja, u laboratorijskim uslovima ili u uslovima „in vivo“ su pokazala da pacijenti sa HIV infekcijom pokazuju znakove povećanog nivoa oksidativnog stresa u organizmu. U tom smislu pokazano je da osobe zaražene HIV-om stvaraju više nivoa reaktivnih vrsta kiseonika u monocitima, povećane koncentracije oksidovanih nukleinskih baza kao što je 8-oksogvanin, te elemente lipidne peroksidacije, uključujući povećanje koncentracija malondialdehida u plazmi. Pokazano je da pacijenti zaraženi HIV-om pokazuju znakove smanjenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta te smanjenje nivoa odnosa glutationa i oksidiranog glutationa, kao i smanjenje nivoa glutationa u krvi, kao značajnog antioksidansa. Neizostavno je istaći da postoje dokazi o povećanim nivoima reaktivnih vrsta kiseonika u kulturi ćelija zaraženih s HIV-om (44).

U studiji, koju su sprovedi Teto i sar., autori su pokazali značajnu pozitivnu korelaciju između broja CD4 limfocita i nivoa totalnog antioksidativnog kapaciteta, kao i značajnu negativnu korelaciju između broja CD4 limfocita i indeksa lipidne peroksidacije. Autori vjeruju da višak stvorenih slobodnih radikala djeluje na lipide i inducira oksidativni stres, odnosno lipidnu peroksidaciju, koja ispoljava destruktivno djelovanje kao što je apoptoza ćelija, a ujedno i jedan od vodećih uzroka smanjenja CD4 ćelija tokom HIV infekcije, posebno u ranoj fazi infekcije (45).

Muller i sar. su u svojoj studiji ispitivali odnos parametara oksidativnog stresa i odnosa CD4/CD8 kod starije populacije. Utvdili su da pacijenti sa odnosom CD4/CD8 manjim od 1 imaju značajno niže nivo naprednih proizvoda oksidacije proteina i više nivo parametara lipidne peroksidacije u odnosu na ispitanike sa vrijednošću CD4/CD8 odnosa većem od 1, te značajnu negativnu korelaciju između nivoa naprednih proizvoda oksidacije proteina odnosa CD4/CD8. Njihovi rezultati su dokazali da su ispitivani markeri pokazali značajnije razlike kod ispitanika muškog pola u odnosu na ispitanike ženskog pola (46).

#### 1.7.4. CD4/CD8 odnos i kardiovaskularni rizik

Mnogi podaci iz dostupne literature ukazuju na visoku učestalost prijevremenih kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa HIV infekcijom. Istraživači vjeruju da kod ovih pacijenata dolazi do ubrzanog starenja vaskularnog endotela, koje karakteriše prisustvo hronične perzistentne inflamacije, kao i niza nepravilnosti u funkcionisanju imunskog sistema. Trenutno svi dostupni algoritmi koji procjenjuju rizik, a koji se temelje na dobro poznatim faktorima rizika, ne mogu tačno predvidjeti isti (rizik) kod velikog broja pacijenata, pa čak i onih kod kojih je prisutno više HIV-specifičnih faktora. Uvođenje pojma vaskularnog starenja našlo je primjenu u poboljšanju efikasnosti ovih algoritama. Kako god, svaki novi algoritam uz uvođenje novih potencijalnih markera ili prediktora bio bi od koristi kako za same pacijente, tako i za ljekare koji se bave ovom problematikom u smislu boljeg praćenja ne-AIDS bolesti, kao i u prognostičkom smislu o ishodu istih (47).

U posljednje vrijeme sve više se istražuje i spominje CD4/CD8 odnos kao potencijalni prediktor ne-AIDS bolesti, u prvom redu kardiovaskularnih bolesti. U skladu s tim, Castilho i sar. su utvrdili da veći CD4/CD8 odnos godinu dana nakon HIV virusne supresije na ART je bio nezavisni prediktor smanjenja rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja, posebno kod mlađih pacijenata (41).

U velikoj kohortnoj studiji koju su sproveli Mussini i sar. utvrđeno je da su HIV inficirani pacijenti podvrgnuti ART postepeno vremenom povećavali odnos CD4/CD8 limfocita. Normalizacija CD4/CD8 odnosa 5 godina tokom ART bila je zabilježena kod 29,4% pacijenata. Prateći povezanost CD4/CD8 odnosa i ne-AIDS bolesti autori su utvrdili da su pacijenti sa nižim vrijednostima ovog odnosa u značajno većem riziku za nastanak istih. Njihovi rezultati su pokazali da je CD4/CD8 odnos manji od 0,30 nezavisno povezan s povećanim rizikom za nastanak ne-AIDS bolesti ili za smrtni ishod u poređenju sa pacijentima koji su imali ovaj odnos veći od 0,45. Od ne-AIDS oboljenja koja su bila povezana sa nižim vrijednostima CD4/CD8 autori su zabilježili veću učestalost javljanja malignih bolesti, ishemijskih bolesti srca, te završni stadijum bubrežnih bolesti. Kao moguće patogeno objašnjenje povezanosti između niskog odnosa CD4/CD8 i rizika za nastanak oboljenja koja nisu povezana sa AIDS-om, može biti da je nizak odnos marker dugotrajne aktivacije imuniteta (36).

S druge strane, ispitujući povezanost odnosa CD4/CD8 i udruženih ne-AIDS bolesti kod pacijenata sa HIV-om, Menozzi i sar. su pokazali da odnos CD4/CD8 nije bio povezan s prevalencom više bolesti kod ovih pacijenata. Međutim autori su pronašli da su pacijenti

koji su imali odnos CD4/CD8 u vrijednosti  $<0,8$  pokazali veću prevalencu kardiovaskularnih oboljenja. Njihovi rezultati su modelom multivarijabilne logističke regresije utvrdili je da je odnos CD4/CD8  $<0,8$  nezavisni prediktor povećanog rizika za nastak kardiovaskularnih bolesti (KVB). Autori smatraju da bi pojava imuno-aktivacije ili imunostarenja kod ovih pacijenata mogla ležati u osnovi patogeneze kardiovaskularnih oboljenja (48).

Slične rezultate predočila je studija Serrano-Villar i sar., koji su kod HIV inficiranih pacijenata podvrgnutih ART pronašli značajnu povezanost između nižih vrijednosti odnosa CD4/CD8 i debljine intime medije karotidne arterije, kao i povezanost između nižih vrijednosti odnosa CD4/CD8 i niže vrijednosti glomerularne filtracije, nezavisno od broja CD4 limfocita (40).

U svom istraživanju Gao i sar. su pokazali da je odnos CD4/CD8 bio značajno niži kod pacijenata sa kardiovaskularnim bolestima u odnosu na kontrolnu skupinu. Isti autori su ustanovili da je odnos CD4/CD8 nezavisno povezan s pojavom veće učestalosti kardiovaskularnih oboljenja kod osoba starije životne dobi. Ovakav rezultat je dobiven uz prethodno kohortiranje na prisutnost faktora rizika, uključujući: dob, spol, sistolni i dijastolni krvni pritisak, ITM, pušenje, nivo triglicerida, nivo holesteola, HDL-c, LDL-c, vrijednost CRP, kao i broj CD3, CD4 i CD8 T limfocita (49).

### **1.7.5. CD4/CD8 odnos i metabolički sindrom**

Mnoge studije pokazuju da je ART povećala preživljavanje pacijenata sa HIV infekcijom, a da ART takođe može dovesti do nekoliko trajnih metaboličkih abnormalnosti. Međutim, podaci o učestalosti metaboličkog sindroma (MS) kod osoba zaraženih HIV-om značajno variraju u različitim opservacijskim istraživanjima (51).

HIV je stanje koje se dovodi u vezu s rezistencijom na inzulin i lipoatrofijom. Rizik od inzulinske rezistencije može se povećati ART-om, inhibitorima proteaze (PI) ili nekim drugim modusom ART. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je prevalenca metaboličkog sindroma kod pacijenata zaraženih HIV-om slična prevalenci opšte populacije i kreće se u rasponu od 17% i 47% (51, 52).

U studiji, koju su sproveli Calza i sar., prevalenca MS u studijskoj populaciji je bila 16% za IDF kriterij. Prevalenca MS je bila značajno veća među pacijentima koji su primali cART terapiju nego među HIV pacijentima bez terapije (50).

Studija Diouf i sar. je pokazala da je od pacijenata koji su tretirani 9 godina sa cART, 37% imalo lipodistrofiju, 28% hipertenziju i 14% je dobilo šećernu bolest (53).

U longitudinalnoj studiji, koju su sproveli Tiozzo i sar., utvrđeno je da se metabolički sindrom pojavio kod 33% pacijenata koji su bili podvrgnuti ART. Nastanak metaboličkog sindroma bio je potaknut prisutnošću naglašene abdominalne gojaznosti i hipertenzije. Veća upotreba PI, povećane vrijednosti krvnog pritiska, kao i viši unos i potrošnja ugljikohidrata zabilježeni kod pacijenata koji su razvili MS, u odnosu na one koji nisu razvili isti (54).

Tesfaye i sar. su pokazali da pacijenti na ART imaju značajno povišene nivoe holesterola, triglicerida i lipoproteina niske gustine (LDL), ali i značajno niži broj CD4 u odnosu na kontrole koje nisu primale ART. Također je pokazano da pacijenti ženskog pola, pacijenti sa ITM najmanje 25 kg/m<sup>2</sup>, pacijentisa starošću preko 45 godina i vrijednošću ukupnog holesterola od najmanje 200 mg/dl su značajno bili povezani s nastankom metaboličkog sindroma (MS) (55).

Odnos između broja CD4 i pojave MS još uvijek je nejasan zbog toga prdmet brojnih istraživanja. Jedan broj studija pokazao je direktnu povezanost, dok druge studije nisu pokazale korelaciju ili čak obrnutu korelaciju. Kakogod, uočeno je da je visok stepen viremije povezan sa razvojem MS, koji može uticati na učestalost pojave nižih nivoa HDL i visokih nivoa triglicerida u krvi (52).

Riangwiwat i sar. su pokazali da je niži odnos CD4/CD8 prediktor sporijeg gubitka potkožnog masnog tkiva kod HIV inficiranih pacijenata (56).

### **1.8. C-reaktivni protein**

C-reaktivni protein (CRP) danas je jedan od standardnih testova koji se koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi, za postavljanje etiologije upale (dijagnoze) i praćenje efikasnosti terapije i prognoze upale. Međutim, uloga CRP-a u različitim fiziološkim procesima nije do kraja istražena (57).

Humani CRP je akutni plazmatski protein kojeg su otkrili William Tillett i Thomas Francis još davne 1930. godine. Naziv je dobio po njegovoj sposobnosti da se taloži i integriše sa fosforilholinskim partikulama C polisaharida, produkta teihoične kiseline unutar ćelijskog zida nekih bakterija, prevashodno *Streptococcus pneumoniae* (58).

CRP je protein akutne faze upale koji pripada porodici proteina pentraksina, stvara se u hepatocitima pod uticajem citokina, u prvom redu IL-6 iz upalnog tkiva te IL-1, a indirektno i faktorom tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ). Referentna vrijednost CRP-a ne razlikuje se kod muškaraca i žena, a zavisi od metodologije njegovog određivanja. Osim jetrene lokacije kao mjesta sinteze CRP-a, nađena su i druga mjesta sa manjom sintezom CRP-a kao npr.: pluća, masno tkivo, neuroni, bubrezi, limfociti, aterosklerotske lezije te glatke mišićne ćelije (59).

Njegova koncentracija u serumu raste kao odgovor na razne infekcije ili povrede tkiva. Važna je komponenta urođenog imuniteta domaćina jer je sposoban da prepozna mnoge strane patogene kao i fosfolipidnu komponentu raznih oštećenih ćelija (60).

Struktura CRP-a je zasnovana na aminokiselinama, tačnije svaka subjedinica CRP je sastavljena od 206 aminokiselina povezanih nekovalentnim vezama (57). Jetreno izlučivanje ovog proteina je u obliku topivog pentomera (pCRP) čiji sastav čini pet identičnih monomernih subjedinica (mCRP). Kada pCRP bude izložen stanjima koja ga odvajaju na mCRP, on se spaja u lipidni kompleks, takozvani biološki aktivni oblik „CRP“ sa snažnim proinformativnim aktivnostima, kakav nije pCRP (61).

Oblik kakav je mCRP koji se luči kao odgovor na inflamatorni stimulans, pravi kompleks sa patogenom, a potom aktivira odbranu u vidu aktivacije komplementa čak i prije nego su se proizveli specifični imunoglobulini M i G (IgM ili IgG) (57).

Sistem komplementa sastoji se od 35 plazmatskih proteina, a svaki od njih ima važnu ulogu u odbrani domaćina od različitih mikroorganizama. Proteinska kaskada se aktivira u cilju postizanja vezivanja površine mikroba za imunski sistem, te kao kompleksi budu podvrgnuti fagocitozi (62).

Dokazi pokazuju da pCRP ima veću anti-inflamatornu aktivnost u odnosu na mCRP, jer aktivira klasični put sistema komplementa, pospješuje fagocitozu i utiče na apoptozu ćelija. S druge strane, mCRP pospješuje hemotaksiju i mobilizaciju cirkulirajućih leukocita u područja upale te na taj način može odgoditi apoptozu (63).

Zdravi ljudi imaju plazmatski CRP u tragovima, vrijednosti od 1 do 5 mg/L, samtraju normalnim varijacijama, a njegov poluživot u plazmi je oko 19 sati. Vrijednosti CRP-a se počinju povećavati 4-6 sati nakon početnog oštećenja tkiva ili infekcije, sa trendom daljeg povećavanja (64).

U različitim bakterijskim infekcijama, nekrozi tkiva, parazitemiji, malignoj neoplaziji kao i različitim upalnim stanjima, serumski nivo CRP-a se može povećati za oko 100 puta unutar 48 sati. Stanja kao što su hronične infekcije ili reumatske bolesti, serumski CRP može imati trajno visoke vrijednosti. Terapijskim ili spontanom smirivanjem upalnog procesa ili stanja koje je dovelo do njegovog povišenja, vrijednosti CRP-a se vraćaju na normalnu, početnu vrijednost (60). Vrijednosti CRP-a se ne mogu normalizovati specifičnim lijekovima, nego je normalizacija moguća liječenjem osnovnog stanja koje je uzrokovalo njegovu elevaciju (63).

Uočene su neznčajne razlike u nivou CRP-a između starijih i mlađih osoba, odnosno mogu se detektovati povišene vrijednosti CRP-a kod starijih osoba. Odlika CRP-a kao visoko senzitivnog markera inflamacije ipak ima malu specifičnost. Diskretno povećana koncentracija može sugerisati na niski stepen inflamacije ili se može naći kod gojaznih osoba, pušača, dijabetičara, pacijenata sa hipertenzijom i drugim oboljenjima. Povišene vrijednosti se mogu detektovati i u nekim hroničnim stanjima kao što su reumatske i kardiovaskularne bolesti te maligna oboljenja (65, 66).

Mnoge studije su našle vezu između CRP-a i kardiovaskularnog rizika kakav je aterosklerotski plak (66). Istraživanjima je uočeno da kod osoba sa rizikom od kardiovaskularnih bolesti, kao što su gojazne osobe, masno tkivo se detektovalo kao značajan endokrini organ. Unutar masnog tkiva se oslobađaju proinflamatorni citokini kao što su IL-1 $\beta$  i IL-6 (67).

Hiperplazija adipocita dovodi do hipoksije usljed povećanog skladištenja lipida, a posljedično i proinflamatorne sekrecije adipokina. Odgovor u smislu povećane produkcije CRP-a predstavlja vezu između gojaznosti i upale (66). Istraživanja su pokazala da mCRP oblik koji je vezan za LDL predstavlja vrlo važan biološki marker u aterosklerozi (68).

Kliničke studije su do sada pokazale značaj CRP-a u akutnim upalama. Međutim, uloga ovog markera je još kontraverzna kada se govori o hroničnim stanjima, da li je proinflamatoran marker ili protuupalan. Opisane partikule p i m CRP se ne detektuju klasičnim kliničkim i laboratorijskim ispitivanjima, tako da su i rijetke studije koje su ispitivale njihov značaj (62).



Dosadašnje studije su pokazale da povišen nivo CRP-a u plazmi predstavlja pouzdan i nezavisan pokazatelj rizika za nastanak infarkta miokarda, cerebrovaskularnog inzulta, periferne vaskularne bolesti, srčane insuficijencije, atrijalne fibrilacije i drugih kardiovaskularnih oboljenja (69, 70).

Stanja koja imaju jednosmjerni ili dvosmjerni odnos prema inflamaciji, kao što su pušenje, depresivna stanja ili psihosocijalni stres, također mogu imati povišene vrijednosti CRP-a. (71).

Metabolički sindrom je takođe bolest u kojem se mogu detektovati povišene vrijednosti ovog markera (72).

### **1.8.1. CRP i infekcija**

Istraživanja su pokazala da je CRP snažan upalni marker koji se detektuje kao prvi u nizu nakon početka upalnog dešavanja, a sintetiše se biosintezom u jetri posredstvom IL-6 (73). Koncentracija CRP-a se povećava u cirkulaciji tokom upalnog procesa, a deponuje se na mjestima upale i oštećenja tkiva (74). Vrijednost povećanja CRP-a je bitna kod određivanja etiologije infekta, kada je veća od 100 mg/l ukazuje na bakterijsku infekciju, dok vrijednost ispod 10 mg/l sugeriše virusnu upalu. Tuberkuloza i neke atipične infekcije mogu imati vrijednost CRP-a između 10 i 100 mg/l (57). Brza detekcija bakterijske infekcije u febrilnosti je od izuzetnog značaja kako bi se obezbijedilo uzročno liječenje i izbjegao nepotrební antibiotski tretman. C-reaktivni protein je jedan u nizu alata koji pomažu u razlikovanju bakterijskog od virusnog ili aseptičnog procesa, uz leukocite, prokalcitonin, serumski amiloid, fibrinogen, ferritin, mikrobiološke kulture i druge markere (75).

### **1.8.2. CRP i kardiovaskularni rizik**

Povezanost između povišenih vrijednosti CRP-a i akutnog infarkta miokarda, kao i lošije prognoze kod osoba nakon preležanog infarkta, predstavlja bitnu karakteristiku ovog proteina, nezavisnu od drugih markera kardijalne patologije. Nekroza tkiva koja se dešava nakon akutnog infarkta, snažan je stimulus za povećanje CRP-a u plazmi, a njegova visina je odraz stepena nekroze miokarda. Ćelijski i humoralni odgovor koji se pokreće nakon infarkta miokarda ima za cilj smanjenje ćelijske apoptoze i podsticanje lokalnog procesa stvaranja ožiljka (76). Neposredno nakon infarkta miokarda, nakon produkcije citokina u plazmi se povećava koncentracija CRP-a, on se veže za fosfoholinske receptore na nekrotičnim ćelijama miokarda, te dalje podstiče inflamatorni odgovor, oštećenje

miokardijalnih ćelija i napredovanje nekroze (77). Visoke vrijednosti CRP-a često se nalaze kod pacijenata koji boluju od hipertenzije i trenutno se smatraju nezavisnim faktorom rizika za hipertenziju jer mogu pogoršati istu uticajem na vaskularne endotelne ćelije preko sistemskog i lokalnog inflamatornog odgovora. Takođe, CRP može biti pokretač zadebljanja intime medije kao preteče razvoja ateroma, povećava se periferni otpor i brzina protoka krvi koja dovodi do povećanja krvnog pritiska. Osim toga, može dovesti do zadebljanja intime i progresije ateroma, što na kraju dovodi do povećanja perifernog otpora i posljedičnog povećanja krvnog pritiska (78).

### **1.8.3. CRP i HIV infekcija**

Imunska aktivacija posredovana bakterijskim komponentama u krvi ima značajnog uticaja u progresiji HIV bolesti. Bakterije se pojačano umnožavaju i nalaze u krvi kao posljedica dislokacije, najčešće iz gastrointestinalnog trakta. C-reaktivni protein se u povećanoj koncentraciji javlja kao posljedica upalne reakcije na prisutne bakterije, ali i u imunološki posredovanim zbivanjima. Veće koncentracije CRP-a povezane su sa nižim brojem CD4 među HIV-om zaraženim pojedincima. Serumski CRP je detektovan i kao prediktor smrtnosti vezane za HIV i bržu progresiju do AIDS-a (79).

### **1.8.4. CRP i metabolički sindrom**

C-reaktivni protein se intenzivno ispituje u različitim patološkim stanjima koja doprinise poremećaju metabolizma i sve više ima značaja u tim ispitivanjima. Prekomjerna tjelesna masa je postala važan zdravstveni problem u razvijenim zemljama. Gojaznost podrazumijeva i prisustvo niskog stepena hronične upale u masnom tkivu (80). C reaktivni protein se smatra nezavisnim faktorom rizika u odnosu na tradicionalne faktore kao što su povećan ukupni holesterol, dijabetes, hipertenzija, starost, visok indeks tjelesne mase, pušenje i loša fizička kondicija (81).

Mehanizam upalne reakcije kod gojaznih ljudi odnosi se na povećanu sekretornu aktivnost adipokina u adipoznom tkivu. Adipokini imaju značajne pro i antiinflamatorne efekte (82).

Sistemska upala može značajno doprinijeti rastu i progresiji karcinomatoznog procesa (83). C reaktivni protein se intenzivno ispituje kao biomarker za predviđanje rizika od raka, otkrivanje recidiva raka, ishoda terapije i prognoze, obzirom da je bitan indikator imunološkog odgovora na različite vrste malignih bolesti. Značajno mjesto zauzima u predviđanju prognoze kod multiplog mijeloma, melanoma, tumora jajnika, pluća, te

karcinoma gastrointestinalnog trakta, prevashodno jetre (57). Porast vrijednosti CRP-a sve više ima značaj u indeksima za graduiranje nekoliko vrsta kancera, uključujući i hepatocelularni karcinom (84).

Značaj CRP-a u oblasti onkologije nema posebnog značaja za prognostičke pokazatelje kakvi su veličina tumora, broj metastaza ili stepen oštećenja jetre. Međutim, danas se smatra da je prognoza zavisna od ne-tumorskih faktora, misleći prije svega na tumorsko mikrookruženje (85). Istraživanja su pokazala da elevacija CRP-a može predvidjeti razvoj dijabetesa tip 2 zbog mogućnosti upale u procesu dijabetogeneze. C reaktivni protein kao nezavisni faktor praćenja, javlja se skupa sa promjenjivim faktorima koji su detektovani kao loši prediktori u ovoj bolesti: centralna gojaznost, nedostatak fizičke aktivnosti i inzulinemija na tašte, promjenjivo prema polu (57).

Centralna gojaznost je samostalno povezana sa porastom CRP-a kod pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2, i sa prevalencom većom kod žena. Još uvijek nije do kraja izdiferenciran uzročni odnos gojaznosti i CRP-a kod ove patologije. Uočeno je da novodijagnosticiranim pacijentima dijabetesa tipa 2 CRP ima veće vrijednosti u odnosu na starije dobne skupine, što dovodi do opažanja da mlađe osobe imaju jači sistemski odgovor koji je pokretač elevacije CRP-a. (86).

U kontekstu inflamacijskih bolesti, nivo CRP-a predstavlja marker aktivnosti bolesti, može biti za neke više a za neke manje značajan. Direktna korelacija CRP-a je utvrđena za reumatoidni artritis i inflamatornu bolest crijeva (Crohn–ova bolest) (57). Monomerne subjedinice CRP-a (mCRP) na površini apoptotskih ćelijskih fragmenata mogu biti okidač antigena za proizvodnju anti-CRP antitijela kod pacijenata koji pate od sistemskog eritematoznog lupusa. Značajno je da se ova serumska anti-CRP antitijela ne mogu vezati na cirkulirajuću izoformu pCRP. Interakcija tkivno vezanog mCRP-a sa anti-CRP antitijelima u vaskularnom tkivu pogoduje nastanku hronične upale kod pacijenata sa sistemskim lupusom (87).

## 2. FORMULACIJA PROBLEMA

Efektivnom supresijom plazmatske HIV-viremije, kombinacija antiretroviralne terapije (cART) sprječava neprekidno oštećenje imunskog sistema zbog nekontrolisane HIV replikacije i pokreće oporavak imuniteta. Iako su AIDS-definirana stanja danas rijetka kod efektivno tretiranih osoba koje žive sa HIV-om, ne-AIDS-definirane bolesti, poput: kardiovaskularnih oboljenja, bubrežnih oboljenja, kognitivnog propadanja, te malignih oboljenja se sada sa većom učestalošću javljaju u mlađem uzrastu nego kod HIV-neinficiranih pacijenata. Pretpostavlja se da bi imunostarenje i perzistentna aktivacija imuniteta, čak i u kontekstu efektivne kontrole HIV-replikacije, mogli biti patogenetski faktori koji stoje u pozadini ne-AIDS-definiranih komorbiditeta i da bi praćenje markera imunostarenja moglo imati značajnu ulogu u kliničkom vođenju osoba koje žive sa HIV-om (88).

Pacijenti na dugotrajnoj terapiji imaju veću prevalencu ateroskleroze i vaskularne disfunkcije u odnosu na neinficirane osobe iste dobi. Takođe imaju povećan rizik od infarkta miokarda, srčane insuficijencije i drugih vaskularnih bolesti (89).

Osim faktora okoline i toksičnih efekata lijeka, smatra se da perzistentna HIV-om uzrokovana imunoaktivacija i hronična inflamacija imaju uticaj na povećan kardiovaskularni rizik. Dugoročno efektivna ART onemogućava potpunu regeneraciju vaskularnog zdravlja i osobe pod terapijom nastavljaju imati veći rizik od očekivanog za progresiju bolesti. Iako je povećani rizik tokom terapije moguće uzrokovan multiplim faktorima, sve više činjenica ukazuje na to da je hronična inflamacija, koja perzistira i tokom efikasne ART, direktno i uzročno povezana sa vaskularnom disfunkcijom i ubrzanim razvojem ateroskleroze (90).

Jedan od ključnih ciljeva same ART je oporavak odnosa CD4/CD8, za koji se zna da je narušen kod HIV pozitivnih pacijenata, jer bolest prati progresivni gubitak CD4 T-ćelija, uz ekspanziju CD8 T-ćelija, čime se posljedično mijenja i sam CD4/CD8 odnos. Mjerenje broja CD4 je posebno korisno prije početka ART. Broj CD4 ćelija pruža informacije o cjelokupnom imunom sistemu zaraženog HIV bolesnika. Mjerenje ovih vrijednosti u kliničkoj praksi je bitno za uspostavljanje praga za pokretanje terapijske profilakse, prekida tretmana oportunističke infekcije i procjene hitnosti za uključivanje ART. Kod mnogih pacijenata imunska rekonstrukcija nakon ART-a je često kvalitativno i kvantitativno

nekompletna. Iako je CD4 broj najvažniji prediktor kliničke progresije AIDS-a, broj ćelija ne procjenjuje imunu aktivaciju i rizik za nastanak ne-AIDS događaja (91, 92).

Poznato je da je CD4/CD8 odnos dobar pokazatelj imunostarenja uopšteno. Monitoring ovog odnosa tokom primjene ART kod HIV pozitivnih pacijenata moglo bi dati bolju informaciju o stanju imune disfunkcije, a ujedno i dati informaciju o potencijalnim rizicima za nastanak ne-AIDS-definisanih bolesti. (38, 93). Što znači da se povećanje CD4/CD8 odnosa može smatrati optimalnim odgovorom na liječenje. Iako veoma oskudna, ali već postojeća, dosadašnja istraživanja koja su izučavala oporavak CD4/CD8 odnosa kod HIV pozitivnih pacijenata tretiranih ART dala su neusaglašene rezultate (39, 40).

Kakogod, povećanje broja CD4 ćelija i oporavak CD4/CD8 odnosa mogao bi značiti manji rizik za nastanak ne-AIDS povezanih oboljenja, uključujući i kardiovaskularne bolesti, jer je dokazano da održavanje veoma niskog odnosa ( $<0,3$ ) procjenjuje rizik ozbiljne ne-AIDS bolesti ili smrti, nezavisno od broja CD4 ćelija, među ostalim varijablama (8). Pokazano je da je veći broj CD4 ćelija povezan sa manjim procentom ne-AIDS povezanih oboljenja. (94).

U ambulantnoj studiji sa HIV pacijentima se pokazala nezavisna povezanost između broja CD4 ćelija i incidentnih kardiovaskularnih oboljenja, te značajna povezanost sa incidencom akutnog infarkta miokarda kod HIV-pozitivnih pacijenata. (95) Takođe, utvrđeno je da nizak broj CD4 ćelija  $<350\text{mm}^3$  je strogo povezan sa gubitkom elasticiteta u arterijskim zidovima (96).

S druge strane, pokazalo se da povećanje broja CD4 ćelija sa interleukinom 2 nema efekta na morbiditet i mortalitet. (97) Interesantne rezultate predočila je studija Karim i sar. (98) koji su pokazali da aktivacija T-ćelija, čak i nakon ART inicijacije, može doprinijeti strukturnim i/ili funkcionalnim vaskularnim oštećenjima i ubrzati aterogenezu kod HIV pozitivnih pacijenata. Kako god, postoje indikacije da bi se rizik od smrtnosti mogao predvidjeti količnikom CD4/CD8. Implikacije ovih nalaza su vrlo široke. Pojedinci koji imaju normalan omjer mogu imati dobru prognozu, i mogli bi se ne ponašati drugačije od HIV neinficiranih. Individue sa perzistentno niskim odnosom mogu zahtijevati više pažnje. U populaciji ovih pacijenata mora se obratiti pažnja i na ostale prisutne riziko faktore poput: hiperlipidemije, hipertenzije, gojaznosti, nedostatak fizičke aktivnosti i dr. (37).

U novije vrijeme je pokazano da CRP nije samo marker inflamacije, već i to da može biti uključen u patogenezu velikog broja oboljenja, uključujući i kardiovaskularna oboljenja (66). Utvrđeno je da ispoljava direktne proinflamatorne i proaterogene efekte (87, 89). U patogenezi ateroskleroze CRP može doprinosti na način da direktno aktivira sistem komplementa, indukcijom apoptoze, aktiviranjem vaskularnih ćelija, regrutovanjem monocita, akumulacijom lipida, tromboze, i drugim mehanizmima (37).

Pokazano je da potiče endotelne ćelije na ekspresiju adhezionih molekula: intracelularne adhezione molekule-1 (ICAM-1), vaskularne adhezione molekule-1 (VCAM-1), selektina i hemokina, te monocitnog hemotaktičnog proteina-1 (MCP-1). Isto tako potiče u endotelnim ćelijama izlučivanje IL-6 i endotelina 1, te umanjuje ekspresiju i bioraspoloživost endotelne NO sinteze (99). Također, CRP može uticati na produkciju reaktivnih vrsta kiseonika, odnosno, uticati na povećanje nivoa oksidativnog stresa (87).

Vjeruje se da je CRP jači pokazatelj prediviđanja kardiovaskularnih oboljenja od LDL-holesterola. Korištenje metoda određivanja visoko senzitivnog CRP (hs-CRP, eng. high sensitive – visoko senzitivan), dobiveni nivoi hsCRP <1, te od 1 do 3, i iznad 3 mg/dL su odgovarali niskoj, umjerenoj i visokoj rizičnoj grupi prema mogućnosti za nastanak kardiovaskularnih komplikacija. Smatra se da osobe koje imaju vrijednost LDL-holesterola ispod 3,4 mmol/L, a koncentraciju CRP >3 mg/dL čine grupu koja ima visok rizik za nastanak kardiovaskularnih komplikacija. (100) Veliki broj dosadašnjih studija je pokazao da povećana koncentracija CRP povećava rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja poput: infarkta miokarda, moždanog udara, periferne vaskularne bolesti, iznenadne srčane smrti (69, 70, 76, 101).

Povećan nivo CRP koji se javlja poslije infarkta miokarda snažno korelira sa postinfarktним morbiditetom i mortalitetom. (101) Uočeno je da se CRP lokalizuje u blizini terminalnog kompleksa komplementa u intimi ranih aterosklerotičnih lezija, što je dovelo do pretpostavke da CRP aktivira komplement i da aktivacija komplementa implicira u razvoju aterosklerotskog plaka (76). Pokazano je da perzistentno povišen nivo CRP u humanoј populaciji je u korelaciji sa razvojem hipertenzije (101).

Kod HIV inficiranih pacijenata, bez obzira na primjenu antiretrovirusnih lijekova, utvrđeno je da CRP ima jaku pozitivnu korelaciju sa zadebljanjem intime medije karotide, te da je u jakoj korelaciji sa smrtnim ishodom kod ovih pacijenata. Autori sugerišu da CRP može

poslužiti kao marker hronične upale i nepovoljnih ishoda kod HIV-pozitivnih bolesnika (102).

U SMART studiji, pronađeno je da su povišeni nivoi IL-6, hs-CRP i nivoi D-dimera povezani sa rizikom za nastanak kardiovaskularnih oboljenja kod HIV-pozitivnih bolesnika, iako je povezanost bila izražajnije sa smrtnim ishodom, nego sa rizikom za nastanak kardiovaskularnih oboljenja (103). Nordell i sar. (104) su pokazali da IL-6 i D-dimer, imaju jaku i pozitivnu korelaciju sa mogućnošću nastanka kardiovaskularnih oboljenja, ali ne i CRP.

### **3. DEFINICIJA PROBLEMA**

Glavni faktor koji utiče na prognozu HIV pacijenta je pojava ne-AIDS bolesti, poput bolesti jetre, kardiovaskularnih bolesti, renalnih bolesti i karcinoma. Da li pacijenti sa HIV-om imaju veću učestalost tih događaja i u kakvom su potencijalnom riziku za nastanak istih, u odnosu na populaciju bez HIV-a, ostaje još uvijek nedovoljno ispitano. Pronalazak pouzdanog markera koji bi mogao predvidjeti rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti mnogo bi značilo kako za pacijente tako i za ljekare koji liječe HIV inficirane pacijente. Postavlja se pitanje u kojoj mjeri CD4/CD8 odnos i nivo CRP u dvogodišnjem praćenju HIV pozitivnih bolesnika tretiranih ART može predvidjeti rizik za nastanak kardiovaskularnih oboljenja.



#### 4. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

- **H<sub>10</sub>:** CD4/CD8 količnik nije značajan prediktor u praćenju promjena kardiovaskularnog rizika kod HIV pozitivnih pacijenata tokom dvije godine cART terapije.
- **H<sub>1A</sub>:** CD4/CD8 količnik je značajan prediktor u praćenju promjena kardiovaskularnog rizika kod HIV pozitivnih pacijenata tokom dvije godine cART terapije.
- **H<sub>20</sub>:** CRP nije značajan prediktor u praćenju promjena kardiovaskularnog rizika kod HIV pozitivnih pacijenata tokom dvije godine cART terapije.
- **H<sub>2A</sub>:** CRP je značajan prediktor u praćenju promjena kardiovaskularnog rizika kod HIV pozitivnih pacijenata tokom dvije godine cART terapije.

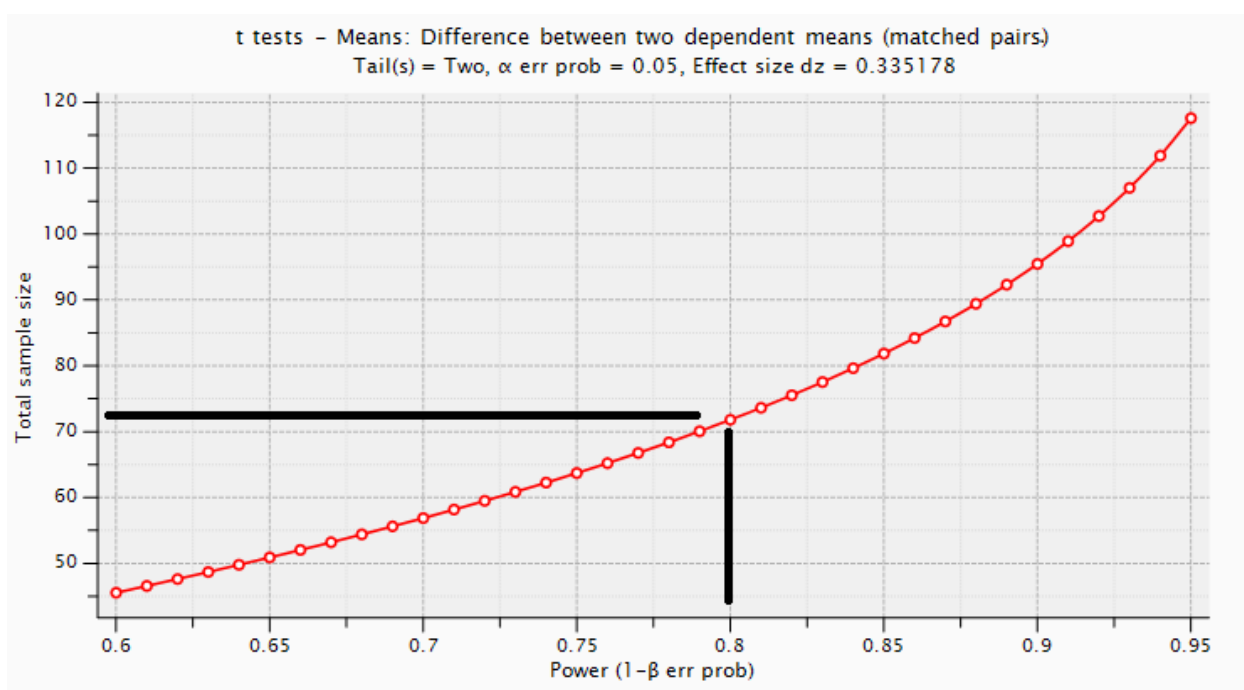
## 5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Analizirati trend promjena CD4/CD8 odnosa u svakoj vremenskoj tački: bazično prije otpočinjanja liječenja, potom nakon 3.,6.,12.,18., i 24. mjeseca cART-terapije.
- Analizirati trend promjena CRP-a u svakoj vremenskoj tački: bazično prije otpočinjanja liječenja, potom nakon 3.,6.,12.,18., i 24. mjeseca cART-terapije.
- Ispitati da li postoji povezanost promjene CD4/CD8 odnosa i CRP-a tokom dvije godine cART-terapije.
- Analizirati trend promjena kardiovaskularnog rizika u svakoj vremenskoj tački: bazično prije otpočinjanja liječenja, potom nakon 3.,6.,12.,18., i 24. mjeseca cART-terapije.
- Analizirati trend promjena nespecifičnih upalnih parametara (broj leukocita, vrijednosti neutrofila, limfocita, monocita, sedimentacije eritrocita) u svakoj vremenskoj tački: bazično prije otpočinjanja liječenja, potom nakon 3.,6.,12.,18., i 24. mjeseca cART-terapije.
- Analizirati trend promjena parametara krvne slike (broj eritrocita, vrijednost hematokrita, koncentracija hemoglobina u krvi) u svakoj vremenskoj tački: bazično prije otpočinjanja liječenja, potom nakon 3.,6.,12.,18., i 24. mjeseca cART-terapije.
- Analizirati trend promjena lipidnih parametara u krvi (ukupni holesterol, trigliceridi, LDL-holesterol, HDL-holesterol, aterogeni indeks) i ITMu svakoj vremenskoj tački: bazično prije otpočinjanja liječenja, potom nakon 3.,6.,12.,18., i 24. mjeseca cART-terapije.

## 6. ISPITANICI I METOD RADA

### 6.1. Ispitanici

Studija je dizajnirana kao retrospektivno-prospektivna, kohortna, longitudinalna i klinička studija. Veličina uzorka određena je pomoću softvera G-power, isti je besplatan i dostupan za široku upotrebu (Slika.3). Minimalan uzorak od 72 ispitanika ispunio je uslove:  $\alpha=0,05$ , snaga studije  $(1-\beta)=0,8$  i veličinu efekta  $=0,3351$  (prosječan terapijski efekat povećanja CD4/CD8 odnosa 1 godinu nakon primjene cART).



Slika 3. Proračun reprezentativnog uzorka za studiju pomoću softvera (G-power 3.1 manual)

Cjelokupno istraživanje je bazirano na prikupljanju podataka iz istorija bolesti sa Klinike za infektivne bolesti Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu (KCUS). Iz istorija bolesti HIV pozitivnih pacijenata uzimani su podaci o starosti, polu, pušačkom statusu, tjelesnoj masi i visini, vrijednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, vrijednosti CD4 i CD8, CRP, ukupnog holesterola, triglicerida i HDL-holesterola, podaci o komorbiditetu-diabetes mellitus, porodična opterećenost kardiovaskularnim oboljenjima, podaci o antiretrovirusnoj terapiji i dužini njene primjene, te zbunjujuće varijable (broj eritrocita, broj leukocita,

vrijednost hematokrita, hemoglobina, vrijednost triglicerida, LDL-holesterola i glukoze u krvi).

### **Kriteriji za uključivanja u studiju**

U studiju su uključeni HIV pozitivni ispitanici liječeni na Klinici za infektivne bolesti KCU Sarajevo retrospektivno u periodu od 2005. do 2015. godine i prospektivno u periodu 2015. do 2017. godine, oba pola, starosti 18-65 godina, koji prethodno nisu liječeni antiretrovirusnom terapijom.

### **Kriteriji za isključivanje iz studije**

Iz studije su isključeni ispitanici koji su u anamnestičkim podacima naveli da su prije terapije imali kardiovaskularni incident, također ispitanici sa anginom pektoris, implantiranim PACE MAKER-om, vještačkom valvulom ili drugim hirurškim intervencijama vezanim za kardiovaskularni sistem, inflamatorna i maligna oboljenja. Pacijenti koji su umrli sa manifestnom AIDS bolešću, ili nekom drugom bolešću u periodu kraćem od 2 godine nakon uključivanja terapije, bili su isključeni iz studije.

## **6.2. Metod rada**

### **Procjena kardiovaskularnog rizika**

S obzirom na to da postoji veći broj algoritama i jednačina u procjeni kardiovaskularnog rizika za opštu populaciju kako bi pomogli kliničarima u kliničkoj evaluaciji pacijenata, isti mogu neprecizno predstavljati rizik kod HIV-inficiranih pacijenata. Kod HIV-inficiranih pacijenata prednost za procjenu kardiovaskularnog rizika daje se D:A:D jednačini u odnosu na jednačine kao što su Framingham skor i PROCAM. (105, 106)

Stoga smo se odlučili za D:A:D kalkulator (107) koji je besplatan i dostupan na web stranici:

<http://hivpv.org/Home/Tools/tabid/91/ctl/ExamView/mid/500/aid/0/lid/0/Default.aspx>

### **Tjelesna visina**

Tjelesna visina ispitanika mjerila se antropometrom koji se sastojao od jedne vertikalne metalne šipke sa skalom, na kome je bio pokretan horizontalni krak. Ispitanici su mjereni tako što su stajali na vodoravnoj podlozi bosu sa sastavljenim petama i malo rastavljenim

prstima, tijelom i potiljkom naslonjenim na mjernu skalu. Istraživač je stajao iza leđa osobe koju mjeri, držao lijevom rukom vertikalnu šipku, a desnom horizontalni krak antropometra. Pokretnim krakom antropometra doticao je tjeme ispitanika i očitavao visinu.

### **Tjelesna masa**

Tjelesna masa ispitanika mjerena je medicinskom decimalnom vagom, koja je prethodno baždarena. Ispitanici su mjereni u donjem i gornjem vešu. Ispitanik bi stao na vagu, ne pomjerajući se dok traje mjerenje i očitavanje tjelesne težine.

### **Izračunavanje indeksa tjelesne mase**

Indeks tjelesne mase (ITM) odnosno BMI (engl. Body Mass Index) je izračunat po formuli:

$$BMI = \frac{TM}{TV^2}$$

- TM – tjelesna masa (kg)
- TV – tjelesna visina (m)

Prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) vrijednost ITM su:

ITM:  $\leq 18,5$  – pothranjenost

ITM: 18,5 - 24,9 – normalna tjelesna težina

ITM: 25,0 - 29,9 – prekomjerna tjelesna težina

ITM: 30,0 - 39,9 – gojaznost

ITM:  $\geq 40$  – prekomjerna gojaznost

### **Mjerenje sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska**

Mjerenje vrijednosti arterijskog krvnog pritiska vršeno je na nadlaktici lijeve ruke standardnom auskultatornom metodom po Korotkovu uz korištenje živinog manometra. Ispitanici su prije mjerenja proveli pet minuta sjedećoj poziciji. Vrijednosti krvnog pritiska su bile izražene u mmHg.

### **Auskultatorna metoda po Korotkovu**

Indirektna auskultatorna metoda mjerenja krvnog pritiska se bazira na pojavi Korotkovljevih zvukova koji nastaju kao posljedica turbulentnog toka krvi kroz djelimično komprimiranu arteriju.

Ispitanik sjedi, a ruka na kojoj se vrši mjerenje i tlakomjer se postavljaju u nivou srca. Manžetna aparata za mjerenje krvnog pritiska se postavi oko nadlaktice i pričvrsti tako da donji rub manžetne bude oko 2 cm iznad pregiba u lakatnoj jami. Stetoskop se postavi u lakatnoj jami iznad mjesta gdje se najbolje osjete pulsacije a.cubitalis.

Zatvori se ventil na gumenoj pumpici i pritiskanjem pumpice upuhava se zrak u manžetnu i istovremeno se vrši auskultacija u području a.cubitalis. Kada pritisak u manžetni postane viši od dijastolnog pritiska pojavljuju se prvi zvučni fenomeni (Korotkovljevi šumovi ili tonovi) koji se čuju sve dok pritisak u manžetni ne postane viši od sistolnog pritiska. Otvaranjem ispusnog ventila na gumenoj pumpici, polako se ispušta zrak iz manžetne (brzinom od 2-3 mm u sekundi). U momentu kada pritisak u manžetni postane niži od vrijednosti sistolnog pritiska u brahijalnoj arteriji čuju se šumovi (Korotkovljevi šumovi). Kada se pojavi prvi šum, na skali manometra očita se vrijednost pritiska koji odgovara sistolnom krvnom pritisku.

Ako i dalje smanjujemo pritisak u manžetni, šumovi postaju prigušeni i potom sasvim nestaju (proticanje krvi ponovo poprima laminaran tok). U trenutku kad se Korotkovljevi šumovi naglo promijene, to jeste kad jasni i glasni šumovi postanu prigušeni, izmjereni pritisak odgovara dijastolnom arterijskom krvnom pritisku. Kada se a.cubitalis potpuno dekomprimira i tok krvi ponovo postane laminaran, tonovi se gube.

## **Laboratorijske analize**

### **Imunofenotipizacija limfocita**

Populacije i subpopulacije limfocita određene su pomoću monoklonalnih antitijela na površinske markere metodom protočne citometrije (imuno-fenotipizacija). Ova metoda omogućava preciznu, objektivnu i brzu enumeraciju velikog broja ćelija istovremeno obilježenih sa više fluorohromima konjugiranih monoklonalnih antitijela. Prilikom obilježavanja limfocita, korištena je četverokolorna kombinacija monoklonih antitijela koja su konjugirana FITC-om (florescin-izotiocijanat), PE-om (fikoeritrin), PerCP-om (peridinin-hlorofil) i APC-om (alofikocianin). Na ovaj način omogućen je detaljan uvid u imunološke osobine pojedinih subpopulacija limfocita.

U radu su korištene slijedeće kombinacije monoklonalnih antitijela koja su obilježena fluorescentnim bojama:

**T1: CD3FITC/CD8PE/CD45PerCP/CD4APC**

**T2: CD3FITC/CD16+56PE/CD45PerCP/CD19APC**

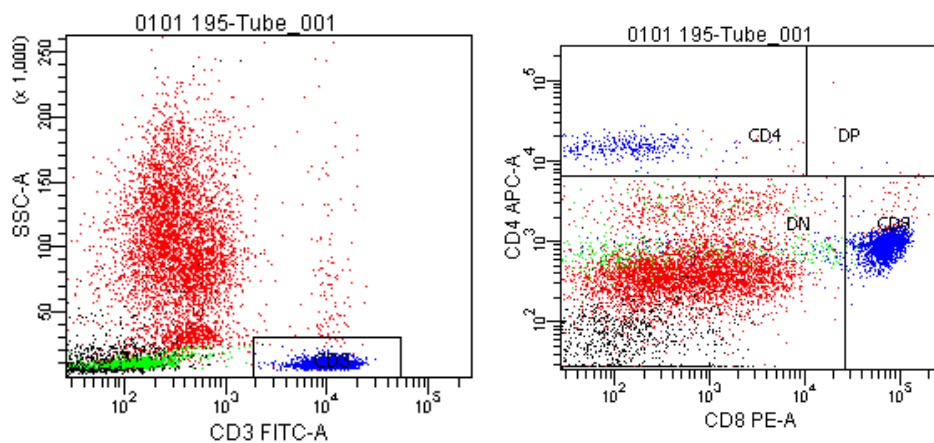
Imunofenotipizacija ćelija se provodila standardnim postupkom pripreme uzorka za površno i intracelularno markiranje. U polustirenske epruvete (T1-T2) je dodano 100 µL pune krvi prethodno pipetiranim antitijelima, kojima obilježavamo markere na površini ćelije (po 10 µL konjugiranog monoklalnog antitijela).

Proizvođači korištenih reagenasa su: BD Bioscience (San Jose, CA, USA) i BD Pharmigen (San Diego, CA, SAD). Nakon inkubacije od 15-30 minuta na sobnoj temperaturi, ćelije su lizirane dodavanjem 2 mL FACS Lysing Solution, te inkubirane 10 minuta na tamnom mjestu i temperaturi 20-25°C. Ćelije su nataložene na dno epruvete procesom centrifugiranja u trajanju od 5 minuta brzinom 1500 RPM (obrta u minuti). Uslijedio je proces dvostrukog ispiranja ćelija u 2-3 mL PBS-a, a zatim su ćelije resuspendirane u 0,5 mL PBS-a i analizirane na protočnom citometru BD FACS Canto II (BD Bioscience; San Jose, CA, USA).

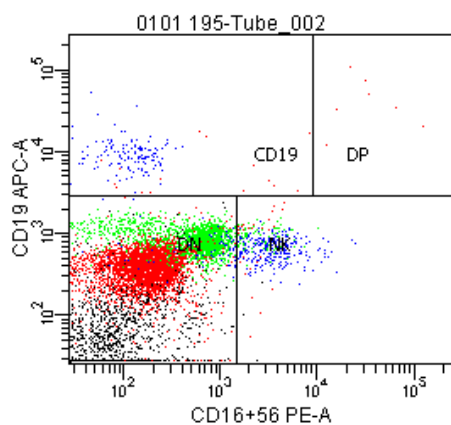
U analiziranom uzorku limfociti su se definisali postupkom ograđivanja (gate) na temelju veličine i granularnosti ćelija (FSC vs. SSC). Zatim smo odredili limfocitne subpopulacije prema fluorescenciji na dvo-parametrijskim histogramima. U svakom uzorku je analizirano 10.000 ćelija, a rezultati su izraženi kao postoci (udio) ispitivanih ćelija u pojedinoj subpopulaciji limfocita. Multiparametrijsko određivanje omogućilo nam je diferencijaciju T limfocita (CD4 i CD8) (slika 1), non-T limfocita (CD19 i NK ćelije) (slika 2). Ćelijske subpopulacije analizirane su u DIVA programu, verzija 6.1.3 (DB Bioscience; San Jose, CA, USA).

Relativne vrijednosti su izražene kao procenti (%) pozitivnih ćelija za svaki parametar u odnosu na ukupan broj limfocita. Apsolutan broj pojedinih subpopulacija (broj ćelija na 1 ml krvi) određuje se na osnovu apsolutnog broja limfocita, izračunat na osnovu broja leukocita u krvnoj slici bolesnika, i procenta limfocita, u leukocitarnoj formuli, te pomnoži relativnim brojem određene subpopulacije:

$$\text{WBC} \times (\text{Lym}/100) \times (\% \text{ pozitivnih ćelija} / 100)$$



Slika 2. Diferencijacija T limfocita (CD3) na subpopulacije T pomoćnih ćelija CD4 i citotoksičnih T limfocita (CD8) kod HIV pozitivnih pacijenata



Slika 3. Histogram prezentira CD16<sup>+</sup>56 i CD19 ćelije.



### **Određivanje koncentracije CRP u serumu**

Koncentracija CRP u serumu ispitanika određena je laser nefelometrijom (aparatus BN II analizator) na Institutu za kliničku hemiju i biohemiju KCUS. Kao reagens za ovu metodu korišten je CardioPhase hs CRP (DADE BEHRING) koji se sastoji od polistirenskih čestica obloženih mišjim monoklonalnim antitijelima na CRP. Princip metode bazira se na agregaciji polistirenskih čestica obloženih sa monoklonalnim antitijelima specifičnim na ljudski CRP kada se pomiješaju sa uzorcima koji sadrže CRP. Nastali agregati raspršuju svjetlosni zrak koji prolazi kroz uzorak. Intenzitet raspršenog svjetla je proporcionalan koncentraciji relevantnog proteina u uzorku. Rezultat se procjenjuje usporedbom sa standardom poznate koncentracije. Kao referentne vrijednosti CRP u serumu korištenjem ove metode uzimaju se vrijednosti od 0 do 5 mg/L.

### **Lipidogram**

Svim ispitanicima su upotrebom standardnih metoda urađene slijedeće laboratorijske pretrage: trigliceridi, ukupni holesterol, LDL-holesterol, HDL-holesterol.

Referentne vrijednosti za trigliceride, ukupni holesterol, LDL-holesterol, HDL-holesterol (prema uputama proizvođača) su: Trigliceridi, 0,11 – 1,70 mmol/L; Ukupni holesterol, 3,1 – 5,2 mmol/L; LDL-holesterol, 1,4 – 4,5 mmol/L; HDL-holesterol 1,04 – 1,55 mol/L

### **Nespecifični parametri upale**

#### **Određivanje brzine taloženja eritrocita (SE).**

Brzina SE je izvršena prema Westergreen metodi na Institutu za kliničku hemiju i biohemiju KCUS, a 3.8% i 0.18 mmol/l rastvor Na-citrata je korišten kao antikoagulant. Vrijednosti brzine SE su očitane nakon 1 i 2 sata (h). Izraženi su u milimetrima (mm) bistre plazme preko sloja istaloženih eritrocita.

SE vrijednosti za muškarce su 3-8mm / 1h; 15mm / 90mm / 24h, a za žene od 4-12mm /1h; 20mm /2h; 110 mm/24h.

#### **Određivanje broja leukocita**

Broj leukocita je određen iz uzorka pune krvi na automatskom hematološkom brojaču na osnovu principa volumetrijske impedancije, protočne citometrije i fotometrije na Institutu za kliničku hemiju i biokemiju KCUS. U hematološkoj laboratoriji koristi se nova

generacija automatskih brojača: Sysmex XE-2100 (5-DIF), Sysmex KX-21N (3DIF) i ABBOTT-CELL-DYN 3700 (5DIF). Normalni vrijednosti leukocita su  $4-10 \times 10^9 / l$ . Od toga, neutrofilni granulociti čine 40-70%, monociti 1-10%, eozinofilni granulociti 0-6%, limfociti 20-50%, bazofilni granulociti 0-1%.

### **Parametri krvne slike**

Broj eritrocita, vrijednost hematokrita i koncentracija hemoglobina određeni su iz punog uzorka krvi na automatskom hematološkom brojaču.

Normalne vrijednosti broja eritrocita su od  $3,86 \times 10^{12}/l$  do  $5,08 \times 10^{12}/l$  za žene i od  $4,34 \times 10^{12}/l$  do  $5,72 \times 10^{12}/l$  za muškarce.

Normalne vrijednosti hematokrita za žene su 0,35 - 0,47, a kod muškaraca 0,41 - 0,53.

Normalne vrijednosti hemoglobina za žene su 120-160 g/l, a kod muškaraca 140-180 g/l.

### 6.3. Statistička obrada podataka

Po završetku ispitivanja izvršena je statistička obrada podataka. Za statističku analizu dobijenih podataka korišten je programski paket SPSS for Windows (verzija 19.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois, SAD) i Microsoft Excell (verzija 11. Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD).

Za utvrđivanje distribucije kontinualnih varijabli korišten je Kolmogorov-Smirnov test (za uzorak veći od 50 ispitanika). Kod varijabli koje nisu pokazale statistički značajno odstupanje od normalne raspodjele, prosječne vrijednosti prikazali smo kao aritmetičke sredine i standardne devijacije (SD), a za poređenje tih varijabli prema referentnim vrijednostima i ponovljenim mjerenjima, kao i trendove promjena korišteni su parametrijski testovi (jedno uzorački t-test i uparne t-test). Varijable koje su pokazale statistički značajno odstupanje od normalne raspodjele, predstavili smo medianom i interkvartilnim rasponom (25ti-75-ti pecentil), a za njihovo poređenje prema referentnim vrijednostima, ponovljena mjerenja i trendove promjena koristili smo neparametrijske testove (Wilcoxon test rangova, Friedman Test-ponovljenih mjerenja). Postojanje veze (korelacija), njen smjer i jačinu medju kontinualnim varijablama odredili smo testom korelacije po Spearman-u ( $\rho$ ).

Modelom standardne regresione analize ispitaivani su nezavisni prediktori za praćenje vjerovatnoće (% rizika) razvoja petogodišnje kardiovaskularne bolesti (KVB). Rizik (%) smo računali koristeći besplatni D:A:D kalkulator dostupan na internet stranici (107).

ROC krivom smo pokazali da li CRP i CD4/CD8 količnik (odnos), mogu biti markeri za rizik KVB koji je praćen u različitim periodima, bazično, i nakon 3, 6,12,18,24 mjeseca. Statističku značajnost regresionog modela provjerili smo ANOVA testom, a vrijednost modela ( $r^2$ ) prikazali kao % varijanse. Na osnovu Youndenovog indeksa odredili smo optimalni presjek (*engl.* cut off.) za svaku varijablu, a potom senzitivnost i specifičnost iste.

Za granicu statističke značajnosti uzeta je vrijednost  $\alpha=0,05$ . Odluke o prihvatanju ili odbacivanju hipoteza u odgovarajućim testovima donosila se prema  $p$  vrijednsoti statističkog testa ( $p \geq \alpha$  hipoteza se prihvata,  $p < \alpha$  hipoteza se odbacuje).

Rezultati su detaljno razrađeni i dokumentirani, prezentirani apsolutnim brojevima, relativnim brojevima, statističkim vrijednostima uz korištenje statističkih pokazatelja, a prikazani jednostavnim i razumljivim tabelama i grafikonima.

## 7. REZULTATI RADA

Istraživanje je sprovedeno na Klinici za infektivne bolesti Kliničkog centra Univerziteta u Sarajevu, retrospektivno u periodu 2008-2015. godine i prospektivno 2015-2017. godine.

### 7.1. Opšte karakteristike uzorka.

U istraživanje je uključeno 76 HIV inficiranih ispitanika, 67 (88,2%) muškaraca i 9 (11,8%) žena. Ispitanici su prosječne starosti  $35,2 \pm 8,7$  godina, najmlađi ispitanik imao je 18, a najstariji 57 godina. Ostale karakteristike HIV ispitanika predstavljene su u Tabeli 8.,9.i 10.

Tabela 4. Opšte karakteristike HIV ispitanika, bazično, prije početka terapije

Varijable		n	%
Pol	Muški	67	88,2
	Ženski	9	11,8
Navike pušenje duhana	Da	47	61,8
	Ne	29	38,2
Biviši pušač duhana	Da	28	36,8
	Ne	48	63,2
Pozitivna anamneza za KVB	Da	51	67,1
	Ne	25	32,9
		Ar.sred	$\pm$ SD
Starost (godine)	Muški	35,00	8,8
	Ženski	36,33	8,4
Visina (cm)	Muški	182,58	5,95
	Ženski	167,22	6,85
Tjelesna težina (Kg)	Muški	79,96	10,79
	Ženski	63,44	11,68
ITM	Muški	24,02	2,79
	Ženski	22,57	3,06
Sistolni pritisak mmHg	Muški	121,31	12,00
	Ženski	123,33	9,68
Dijastolni pritisak mmHg	Muški	79,55	8,34
	Ženski	80,56	6,82

n-apsolutni broj, %- procenat od ukupnog broja ispitanika (N=76);

Ar.sred.- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija

Pušači su zastupljeniji od nepušača u odnosu 47(61,8%) naprema 29(32,8%). Pozitivnu porodičnu anamnezu za KVB prijavilo je 51(67,1%) ispitanika, naspram 25(32,9%) koji istu nisu naveli u istoriji bolesti. Razlike u starosti ispitanika u odnosu na pol nije značajna, muškarci su u prosjeku nešto mlađi ( $35,0 \pm 8,8$  godina), od ženskih HIV pozitivnih

ispitnaika ( $36,33 \pm 8,4$  godine). Indeks tjelesne mase (ITM) za muške HIV ispitanike u prosjeku je iznosio  $24,02 \pm 2,79$ , a za ženske HIV ispitanike  $22,57 \pm 3,06$ . Sistolni pritisak kod muškaraca iznosio je u prosjeku  $121,31 \pm 12$  mmHg, a kod žena  $123,33 \pm 9,68$  mmHg. Dijastolni pritisak kod muškaraca iznosio je u prosjeku  $79,55 \pm 8,34$  mmHg, a kod žena  $80,56 \pm 6,8$  mmHg.

Tabela 5. Opšte karakteristike HIV infekcije, bazično, prije početka ART

Varijabla	N	Percentili		
		25ti	50ti (Mediana)	75ti
CD4(cel/mm <sup>3</sup> )	76	70,00	185,00	342,00
CD4 (%)	76	6,55	12,55	21,93
CD8(cel/mm <sup>3</sup> )	76	334,96	753,11	1278,35
CD8 (%)	76	50,53	57,85	66,40
CD4/CD8 odnos	76	0,11	0,21	0,39
PCRRNA HIV(cop/ml)	76	34131,00	184000,0	525321,5

Apsolutni broj CD4 limfocita prije početka terapije kretao se u prosjeku (medijana) 185 cel/ml odnosno između 70-342 cel/ml. Procentulani udio (CD4%) prije početka terapije iznosio je u prosjeku 12,55%, odnosno između 6,5-21,9%. Apsolutni broj CD8 limfocita prije početka terapije kretao se u prosjeku (medijana) 753,11 cel/mm<sup>3</sup> odnosno između 334-1278 cel/mm<sup>3</sup>. Procentulani udio (CD8%) prije početka terapije iznosio je u prosjeku 57,8 %, odnosno između 50,5 – 66,4%. Odnos CD4/CD8 prije terapije kretao se u prosjeku 0,21, odnosno između 0,11-0,39. Prosječna viremija prije terapije iznosila je 184000,0 cop/ml, a kretala se u interkvartilnom rasponu 31131,0-525321,5 cop/ml.

Tabela 6. Broj i procenat ispitanika prema terapijskom režimu (cART)

	3mj.		6 mj.		12 mj.		18 mj.		24 mj	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Kombinovana antiretrovirusna terapija (cART)										
NNRTIs+NRTI	27	35,5	27	35,5	27	35,5	23	30,3	23	30,3
PI+NRTI	49	64,5	49	64,5	49	64,5	53	69,7	53	69,7
Total	76	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	76	100,0	76	100,0

cART- *engl.* combined antiretroviral therapy, NNRTIs – *engl.* Non-nucleoside reverse transcription inhibitors, NRTI – *engl.* nucleoside reverse transcription inhibitors, PI – *engl.* Protease inhibitors; mj.-mjesec

U tabeli je prikazan apsolutni broj i procentualni udio ispitanika na kombinovanoj antiretrovirusnoj terapiji (*engl.* cART-combination antiretroviral therapy).

Broj ispitanika na terapiji PI+NRTI je u startu je veći 49 (64,5%) u odnosu na ispitanike na terapiji NNRTIs+NRTI 27(35,5%). Ovakav odnos se zadržao do 18 mjeseci, potom se povećao broj ispitanika sa kombinacijom PI+NRTI na 53(69,7%) i takav odnos se zadržao do 24 mjeseca.

## 7.2. Analize prediktora na razvoj rizika za KVB, bazično i tokom cART.

Standardnom regresionom analizom ispitivan je uticaj nezavisnih prediktora (starosti, pola, navika pušenja, familijarna anameza za KVB, ITM, sistolnog i dijasolnog pritiska, holesterola, triglicerida, HDL-a, ŠUK-a, CRP-a, CD4 i CD4/CD8) na zavisno promjenljivu rizik za KVB, **bazično**-prije početka ART.

Tabela 7. Uticaj nezavish prediktora na rizikza KVB, bazično, prije početka cART

Model	Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent		
	B	St.greška	Beta	p	
<b>1</b>	(Constant)	-3,304	1,061		,003
	Starost (godine)	0,107	0,221	0,046	,630
	Pol (m/ž)	0,396	0,140	0,257	,006
	Navike pušenja (da/ne)	0,396	0,140	0,056	,584
	Pozitivna anamenza za KVB (da/ne)	0,056	0,025	0,210	,030
	ITM	0,015	0,009	0,227	,110
	Sistolni pritisak (mmHg)	-0,004	0,012	-0,045	,721
	Diastolni pritisak (mmHg)	0,012	0,083	0,015	,882
	Holesterol (mmol/l)	-0,088	0,242	-0,035	,716
	HDL (mmol/l)	0,014	0,063	0,022	,820
	Trigliceridi (mmol/l)	-0,027	0,098	-0,026	,785
	ŠUK(mmol/l)	-0,040	0,030	-0,128	,184
	CRP (mg/l)	0,0001	0,0001	-0,037	,780
	CD4 cel/mm3	-0,149	0,405	-0,044	,715
	CD4/CD8 odnos	-0,218	0,305	-0,064	0,477
<b>11</b>	(Constant)	-3,380	0,775		,0001
	Starost (godine)	0,046	0,008	0,538	,0001
	Navike pušenja (da/ne)	0,384	0,130	0,249	0,004
	ITM	0,047	0,022	0,178	0,039
	Sistolni pritisak (mmHg)	0,012	0,006	0,190	0,049

B-nestandardizovani koeficijent; Beta- standardizovani koeficijent; p-vjerovatnoća;

Model objašnjava 53,4% varijanse rizika za KVB ( $r^2=0,534$ ), sa statističkom značajnošću  $p_{(ANOVA)}=0,0001$ .

Metodom „backward“ korak po korak, eliminisan je uticaj promjenljivih bez značaja i u jedanaestom koraku je pokazano da statistički značajan uticaj na rizik KVB, najviše ima

starost ispitanika ( $\beta=0,538$ ;  $p=0,0001$ ), potom navike pušenja duhana ( $\beta=0,249$ ;  $p=0,004$ ), sistolni pritisak ( $\beta=0,190$ ;  $p=0,049$ ) i na kraju ITM ( $\beta=0,178$ ;  $p=0,039$ ).

Standardnom regresionom analizom, ispitivan je uticaj nezavisnih prediktora (starosti, pola, navike pušenja, familijana anamneza za KVB, ITM, cART sistolnog i dijastolnog pritiska, holesterola, triglicerida, HDL-a, ŠUK-a, CRP-a, CD4 i CD4/CD8) na zavisno promjenljivu- rizik za KVB, **tri mjeseca** nakon početka ART.

Tabela 8. Uticaj nezavisnih prediktora na rizik za KVB, tri mjeseca nakon početka cART

Model	Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent	
	B	St.greška	Beta	p
1 (Constant)	-3,068	1,195		,013
Starost (godine)	,052	,011	,538	,000
Pol (m/ž)	,210	,248	,081	,401
Navike pušenja (da/ne)	,487	,159	,283	,003
Pozitivna anamneza za KVB (da/ne)	,178	,184	,100	,335
cART (NNRTIs+NRTI u odnosu na PI+NRTI)	-,176	,194	-,101	,369
ITM	,048	,029	,170	,102
Sistolni pritisak (mmHg)	,013	,010	,181	,217
Diastolni pritisak (mmHg)	-,008	,014	-,077	,552
Holesterol (mmol/l)	-,012	,104	-,012	,911
HDL (mmol/l)	-,033	,076	-,044	,672
Trigliceridi (mmol/l)	-,131	,172	-,073	,451
ŠUK(mmol/l)	,058	,101	,056	,564
CD4 (cel/mm3)	-4,03	,000	-,011	,926
CD4/CD8 odnos	-,157	,214	-,081	,465
CRP (mg/l)	-,015	,038	-,038	,703
13 (Constant)	-2,332	,640		,001
Starost (godine)	,060	,008	,626	,000
Navike pušenja (da/ne)	,517	,146	,301	,001
ITM	,050	,024	,174	,043

B-nestandardizovani koeficijent; Beta-standardizovani koeficijent; p-vjerovatnoća; cART-kombinovana antiretrovirusna terapija

Model objašnjava 54,5% varijanse rizika za KVB ( $r^2=0,545$ ), sa statističkom značajnošću  $p_{(ANOVA)}=0,0001$ .

Metodom „backward“ korak po korak, eliminisan je uticaj promjenljivih bez značaja, da bi u trinaestom koraku model pokazano da statistički značajan uticaj na rizik za KVB najviše ima starost ispitanika (beta=0,626; p=0,0001), potom navike pušenja duhana (beta=0,301; p=0,001) i na kraju ITM (beta=0,17; p=0,043).



Standardnom regresionom analizom, ispitivan je uticaj nezavisnih prediktora (starosti, pola, navike pušenja, familijana anamneza za KVB, ITM, cART sistolnog i dijastolnog pritiska, holesterola, triglicerida, HDL-a, ŠUK-a, CRP-a, CD4 i CD4/CD8) na zavisno promjenjivu rizik za KVB, šest mjeseci nakon početka ART.

Tabela 9. Uticaj nezavisnih prediktora na rizik za KVB, šest mjeseci nakon početka cART

Model	Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent	
	B	St.greška	Beta	p
1 (Constant)	-4,399	1,740		,014
Starost (godine)	,054	,014	,438	,000
Pol (m/ž)	,479	,358	,145	,186
Navike pušenja (da/ne)	,590	,221	,269	,010
Pozitivna anamneza za KVB (da/ne)	-,025	,247	-,011	,921
cART (NNRTIs+NRTI u odnosu na PI+NRTI)	-,015	,252	-,007	,954
ITM	,105	,039	,290	,010
Sistolni pritisak (mmHg)	,012	,011	,139	,304
Diastolni pritisak (mmHg)	,013	,016	,101	,417
Holesterol (mmol/l)	,086	,105	,089	,417
HDL (mmol/l)	-,043	,077	-,067	,577
Trigliceridi (mmol/l)	-,812	,439	-,204	,069
ŠUK(mmol/l)	-,206	,144	-,141	,157
CD4 (cel/mm3)	,001	,001	,311	,052
CD4/CD8 odnos	-1,004	,673	-,229	,141
CRP (mg/l)	-,054	,055	-,107	,335
13 (Constant)	-3,106	,912		,001
Starost ( godine)	,053	,012	,431	,000
Navike pušenja (da/ne)	,609	,208	,278	,005
ITM	,103	,035	,285	,004

B -nestandardizovani koeficijent; Beta -standardizovani koeficijent; p-vjerovatnoća;

Model objašnjava 48,3% varijanse rizika za KVB ( $r^2=0,483$ ), sa statističkom značajnošću  $p_{(ANOVA)}=0,0001$ .

Metodom „backward“ korak po korak, eliminisan je uticaj promjenljivih bez značaja, u trinaestom koraku model je pokazao da statistički značajan uticaj na rizik za KVB najviše imastarost ispitanika (beta=0,431; p=0,0001), potom navike pušenja duhana (beta=0,278; p=0,005) i na kraju ITM (beta=0,285; p=0,004).

Standardnom regresionom analizom, ispitivan je uticaj nezavisnih prediktora (starosti, pola, navike pušenja, familijana anameza za KVB, ITM, cART sistolnog i dijastolnog pritiska, holesterola, triglicerida, HDL-a, ŠUK-a, CRP-a, CD4 i CD4/CD8) na zavisno promjenljivu rizik za KVB **dvanaest mjeseci** nakon početka ART.

Tabela 10. Uticaj nezavisnih prediktora na rizik za KVB, dvanaest mjeseci nakon početka cART

Model	Varijabla	Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent	p
		B	St.greška	Beta	
1	(Constant)	-4,549	2,148		,038
	Starost (godine)	,053	,015	,376	,001
	Pol (m/ž)	-,138	,375	-,037	,714
	Navike pušenja (da/ne)	,170	,262	,068	,519
	Pozitivna anamneza za KVB (da/ne)	,110	,261	,042	,675
	cART (NNRTIs+NRTI u odnosu na PI+NRTI)	,388	,240	,152	,111
	ITM	,032	,038	,080	,395
	Sistolni pritisak (mmHg)	,015	,014	,137	,311
	Diastolni pritisak (mmHg)	-,003	,029	-,016	,907
	Holesterol (mmol/l)	,121	,138	,108	,385
	HDL (mmol/l)	,020	,084	,030	,816
	Trigliceridi (mmol/l)	-,384	,494	-,085	,440
	ŠUK(mmol/l)	,499	,181	,262	,008
	CD4 (cel/mm3)	-7,005	,000	-,018	,872
	CD4/CD8 odnos	-,788	,565	-,165	,168
	CRP (mg/l)	,003	,057	,006	,955
	11	(Constant)	-4,712	1,363	
Starost (godine)		,056	,013	,396	0,0001
ŠUK(mmol/l)		,552	,165	,290	0,001
CD4/CD8 odnos		-1,292	,473	-,246	0,008
cART		,400	,221	,157	0,074
Sistolni pritisak (mmHg)		,021	,009	,197	0,028

B -nestandardizovani koeficijent; Beta -standardizovani koeficijent; p-vjerovatnoća; ŠUK –šećer u krvi  
 Model objašnjava 53,0% varijanse rizika za KVB ( $r^2=0,530$ ), sa statističkom značajnošću  $p_{(ANOVA)}=0,0001$ . Metodom „backward“ korak po korak, eliminisan je uticaj promjenjivih bez značaja, u jedanaestom koraku model je pokazao da statistički značajan uticaj na rizik za KVB najviše ima starost ispitanika (beta=0,396; p=0,0001), potom ŠUK (beta=0,290; p=0,001), CD4/CD8 odnos (beta=-0,246; p=0,008). Što je veći CD4/CD8 odnos smanjuje se petogodišnji rizik za KVB. Na kraju sistolni pritisak (beta=0,197; p=0,028) tj. veći pritisak povećava rizik za KVB.

Standardnom regresionom analizom, ispitivan je uticaj nezavisnih prediktora (starosti, pola, navike pušenja, familijana anamneza za KVB, ITM, cART sistolnog i dijastolnog pritiska, holesterola, triglicerida, HDL-a, ŠUK-a, CRP-a, CD4 i CD4/CD8) na zavisno promjenjivu rizik za KVB, **osamnaest mjeseci** nakon početka cART.

Tabela 11. Uticaj nezavisnih prediktora na petogodišnji rizik za KVB, osamnaest mjeseci nakon početka cART

Model	Varijabla	Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent	
		B	St.greška	Beta	p
1	(Constant)	-6,751	3,596		,065
	Starost (godine)	,052	,023	,257	,027
	Pol (m/ž)	-,186	,520	-,034	,722
	Navike pušenja (da/ne)	,148	,350	,041	,673
	Pozitivna anamneza za KVB (da/ne)	,260	,374	,070	,490
	ITM	,106	,054	,187	,054
	Sistolni pritisak (mmHg)	-,004	,021	-,025	,860
	Diastolni pritisak (mmHg)	,061	,050	,180	,230
	Holesterol (mmol/l)	-,008	,199	-,004	,969
	HDL (mmol/l)	-,016	,108	-,017	,886
	Trigliceridi (mmol/l)	,246	,707	,037	,729
	ŠUK (mmol/l)	,369	,231	,156	,115
	CD4/CD8 odnos	-2,483	,861	-,288	,005
	CRP (mg/l)	,054	,035	,177	,129
10	cART (NNRTIs+NRTI u odnosu na PI+NRTI)	,554	,355	,152	,123
	(Constant)	-2,566	1,795		,157
	Starost (godine)	,050	,020	,247	,014
	ITM	,138	,049	,245	,006
	ŠUK (mmol/l)	,346	,203	,147	,093
	CD4/CD8 odnos	-2,523	,788	-,292	,002
CRP (mg/l)	,078	,029	,258	,009	

B -nestandardizovani koeficijent; Beta -standardizovani koeficijent; p-vjerovatnoća

Model objašnjava 53,9% varijanse rizika za KVB ( $r^2=0,539$ ), sa statističkom značajnošću  $p_{(ANOVA)}=0,0001$ .

Od svih navedenih faktora korak po korak, eliminisan je uticaj promjenjivih bez značaja i u desetom koraku ostali su prediktori koji statistički značano uticu na rizik za KVB. Od toga statistički značajan i najveći uticaj ima CD4/CD8 odnos ( $p=0,002$ ;  $\beta=-0,292$ ), s sa tim da veći odnos smanjuje rizik KVB; CRP ( $p=0,009$ ;  $\beta=0,258$ ). Veće vrijednosti CRP-a povećavaju rizik za KVB, potom starost ispitanika ( $p=0,014$ ;  $\beta=0,247$ ) stariji ispitanici imaju veći rizik za KVB. Na kraju ITM ( $p=0,009$ ;  $\beta=0,245$ ), odnosno veći ITM povećava rizik za KVB.

Standardnom regresionom analizom, ispitivan je uticaj nezavisnih prediktora (starosti, pola, navike pušenja, familijrana anamneza za KVB, ITM, cART sistolnog i dijastolnog pritiska, holesterola, triglicerda, HDL-a, ŠUK-a, CRP-a, CD4 i CD4/CD8) na zavisno promjenljivu rizik za KVB **dvadeset četiri mjeseca** nakon početka kombinovane antiretroviralne terapije.

Tabela 12. Uticaj nezavisnih prediktora na rizik za KVB, dvadeset četiri mjeseca nakon početka cART

Model	Varijabla	Nestandardizovani koeficijent		Standardizovani koeficijent	
		B	St.greška	Beta	p
1	(Constant)	-7,787	3,285		,021
	Starost (godine)	,053	,023	,239	,023
	Pol (m/ž)	,238	,511	,040	,643
	Navike pušenja (da/ne)	,102	,334	,026	,762
	Pozitivna anamneza za KVB (da/ne)	,245	,366	,060	,506
	ITM	,198	,052	,317	,000
	Sistolni pritisak (mmHg)	-,029	,020	-,156	,168
	Diastolni pritisak (mmHg)	,085	,032	,261	,010
	Holesterol (mmol/l)	,013	,194	,007	,945
	HDL (mmol/l)	-,122	,119	-,104	,312
	Trigliceridi (mmol/l)	-,598	,675	-,087	,379
	ŠUK(mmol/l)	,344	,196	,143	,085
	CRP (mg/l)	,102	,045	,245	,027
	CD4/CD8 odnos	-1,568	,845	-,166	,068
	9	cART (NNRTIs+NRTI u odnosu na PI+NRTI)	,890	,366	,214
(Constant)		-7,368	2,779		,010
Starost (godine)		,060	,021	,257	,006
ITM		,199	,052	,303	,000
Diastolni pritisak (mmHg)		,053	,028	,155	,068
CRP (mg/l)		,097	,043	,224	,027
CD4/CD8 odnos		-1,985	,829	-,200	,019
cART 18		,864	,346	,197	,015

B -nestandardizovani koeficijent; Beta -standardizovani koeficijent; p-vjerovatnoća;

Model objašnjava 63,3% varijanse rizika KVB ( $r^2=0,633$ ), sa statističkom značajnošću  $p_{(ANOVA)}=0,0001$ .

Od svih navedenih prediktora korak po korak, eliminisan je uticaj promjenljivih bez značaja i u devetom koraku modela ostali su prediktori koji značajno utiču na rizik za KVB, nakon 24 mjeseca CART. Od toga statistički značajan i najveći uticaj ima ITM ( $p=0,0001$ ;  $\beta=0,303$ ), potom starost ispitanika ( $p=0,012$ ;  $\beta=0,257$ ), CRP ( $p=0,026$ ;  $\beta=0,224$ ). Veće vrijednosti ovih parametara utiču na veći rizik za KVB. Terapija (cART) u ovom regresionom modelu prvi put je nakon 24 mjeseca pokazala statistički

značajan uticaj na rizik za KVB ( $\beta=0,197$ ;  $p=0,013$ ). Ispitanici koji su u kombinovanoj terapiji imali PI, imaju veći rizik za KVB. Odnos CD4/CD8 se zadržao kao značajan prediktor i nakon 24 mjeseca ( $p=0,025$ ;  $\beta=-0,200$ ), s tim da veći odnos smanjuje vjerovatnoću za rizik KVB.

U Tabeli 13. je prikazan apsolutni broj (N) i procentualni udio ispitanika prema riziku za KVB (nizak <1%, srednji 1-5% i visok rizik >5-10%) za svaki posmatrani period, bazično i tokom 24 mjeseca cART.

Tabela 13. Prikaz učestalosti stepena rizika za KVB bazično prije početka cART, i tokom 24 mjeseca cART.

Petogodišnji rizik za KVB	Prije početka cART		3 mjeseca nakon cART		6 mjesecinakon cART		12 mjeseci nakon cART		18 mjeseci nakon cART		24 mjeseca nakon cART	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Bez rizika (<1%)	54	71,1	43	56,6	28	36,8	11	14,5	0	0	0	0
Nizak rizik (1-5%)	22	28,9	33	43,4	47	61,8	63	82,9	54	71,1	50	65,8
Srdnji rizik (>5-10%)	0	0	0	0	1	1,3	2	2,6	22	28,9	26	34,2

KVB-kardiovaskularna bolest; cART-kombinovana antiretrovirusna terapija

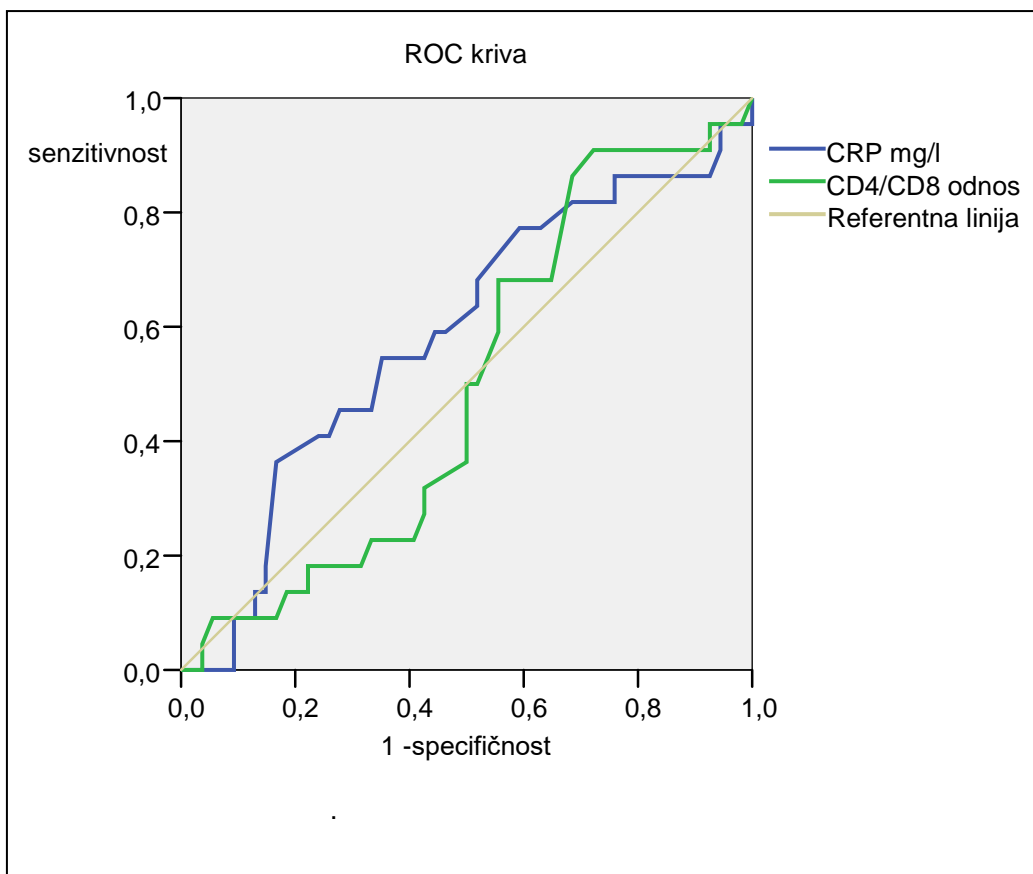
Prije početka cART 54(71,1%) HIV+ ispitanika bilo je bez rizika (<1%) za razvoj KVB i 22(28,9%) u niskom riziku (između 1-5%). Nije bilo ispitanika koji su na početku imali srednji rizik za KVB (>5-10%).

Tri mjeseca nakon uvođenja kombinovane antiretrovirusne terapije, povećao se broj ispitanika sa niskim rizikom na 33 (43,4%). Dalje, nastavio se trend rasta broja ispitanika sa srednjim rizikom, tako da je nakon šest mjeseci 47 (61,8%) HIV+ ispitanika imalo srednji rizik za KVB, i jednog koji je prešao u kategoriju srednjeg rizika.

Nakon 12 mjeseci 63 (82,9%) ispitanika imalo je nizak rizik, 2 (2,6%) srednji rizik i 11 (14,5%) ispitanika ostalo je u kategoriji niskog rizika za petogodišnju KVB.

Nakon 18 mjeseci cART, nije bilo ispitanika bez rizika za KVB, a 54 (71,1%) ispitanika imalo je nizak rizik i 22 (28,9%) srednji rizik za KVB. Taj trend rasta broja ispitanika sa srednjim rizikom se nastavio i nakon 24 mjeseca cART, i iznosio je 26 (34,2%). Odnosno svaki treći ispitanik na cART nakon 24 mjeseca terapije je u srednjem riziku za KVB.

### 7.3. CRP i CD4/CD8 kao markeri niskog/srednjeg rizika za KVB.

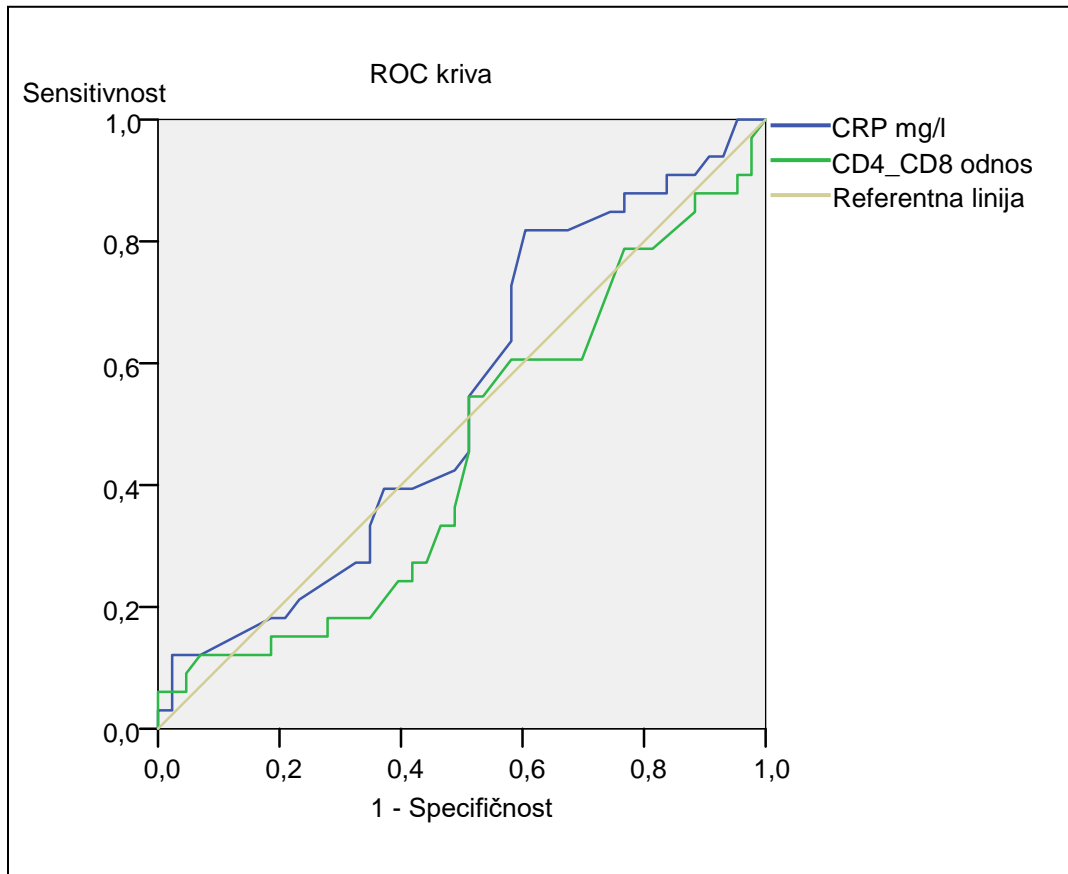


Grafikon 3. ROC kriva (*engl.* ROC - Receiver operating characteristic), CRP i CD4/CD8 odnos kao marker srednjeg/niskog rizika za razvoj KVB **prije početka** ART.

Tabela 14. Površina ispod ROC krive prije početka terapij

Testirane varijable/markeri	AUC	St.greška	p	95% Interval Povjerenja za površinu	
				Donja granica	Gornja granica
CRP (mg/l)	0,586	0,073	0,240	0,442	0,730
CD4/CD8 odnos	0,496	0,069	0,959	0,360	0,632

Uvidom u grafikon 3 i tabelu 14, CRP i CD4/CD8 odnos ne mogu razlikovati srednji od niskog rizika za KVB, HIV+ ispitanika prije početka cART,  $p > 0,05$ .

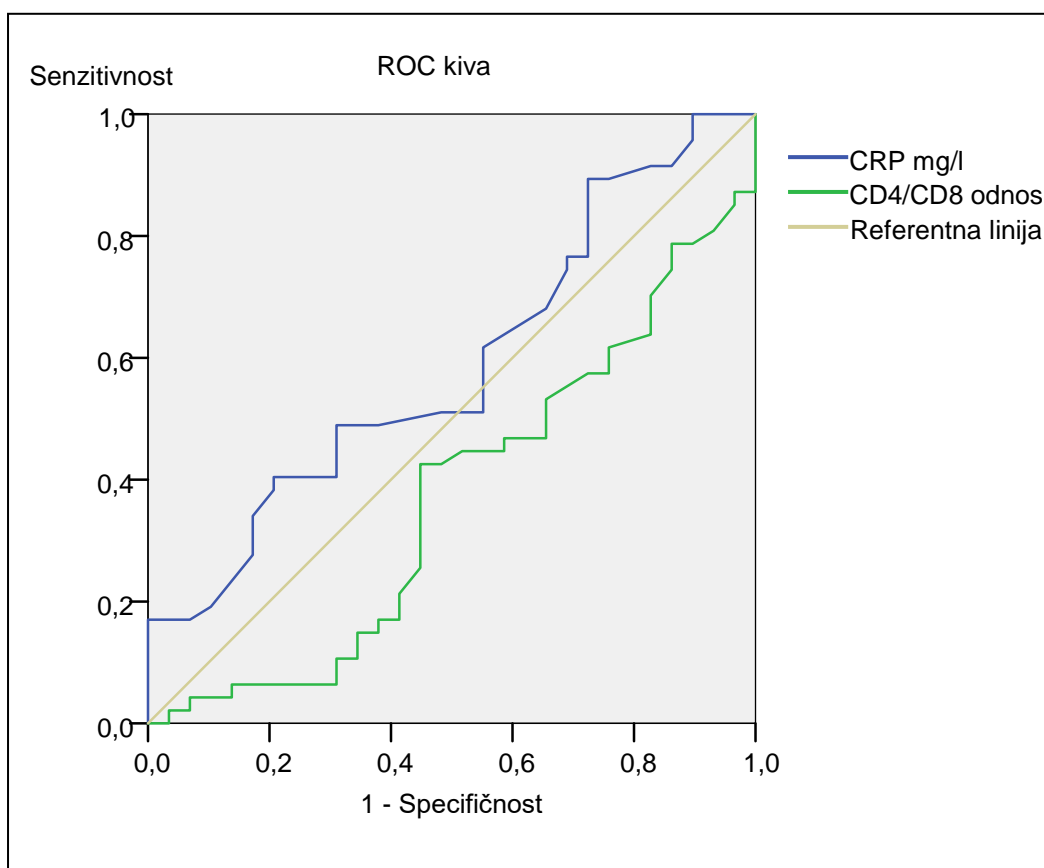


Grafikon 4. ROC kriva;CRP i CD4/CD8 odnos kao marker srednjeg/niskog rizika za razvoj KVB, **tri mjeseca** nakon početka cART terapije.

Tabela 15. Površina ispod ROC krive nakon tri mjeseca terapije

Testirane varijable/markeri	AUC	St.greška	p	95% Interval povjerenja za površinu	
				Donja granica	Gornja granica
CRP (mg/l)	0,537	0,067	0,579	0,406	0,669
CD4/CD8 odnos	0,450	,067	0,457	0,318	0,582

Uvidom u grafikon 4 i tabelu 15, CRP i CD4/CD8 odnos ne mogu razlikovati serdnji od niskog rizika za razvoj kardivaskularne bolesti, HIV ispitanika tri mjeseca od početka cART,  $p > 0,05$ .



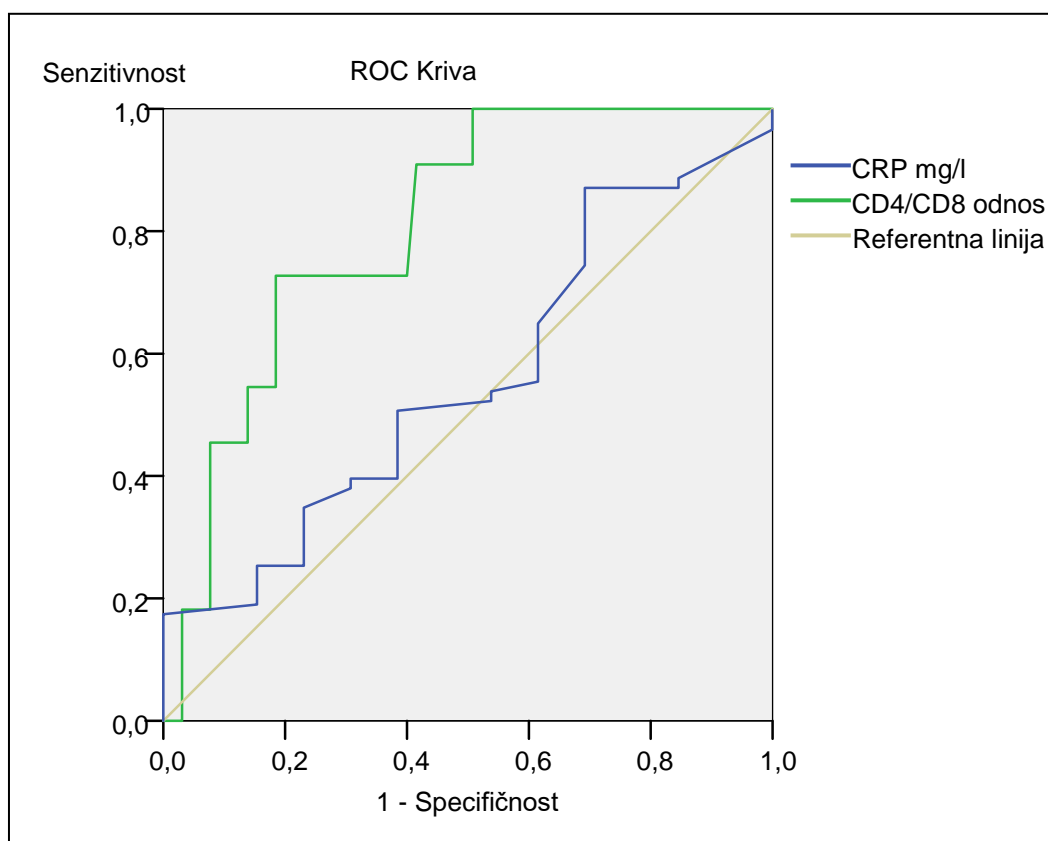
Grafikon 5. ROC kriva; CRP i CD4/CD8 odnos kao marker srednjeg/niskog rizika za razvoj KVB, šest mjeseci nakon početka cART terapije.

Tabela 16. Površina ispod ROC krive nakon šest mjeseci terapije

Testirane varijable/markeri	AUC	St.greška	p	95% Interval povjerenja za površinu	
				Donja granica	Gornja granica
CRP (mg/l)	0,588	0,067	,201	0,457	0,718
CD4/CD8 odnos	0,370	0,066	0,058	0,240	0,500

Uvidom u grafikon 5 i tabelu 16, CRP i CD4/CD8 odnos ne mogu razlikovati srednji od niskog rizika za razvoj kardivaskularne bolesti HIV ispitanika šest mjeseci od početka cART,  $p > 0,05$ .



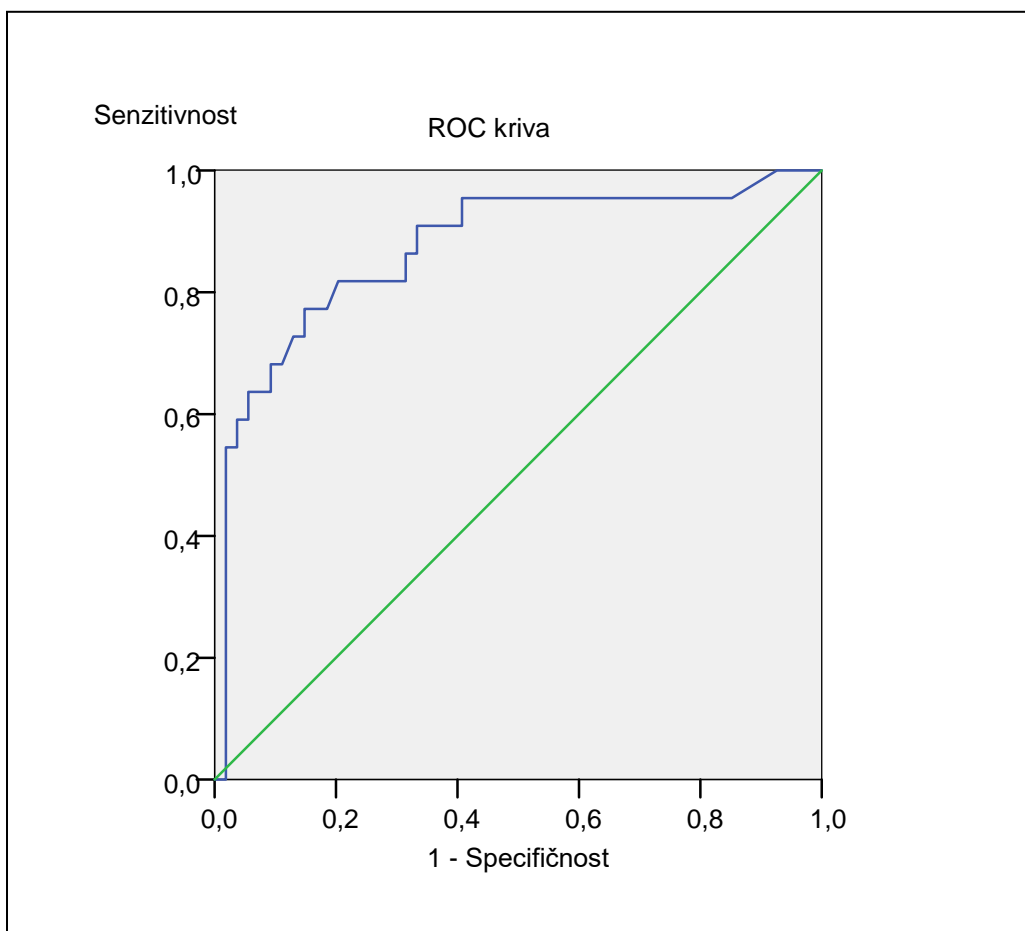


Grafikon 6. ROC kriva; CRP i CD4/CD8 odnos kao marker srednjeg/niskog rizika za razvoj KVB, **dvanaest mjeseci** od početka cART terapije.

Tabela 17. Površina ispod ROC krive nakon dvanaest mjeseci terapije

Testirane varijable/markeri	AUC	St.greška	p	95% Interval povjerenja za površinu	
				Donja granica	Gornja granica
CRP (mg/l)	0,427	0,095	0,438	0,240	0,613
CD4/CD8 odnos	0,807	0,059	0,001	0,691	0,923

Uvidom u grafikon 6 i tabelu 17, CRP ne može razlikovati srednji od niskog rizika KVB ( $p=0,438$ ), dok CD4/CD8 odnos se pokazao da može razlikovati niski od srednjeg rizika za KVB HIV ispitanika, nakon 12 mjeseci od početka cART ( $p=0,001$ ;  $AUC=0,807$ ) u našem uzorku, dok se u populaciji ovakvih ispitanika površina se kreće između 0,691 i 0,923.



Grafikon 7. ROC kriva; CRP kao marker srednjeg/niskog rizika za razvoj KVB, **osamnaest mjeseci** od početka cART terapije.

Tabela br 18. Površina ispod ROC krive nakon osamnaest mjeseci terapije

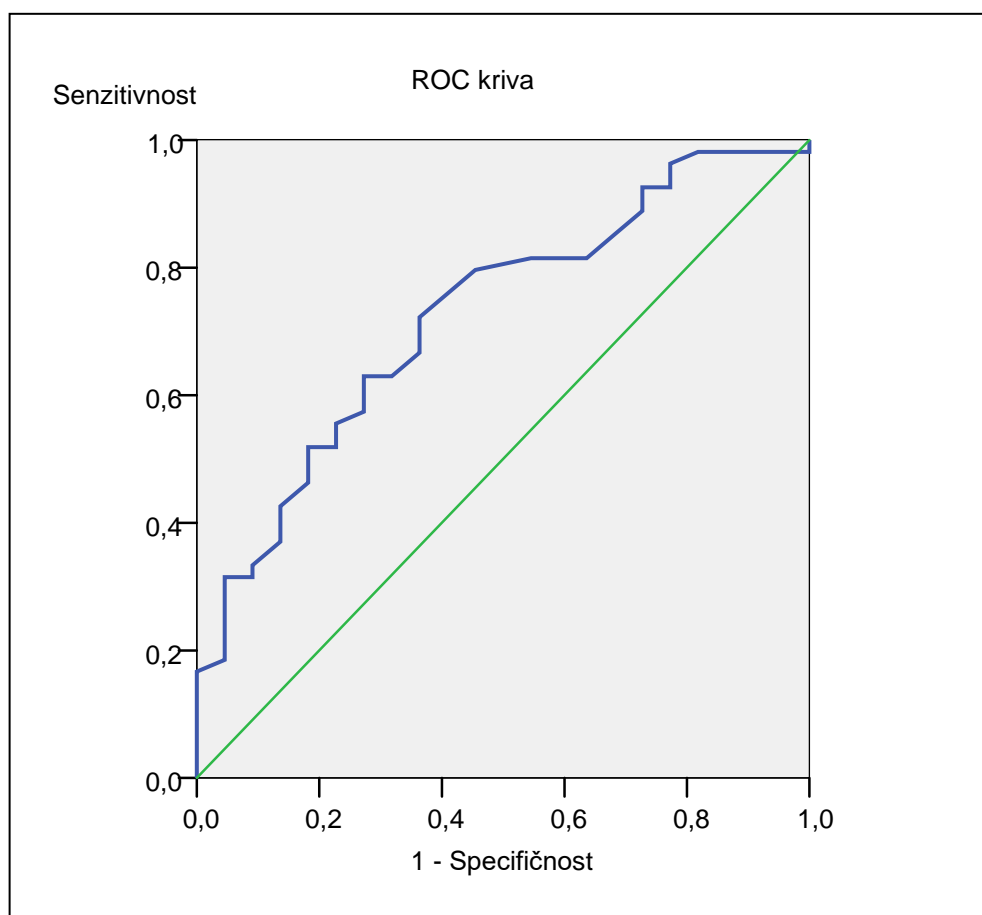
Testirana varijabla/marker	AUC	St.greška	p	95% Interval povjerenja za površinu	
				Donja granica	Gornja granica
CRP mg/l	0,875	0,049	,0001	0,779	0,972

Uvidom u grafikon 7 i tabelu 18, CRP se pokazao da može biti marker srednjeg rizika KVB nakon 18 mjeseci od početka terapije ( $p=0,0001$ ;  $AUC =0,875$ ) u našem uzorku, dok se u populaciji ovakvih ispitanika površina kreće između 0,779 i 0,972.

Tabela 19. Senzitivnost i specifičnost CRP-a kao markera srednjeg rizika KVB nakon 18 mjeseci cART

Pozitivni ako je veći od ili jednak:	Senzitivnost	1 - specifičnost	Y-indeks
-0,700	1,000	1,000	0,000
0,375	1,000	0,981	0,019
0,500	1,000	0,963	0,037
0,555	1,000	0,944	0,056
0,580	1,000	0,926	0,074
0,700	0,955	0,852	0,103
0,850	0,955	0,833	0,122
0,925	0,955	0,815	0,140
1,075	0,955	0,796	0,159
1,300	0,955	0,778	0,177
1,425	0,955	0,741	0,214
1,475	0,955	0,722	0,233
1,550	0,955	0,704	0,251
1,650	0,955	0,685	0,270
1,800	0,955	0,667	0,288
1,950	0,955	0,648	0,307
2,050	0,955	0,630	0,325
2,150	0,955	0,574	0,381
2,225	0,955	0,556	0,399
2,275	0,955	0,537	0,418
2,350	0,955	0,500	0,455
2,550	0,955	0,481	0,474
2,800	0,955	0,463	0,492
2,925	0,955	0,444	0,511
2,975	0,955	0,426	0,529
3,025	0,955	0,407	0,548
3,125	0,909	0,407	0,502
3,250	0,909	0,389	0,520
3,350	0,909	0,370	0,539
3,500	0,909	0,352	0,557
3,700	0,909	0,333	0,576
3,875	0,864	0,333	0,531
3,975	0,864	0,315	0,549
4,050	0,818	0,315	0,503
4,270	0,818	0,278	0,540
4,445	0,818	0,259	0,559
4,475	0,818	0,241	0,577
4,550	0,818	0,222	0,596
4,750	0,818	0,204	0,614
4,975	0,773	0,185	0,588
5,075	0,773	0,167	0,606
5,150	0,773	0,148	0,625
5,215	0,727	0,148	0,579
5,265	0,727	0,130	0,597
5,350	0,682	0,111	0,571
5,650	0,682	0,093	0,589
5,950	0,636	0,093	0,543
6,050	0,636	0,074	0,562
6,125	0,636	0,056	0,580
6,175	0,591	0,056	0,535
6,350	0,591	0,037	0,554
6,850	0,545	0,037	0,508
7,350	0,545	0,019	0,526
7,650	0,500	0,019	0,481
7,850	0,455	0,019	0,436
7,950	0,409	0,019	0,390
8,050	0,364	0,019	0,345
8,400	0,318	0,019	0,299
8,900	0,273	0,019	0,254
9,300	0,227	0,019	0,208
9,800	0,182	0,019	0,163
11,100	0,136	0,019	0,117
15,300	0,091	0,019	0,072
20,350	0,045	0,019	0,026
32,600	0,000	0,019	-0,019
44,000	0,000	0,000	0,000

U tabeli su predstavljene vrijednosti CRP-a, senzitivnost, 1-specifičnost i Yundanov indeks. Vrijednosti CRP-a od 5,15 mg/l ima najveći Yundanov indeks=0,625, odnosno CRP na ovom presjeku ima najveću senzitivnost od 77,3% i najveću specifičnost od 85,2%. Vrijednosti CRP-a >5,15 mogu razlikovati srednji od niskog rizika KVB, osamnaest mjeseci nakon cART.



Grafikon 8. ROC kriva; CD4/CD8 odnos kao marker srednjeg/niskog rizika za razvoj KVB, **osamnaest mjeseci** od početka cART terapije.

Tabela 20. Površina ispod ROC krive nakon osamnaest mjeseci terapije

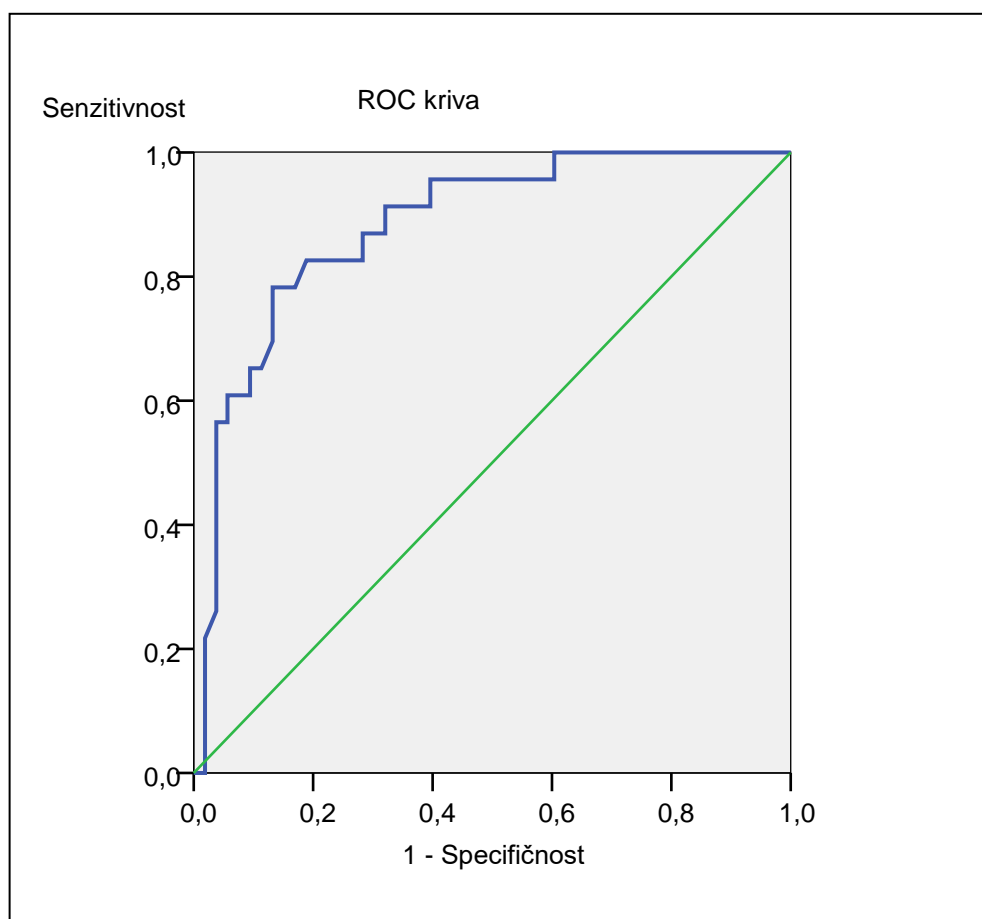
Testirane varijable/markeri	AUC	St.greška	p	95% Interval Povjerenja za površinu	
				Donja granica	Gornja granica
CD4/CD8 odnos	0,724	0,062	0,002	0,603	0,846

Uvidom u grafikon 8 i tabelu 20, CD4/CD8 može biti marker niskog rizika za KVB nakon 18 mjeseci od početka cART ( $p=0,002$ ;  $AUC =0,724$ ) u našem uzorku, dok se u populaciji ovakvih ispitanika površina kreće između 0,603 i 0,846.

Tabela 21 . Senzitivnost i specifičnost CD4/CD8 odnosa kao markera niskog rizika KVB nakon 18 mjeseci cART

Pozitivni ako je veći od ili jednak:	Senzitivnost	1 - Specifičnost	Y-indeks				
0,000	1,000	1,000	0,000	,465	0,630	0,318	0,312
0,075	0,981	1,000	-0,019	0,475	0,630	0,273	0,357
0,150	0,981	0,955	0,026	0,490	0,574	0,273	0,301
0,185	0,981	0,909	0,072	0,505	0,556	0,227	0,329
0,220	0,981	0,864	0,117	0,515	0,519	0,227	0,292
0,245	0,981	0,818	0,163	0,525	0,519	0,182	0,337
0,265	0,963	0,773	0,190	0,545	0,500	0,182	0,318
0,275	0,944	0,773	0,171	0,565	0,463	0,182	0,281
0,285	0,926	0,773	0,153	0,575	0,426	0,136	0,290
0,300	0,926	0,727	0,199	0,590	0,370	0,136	0,234
0,315	0,907	0,727	0,180	0,635	0,333	0,091	0,242
0,325	0,889	0,727	0,162	0,675	0,315	0,091	0,224
0,345	0,852	0,682	0,170	0,690	0,315	0,045	0,270
0,365	0,815	0,636	0,179	0,705	0,296	0,045	0,251
0,375	0,815	0,545	0,270	0,730	0,278	0,045	0,233
0,400	0,796	0,455	0,341	0,765	0,222	0,045	0,177
0,425	0,759	0,409	0,350	0,785	0,185	0,045	0,140
<b>0,435</b>	<b>0,722</b>	<b>0,364</b>	<b>0,358</b>	0,805	0,167	0,000	0,167
0,445	0,704	0,364	0,340	0,835	0,130	0,000	0,130
0,455	0,667	0,364	0,303	0,855	0,093	0,000	0,093
				0,875	0,074	0,000	0,074
				0,905	0,037	0,000	0,037
				1,000	0,000	0,000	0,000

U tabeli su predstavljene vrijednosti CD4/CD8 odnosa, senzitivnost, 1-specifičnost i Yundanov indeks. Presječna vrijednost CD4/CD8 odnosa od 0,435 ima najveći Yundanov indeks=0,358, odnosno na ovom presjeku CD4/CD8 ima najveću senzitivnost 72,2% i najveću specifičnost 63,6% za predviđanje niskog rizika za razvoj KVB osamnaest mjeseci nakon cART.



Grafikon 9. ROC kriva; CRP kao marker srednjeg/niskog rizika za razvoj KVB, **24 mjeseca** od početka cART.

Tabela 22. Površina ispod ROC krive nakon dvadeset četiri mjeseca terapije

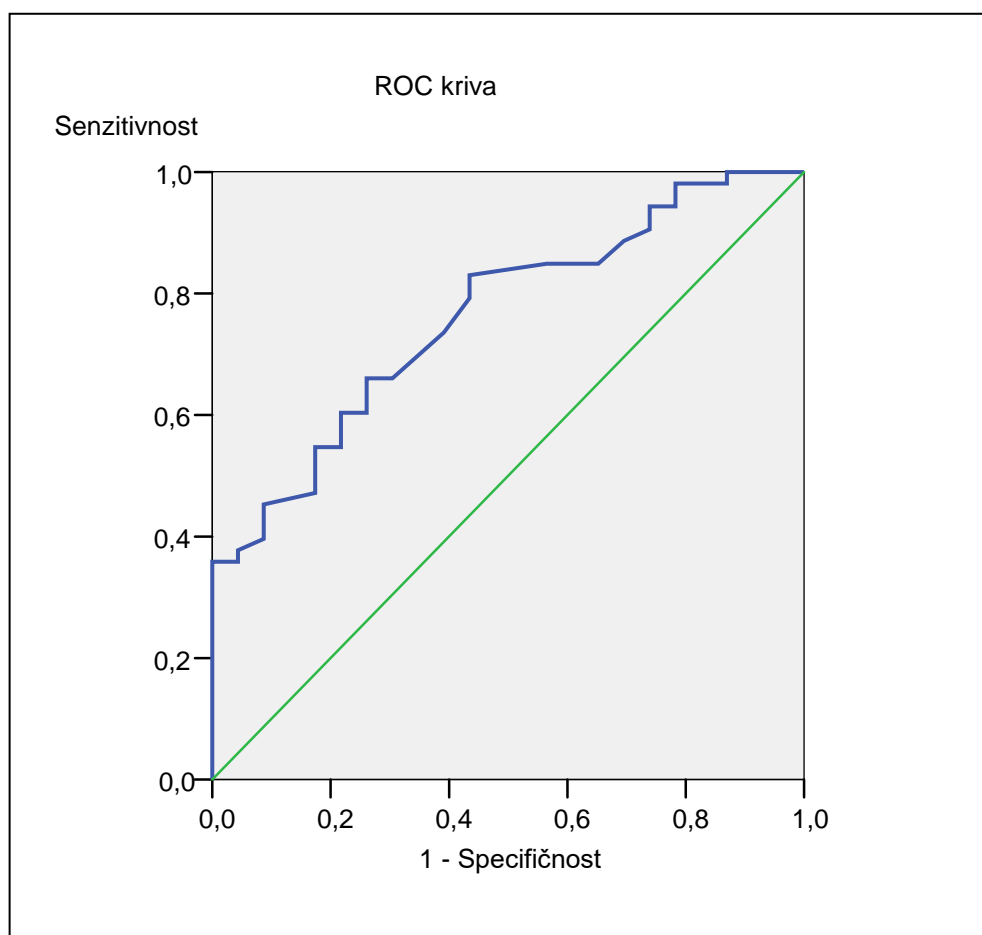
Testirane varijable/markeri	AUC	St.greška	p	95% Interval povjerenja za površinu	
				Donja granica	Gornja granica
CRP mg/l	0,882	0,041	0,0001	0,802	0,962

Uvidom u grafikon 9 i tabelu 22, CRP može biti marker srednjeg rizika za KVB nakon 24 mjesca od početka cART ( $p=0,0001$ ;  $AUC =0,882$ ,) u našem uzorku, dok se u populaciji ovakvih ispitanika površina kreće između 0,802- 0,962.

Tabela 23 . Senzitivnost i specifičnost CRP-a kao markera srednjeg rizika KVB nakon 24 mjeseca cART

Pozitivni ako je veći od ili jednak:	Senzitivnost	1 - Specifičnost	Y-indeks
-0,540	1,000	1,000	0,000
0,535	1,000	0,981	0,019
0,660	1,000	0,962	0,038
0,715	1,000	0,943	0,057
0,740	1,000	0,925	0,075
0,860	1,000	0,830	0,170
0,980	1,000	0,811	0,189
1,030	1,000	0,792	0,208
1,085	1,000	0,774	0,226
1,235	1,000	0,755	0,245
1,460	1,000	0,736	0,264
1,585	1,000	0,698	0,302
1,635	1,000	0,679	0,321
1,710	1,000	0,660	0,340
1,810	1,000	0,642	0,358
1,960	1,000	0,623	0,377
2,110	1,000	0,604	0,396
2,210	0,957	0,604	0,353
2,335	0,957	0,547	0,410
2,435	0,957	0,528	0,429
2,510	0,957	0,491	0,466
2,710	0,957	0,472	0,485
2,960	0,957	0,453	0,504
3,085	0,957	0,434	0,523
3,135	0,957	0,415	0,542
3,185	0,957	0,396	0,561
3,285	0,913	0,396	0,517
3,410	0,913	0,377	0,536
3,510	0,913	0,358	0,555
3,660	0,913	0,340	0,573
3,860	0,913	0,321	0,592
4,030	0,870	0,321	0,549
4,105	0,870	0,302	0,568
4,135	0,870	0,283	0,587
4,210	0,826	0,283	0,543
4,430	0,826	0,264	0,562
4,605	0,826	0,245	0,581
4,635	0,826	0,226	0,600
4,710	0,826	0,208	0,618
4,910	0,826	0,189	0,637
5,135	0,783	0,170	0,613
5,235	0,783	0,151	0,632
5,310	0,783	0,132	0,651
5,375	0,739	0,132	0,607
5,425	0,696	0,132	0,564
5,510	0,652	0,113	0,539
5,810	0,652	0,094	0,558
6,110	0,609	0,094	0,515
6,210	0,609	0,075	0,534
6,285	0,609	0,057	0,552
6,335	0,565	0,057	0,508
6,510	0,565	0,038	0,527
7,010	0,522	0,038	0,484
7,510	0,478	0,038	0,440
7,810	0,435	0,038	0,397
8,060	0,391	0,038	0,353
8,210	0,348	0,038	0,310
8,560	0,304	0,038	0,266
8,930	0,261	0,038	0,223
9,130	0,217	0,019	0,198
9,460	0,174	0,019	0,155
10,330	0,130	0,019	0,111
13,000	0,087	0,019	0,068
16,000	0,043	0,019	0,024
25,000	0,000	0,019	-0,019
34,000	0,000	0,000	0,000

U tabeli su predstavljene vrijednosti CRP-a, senzitivnost, 1-specifičnost i Yundanov indeks. Vrijednosti CRP-a od 5,31mg/L ima najveći Yundanov indeks=0,651, odnosno CRP na ovom presjeku ima najveću senzitivnost 78,3% i najveću specifičnost 86,8%, kao marker srednjeg u odnosu na niski rizik za KVB.



Grafikon 10. ROC kriva; CD4/CD8 odnos kao marker srednjeg/niskog rizika za razvoj KVB, dvadeset četiri mjesec od početka cART terapije

Tabela 24. Površina ispod ROC krive nakon dvadeset četiri mjeseca terapije

Testirane varijable/markeri	AUC	St.greška	p	95% Interval povjerenja za površinu	
				Donja granica	Gornja granica
CD4/CD8 odnos	0,762	0,056	0,0001	0,653	0,872

Uvidom u grafikon 10 i tabelu 24, CD4/CD8 odnos može biti marker niskog rizika KVB nakon 24 mjeseca od početka terapije, ( $p=0,001$ ;  $AUC =0,762$ ) u našem uzorku, dok se u populaciji ovakvih ispitanika površina kreće između 0,653 i 0,872.

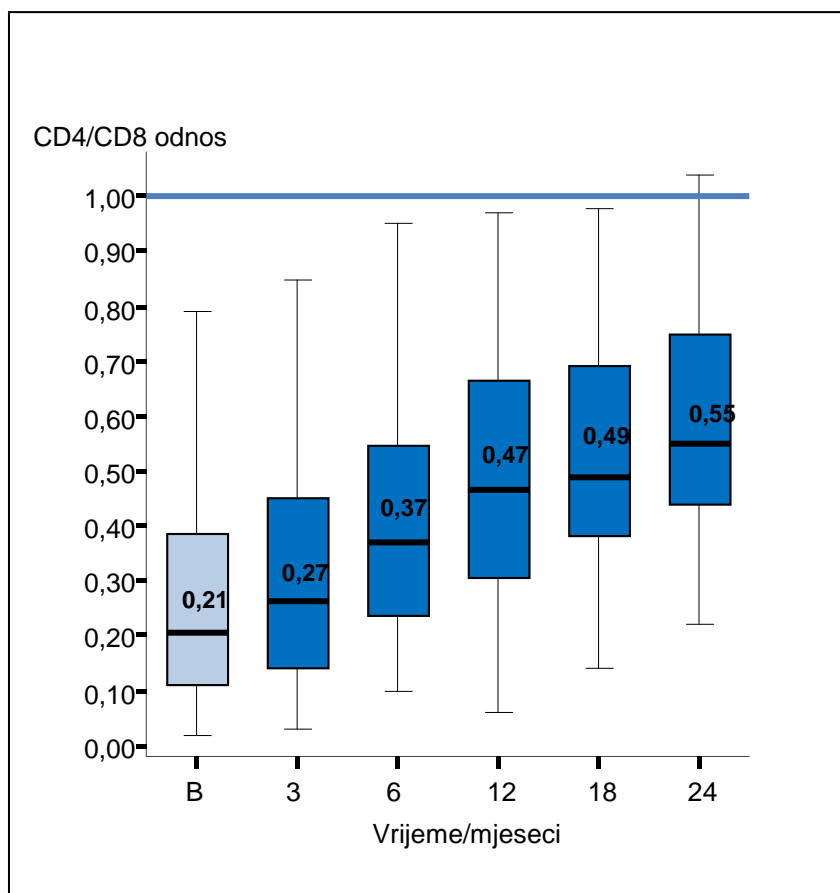


Tabela 25 . Senzitivnost i specifičnost CD4/CD8 odnosa kao markera niskog rizika za KVB nakon 24 mjeseca cART

Pozitivni ako je veći od ili jednak:	Senzitivnost	1 - Specifičnost	Y-indeks				
-0,780	1,000	1,000	0,000	0,565	0,604	0,217	0,387
0,245	1,000	0,913	0,087	0,575	0,547	0,217	0,330
0,280	1,000	0,870	0,130	0,590	0,547	0,174	0,373
0,305	0,981	0,870	0,111	0,610	0,509	0,174	0,335
0,325	0,981	0,783	0,198	0,625	0,472	0,174	0,298
0,335	0,962	0,783	0,179	0,635	0,453	0,087	0,366
0,350	0,943	0,783	0,160	0,650	0,396	0,087	0,309
0,365	0,943	0,739	0,204	0,695	0,377	0,043	0,334
0,375	0,925	0,739	0,186	0,735	0,358	0,043	0,315
0,385	0,906	0,739	0,167	0,750	0,358	0,000	0,358
0,405	0,887	0,696	0,191	0,765	0,340	0,000	0,340
0,425	0,849	0,652	0,197	0,790	0,321	0,000	0,321
0,435	0,849	0,565	0,284	0,825	0,264	0,000	0,264
0,460	0,830	0,435	0,395	0,845	0,226	0,000	0,226
0,485	0,792	0,435	0,357	0,865	0,189	0,000	0,189
0,495	0,736	0,391	0,345	0,885	0,170	0,000	0,170
0,510	0,698	0,348	0,350	0,900	0,151	0,000	0,151
0,525	0,660	0,304	0,356	0,915	0,113	0,000	0,113
0,535	0,660	0,261	0,399	0,935	0,094	0,000	0,094
0,550	0,604	0,261	0,343	0,960	0,075	0,000	0,075
				0,975	0,057	0,000	0,057
				1,010	0,019	0,000	0,019
				2,040	0,000	0,000	0,000

U tabeli su predstavljene vrijednosti CD4/CD8 odnosa, senzitivnost, 1-specifičnost i Yundanov indeks. Prosječna vrijednost CD4/CD8 odnosa od 0,53 ima najveći Yundanov indeks=0,399, odnosno ima najveću senzitivnost 66,0% i najveću specifičnost 73,9%. Vrijednosti CD4/CD8 odnosa >0,53 mogu biti marker niskog rizika KVB, nakon 24 mjeseca cART.

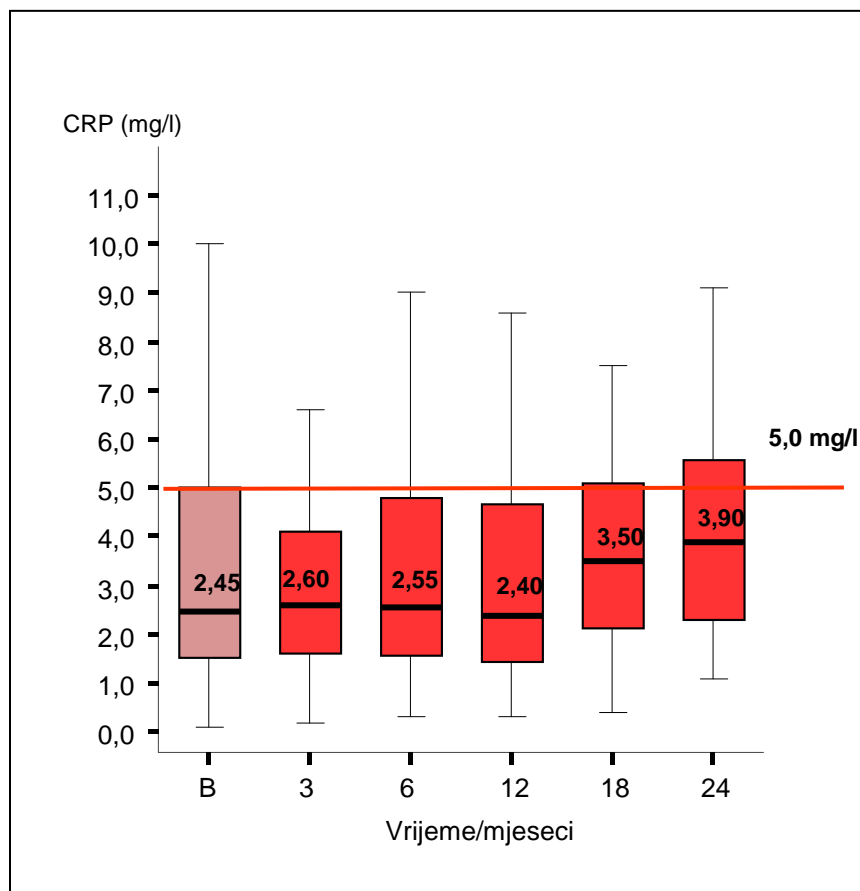
#### 7.4. Analiza trenda CD4/CD8 odnosa, CRP-a i rizika za KVB, bazično i tokom 24 mjeseca cART.



Grafikon 11. Analiza trenda CD4/CD8 odnosa, bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

Najniže vrijednosti odnosa CD4/CD8 izmjerne su bazično kod HIV ispitanika prije početka cART 0,21 (0,11-0,39); kada su i apsolutne vrijednosti CD4 bile najmanje. Nakon početka cART, vrijednosti odnosa CD4/CD8 su porasle na 0,27 (0,11-0,39). Trend statistički značajnog rasta ( $p=0,001$ ) nastavio se i dalje, nakon 6 mjeseci cART iznosio je 0,37 (0,23-0,55).

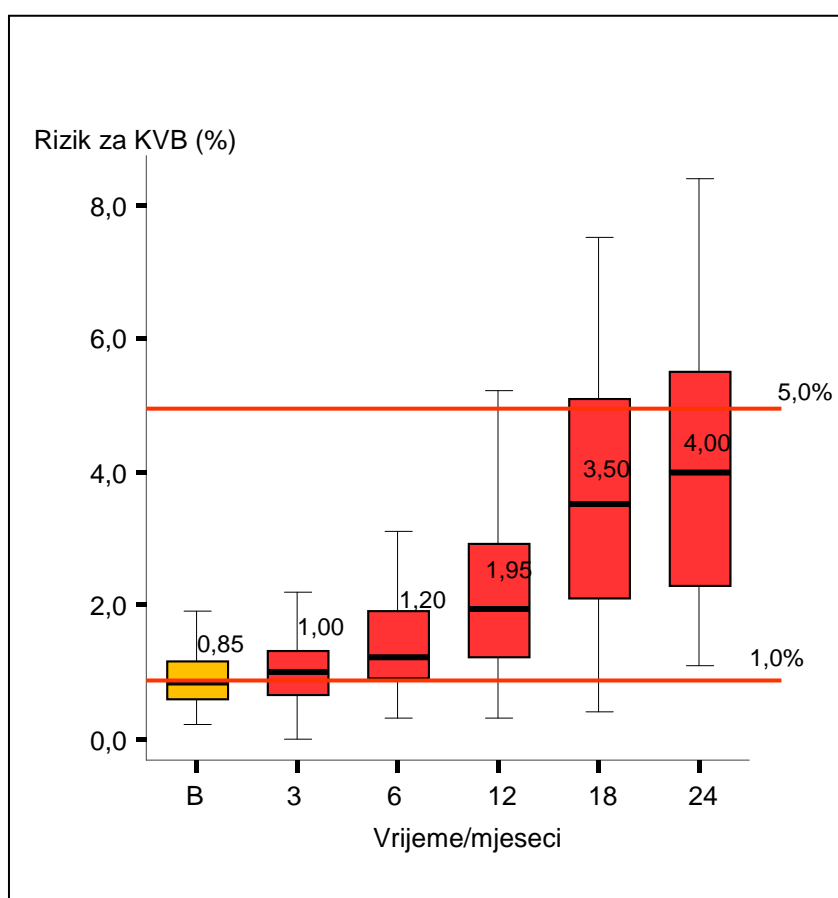
Od dvanaestog mjeseca terapije pa do kraja poamiranog perioda nastavlja se blagi trend rasta. Na kraju, 24 mjeseca cART CD4/CD8 odnos u prosjeku je iznosio 0,55 (0,44-0,76). Kod jednog HIV ispitanika odnos CD4/CD8 je bio veći od 1.



Grafikon 12. Analiza trenda CRP-a, bazično i tokom od 24 mjeseca cART

Vrijednosti CRP-a bazično i tokom prvih 12 mjeseci cART terapije bile su ujednačene, bez značajnog trenda rasta ( $p > 0,05$ ). Bazično, vrijednosti CRP-a su iznosile u prosjeku 2,45 mg/l (1,50-5,0 mg/l), a u dvanaestom mjesecu 2,4 mg/l (1,42-4,75 mg/l). Nakon 12 mjeseci prosječne vrijednosti CRP-a su statistički značajno porasle i u osmanestom mjesecu bile su 3,5 mg/l (2,1-5,10 mg/l). Trend blagog rasta nastavio se do 24 mjeseca, kada je CRP iznosio u prosjeku 3,9 mg/l (2,3-5,6 mg/l).

Prosječne vrijednosti (medijane) CRP-a tokom opservacije od 24 mjeseca bile su u okvirima referentnih granica, do 5,0 mg/l, dok su se vrijednosti oko 75 percentile, nakon 18 mjeseci kretale iznad referentne granice od 5,0 mg/l.



Grafikon 13. Analiza trenda razvoja rizika KVB (%), bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

Bazično i tokom 24 mjeseca, praćen je rizik za KVB, vrijednosti skora manje od 1% smatrane su bez rizika za KVB, vrijednosti skora izmedju 1-5% predstavljaju nizak rizik za KVB, vrijednosti veće od 5% srednji rizik za KVB.

Bazične vrijednosti skora iznosile su u prosjeku 0,85% (0,6-1,18 %) i ispitanici bazično su u prosjeku bez rizika za KVB. Nakon početka cART, rizik za KVB raste tako da je već u trećem mjesecu u prosjeku iznosio 1,0% (0,63-1,30%). Od šestog mjeseca terapije ispitanici su u prosjeku u blagom srednjem riziku 1,2% (0,9-1,9 %).

Dalje, do dvanaestog mjeseca trend rasta rizika je veći i statistički značajan ( $p=0,0001$ ), tada rizik za KBV u prosjeku iznosio 1,9% (1,2 -2,9 %), u 18 mjesecu 3,7% (1,75-5,98 %). Nakon 24 mjeseca terapije rizik za KVB iznosio je 3,86 % (2,3-6,14 %), kada je dio ispitanika ušao u kategoriju srednjeg rizika za KVB (>5%).

Tabela 26. Korelacije CD4/CD8 odnosa, CRP-a i rizik za KVB, bazično i tokom 24 mjeseca cART

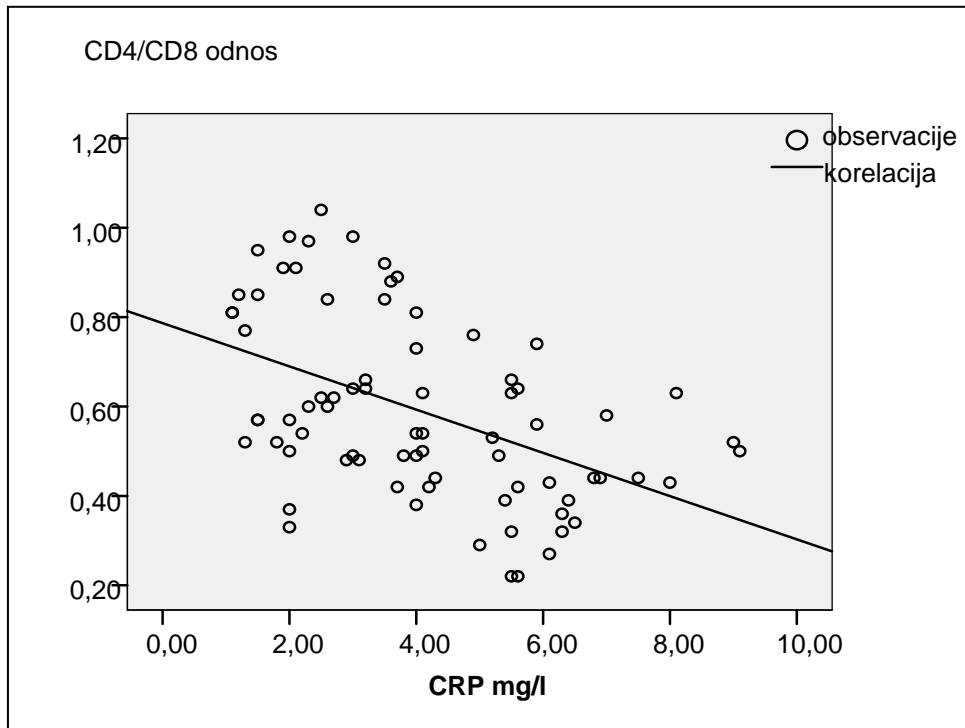
CD4/CD8 odnos	Spearman's rho	CRP (mg/l)	Rizik za KVB (%)
Bazično	Koeficijet korelacije	-0,045	-0,111
	p	0,700	0,340
	N	76	76
3 mjeseca cART	Koeficijet korelacije	-0,086	-,012
	p	,458	0,915
	N	76	76
6 mjeseci cART	Koeficijet korelacije	-0,193	-0,171
	p	,095	0,139
	N	76	76
12 mjeseci cART	Koeficijet korelacije	-0,046	-0,409
	p	,692	0,0001
	N	76	76
18 mjeseci cART	Koeficijet korelacije	-0,483	-0,483
	p	,0001	0,0001
	N	76	76
24 mjeseca cART	Koeficijet korelacije	-0,497	-0,490
	p	0,0001	0,0001
	N	76	76

N-uzorak; Koeficijet korelacije - rho; p.vjerovatnoća

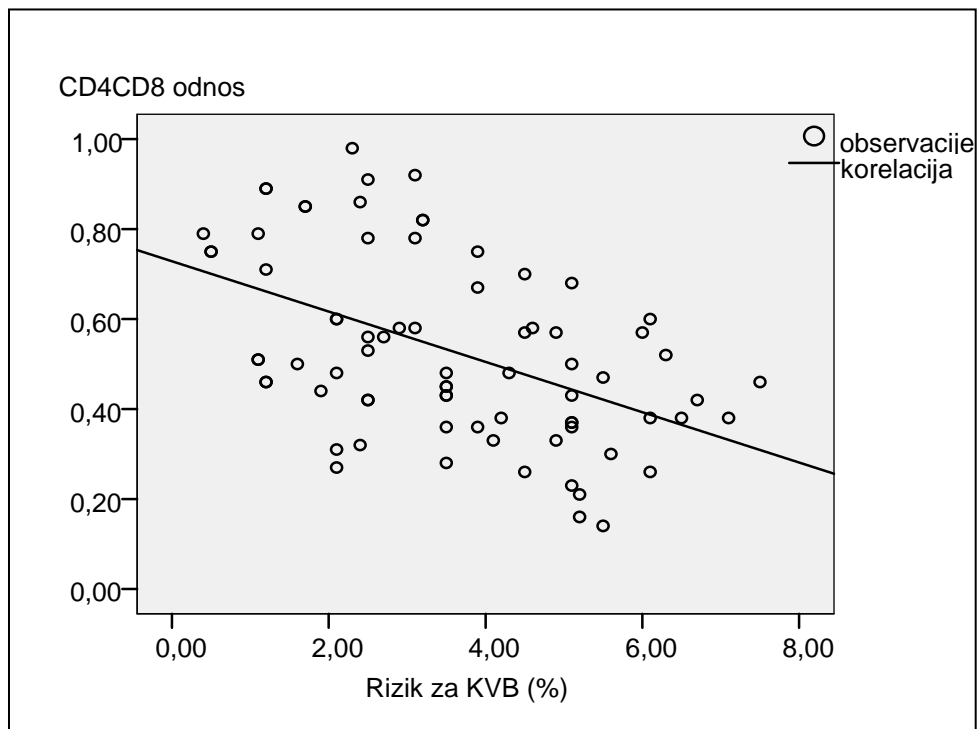
U tabeli su prikazani korelacioni koeficijenti- Spearman's rho, između CD4/CD8, CRP-a i rizika za KVB.

Bazično, prije početka terapije CD4/CD8 odnos, CRP i rizik za KVB nisu u značajnoj korelaciji  $p > 0,05$ . Ovakva korelacija se zadržala i nakon početka terapije, u trećem i šestom mjesecu. Nakon dvaneastog mjeseca terapije CD4/CD8 odnos je u korelaciji sa rizikom za KVB ( $\rho = -0,409$ ;  $p = 0,0001$ ). Korelacija je srednje jaka i negativna, što je veći CD4/CD8 odnos, manja je vjerovatnoća (%) za KVB. Nakon 18 mjeseci cART, CD4/CD8 odnos je u negativnoj i srednje jakoj korelaciji i sa CRP-om i sa rizikom za KVB ( $\rho = -0,483$  i  $\rho = 0,483$ ;  $p < 0,01$ ). Što je veći CD4/CD8 odnos, manje su vrijednosti CRP-a i manji je rizik za KVB.

Ista, negativna i srednje jaka korelacija sa CRP-om (Grafikon 14.) i rizikom za KVB (Grafikon 15.) se zadržala i nakon 24 mjeseca cART.



Grafikon 14. Dijagram rasturanja (eng. scatter dot), korelacije između CRP-a i CD4/CD8 nakon 24 mjeseca cART.



Grafikon 15. Dijagram rasturanja (scatter dot), korelacije između rizika za KVB i CD4/CD8 nakon 24 mjeseca cART

Tabela 27. Povezanost (korelacije) CRP-a i rizika za KVB, bazično i tokom 24 mjeseca cART

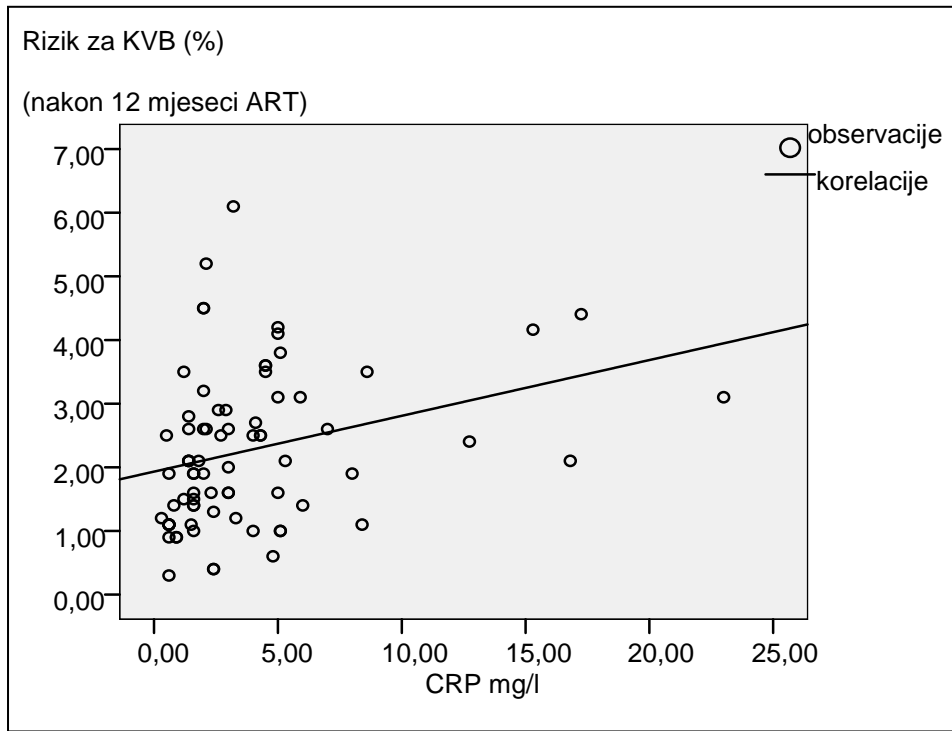
CRP mg/l	Spearman's rho	Rizik za KVB(%)
Bazično, prije početka cART	koeficijet korelacije	,217
	p	,059
	N	76
3 mjeseca cART	koeficijet korelacije	,187
	p	,107
	N	76
6 mjeseci cART	koeficijet korelacije	,044
	p	,705
	N	76
12 mjeseci cART	koeficijet korelacije	,328
	p	,004
	N	76
18 mjeseci cART	koeficijet korelacije	,747
	p	,0001
	N	76
24 mjeseca cART	koeficijet korelacije	,710
	p	,0001
	N	76

N-uzorak; koeficijet korelacije - rho; p.vjerovatnoća

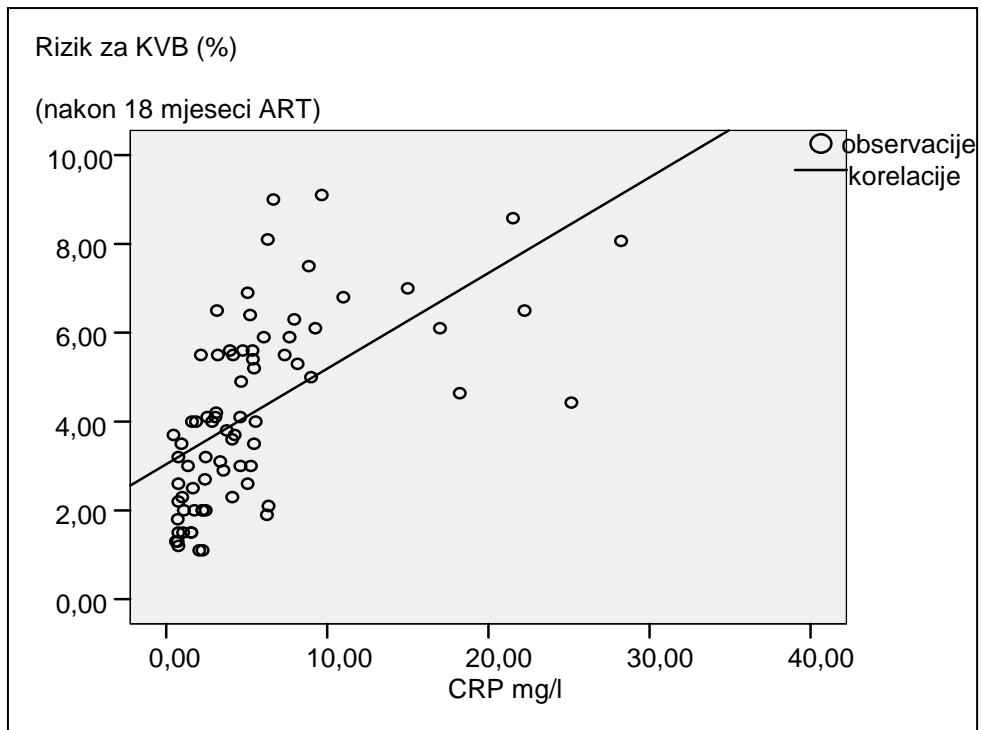
U tabeli su prikazani korelacioni koeficijenti- Spearman's rho, CRP-a i rizika za KVB.

Bazično, prije početka terapije CRP i rizik za KVB nisu u značajnoj korelaciji  $p > 0,05$ . Ovakva korelacija se zadržala i nakon početka terapije u trećem i šestom mjesecu. Nakon dvaneastog mjeseca terapije CRP je u korelaciji sa rizikom za KVB ( $\rho = 0,328$ ;  $p = 0,004$ ). Korelacija je blaga i pozitivna, što su veće vrijednosti CRP-a veći je rizik za KVB (Grafikon 16.).

Nakon 18 mjeseci cART, CRP je u pozitivnoj i jakoj korelaciji sa rizikom za KVB, ( $\rho = 0,747$ ;  $p = 0,0001$ ). Ista jaka korelacija zadržala se i nakon 24 mjeseca cART. Visoke vrijednosti CRP-a imali su ispitanici sa višim rizikom za KVB (Grafikon 17.).



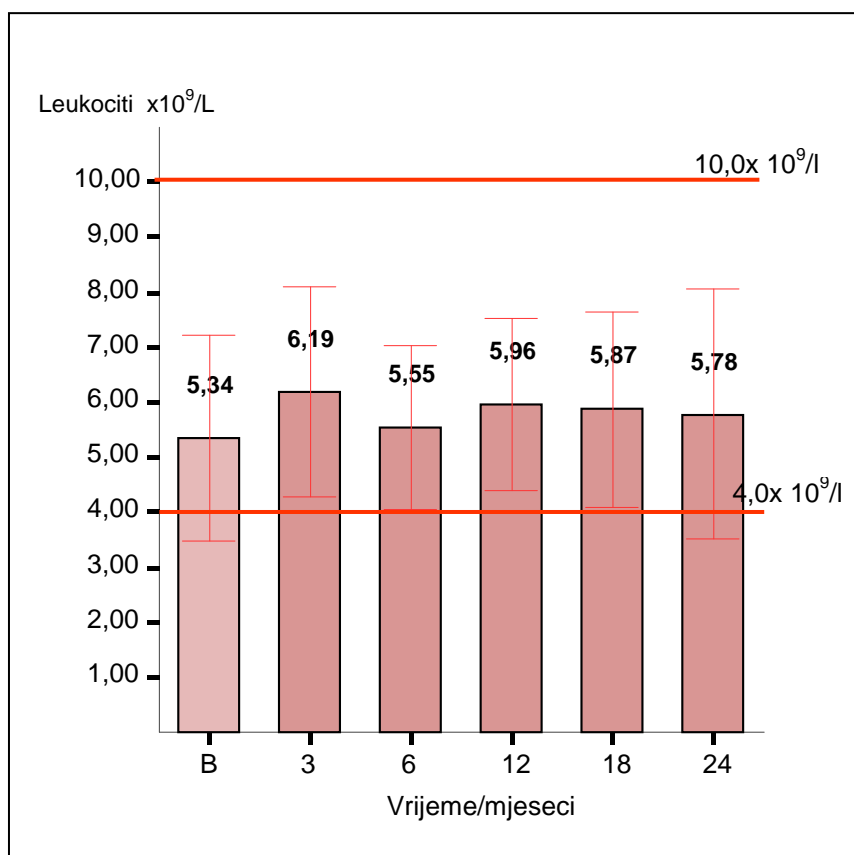
Grafikon 16. Dijagram rasturanja (engl. scatter dot), korelacija između CRP-a i rizika za KVB nakon 12 mjeseci cART.



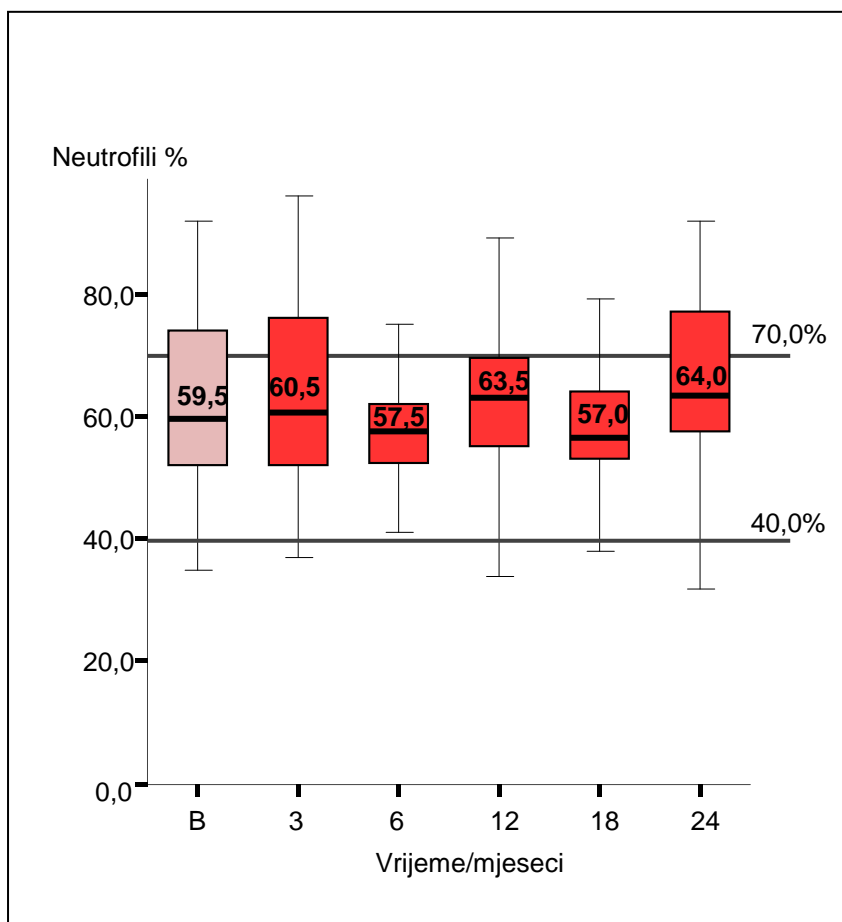
Grafikon 17. Dijagram rasturanja (eng. scatter dot), korelacija između CRP-a i rizika za KVB nakon 18 mjeseci cART.



## 7.5. Analiza trenda promjena nespecifičnih parametara upale tokom ART



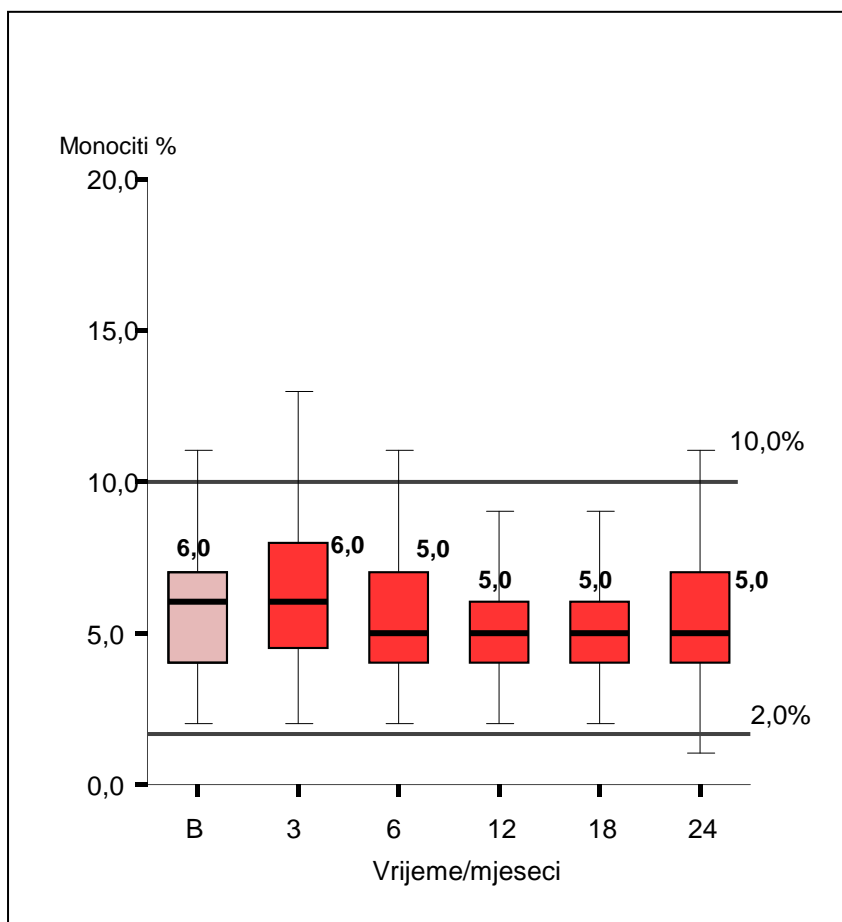
Grafikon 18. Analiza trenda promjena leukocita bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART. Prosječne vrijednosti leukocita su se kretale u okvirima referentnih vrijednosti između 4,0-10,0 x10<sup>9</sup>/l, trend promjena vrijednosti leukocita u toku 24 mjeseca nije statistički značajan p>0,05. Bazično prije početka cART prosječne vrijednosti leukocita iznosile su 5,34 ± 1,88 x10<sup>9</sup>/l. Nakon 3 mjeseca od početka cART prosječne vrijednosti leukocita iznosile su 6,12 ± 1,91 x10<sup>9</sup>/l. Nakon 6 mjeseci od početka cART prosječne vrijednosti leukocita iznosile su 5,55 ± 1,50 x10<sup>9</sup>/l. Nakon 12 mjeseci od početka cART prosječne vrijednosti leukocita iznosile su 5,96 ± 1,58 x10<sup>9</sup>/l. Nakon 18 mjeseci od početka cART prosječne vrijednosti leukocita iznosile su 5,87 ± 0,1,77 x10<sup>9</sup>/l. Nakon 24 mjeseca od početka cART prosječne vrijednosti leukocita iznosile su 5,78 ± 2,28 x10<sup>9</sup>/l.



Grafikon 19. Analiza trenda promjena neutrofila bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

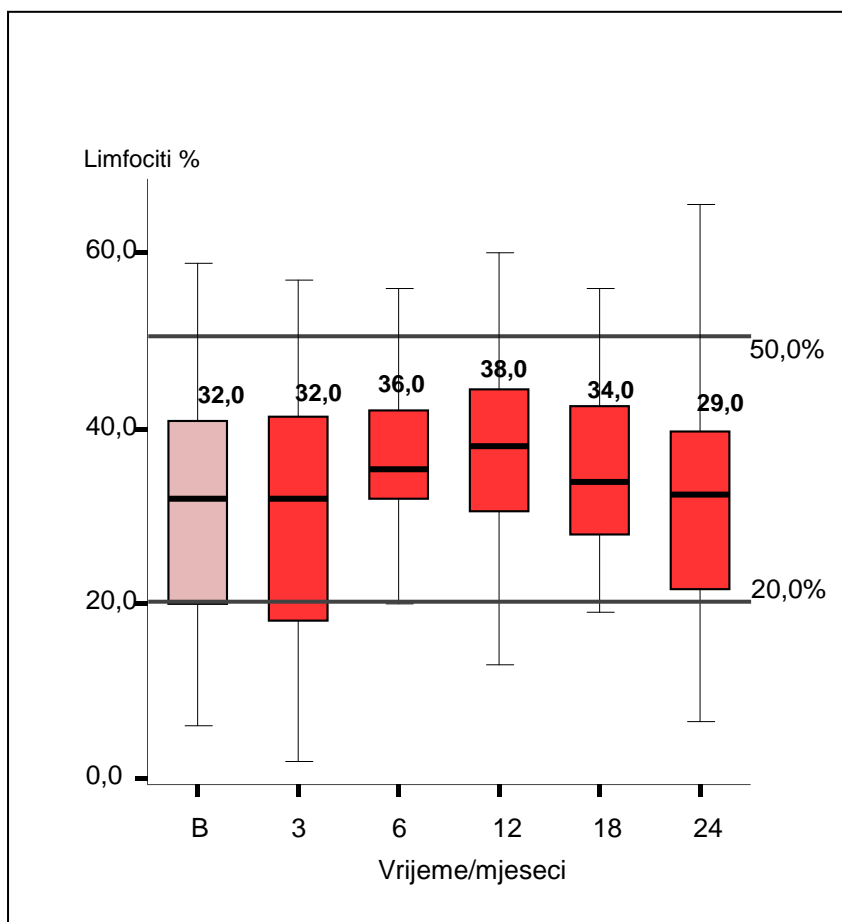
Prosječne vrijednosti neutrofila su se kretale u okvirima referentnih vrijednosti između 40-70%. Bazično prosječne vrijednosti neutrofila iznosile su 59,5% (52,0-74,5 %), na ART na kraju opservacionog perioda prosječne vrijednosti iznosile su 63,5% (53,0-77,0 %).

Trend promjena neutrofila nema statističkog značaja  $p > 0,05$ .



Grafikon 20. Analiza trenda promjena monocita bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART. Prosječne vrijednosti monocita su se kretale u okvirima referentnih vrijednosoti između 2-10 %, trend promjena vrijednosti monocita u toku 24 mjeseca nije statistički značajan  $p>0,05$ .

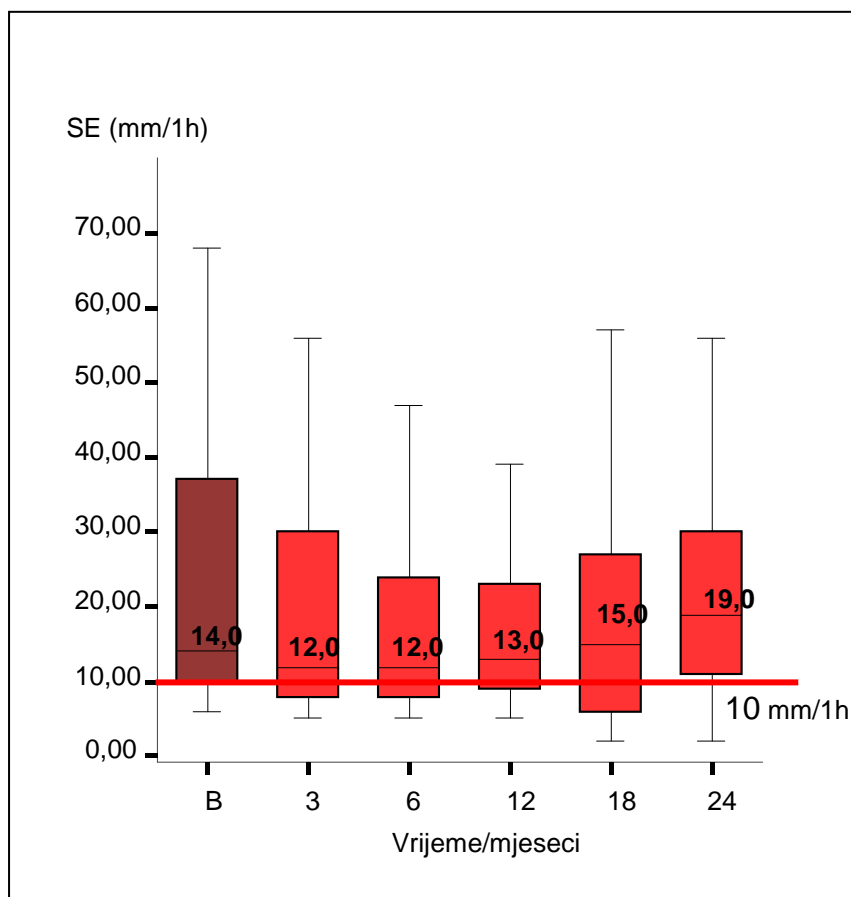
Bazično prije početka cART prosječne vrijednosti monocita iznosile su 6,0% (4,0-7,0%), nakon tri mjeseca ART 6,0% (4,2-8,0 %), i ovaj prosjek se održavao do kraja 24 mjeseca, kada su prosječne vrijednosti monocita iznosile 5,0% (4,0-7,0%).



Grafikon 21. Analiza trenda promjena limfocita bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

Prosječne vrijednosti limfocita su se kretale u okvirima referentnih vrijednosti između 20-50%. Bazično prosječne vrijednosti limfocita iznosile su 32% (20-41%), kao i u trećem mjesecu nakon početka cART 32% (18-41,7%). Potom slijedi blagi trend rasta do 12 mjeseca 38 % (30,2-44,7 %), a potom blagi trend pada do 24 mjeseca 29,0% (18-36,0 %).

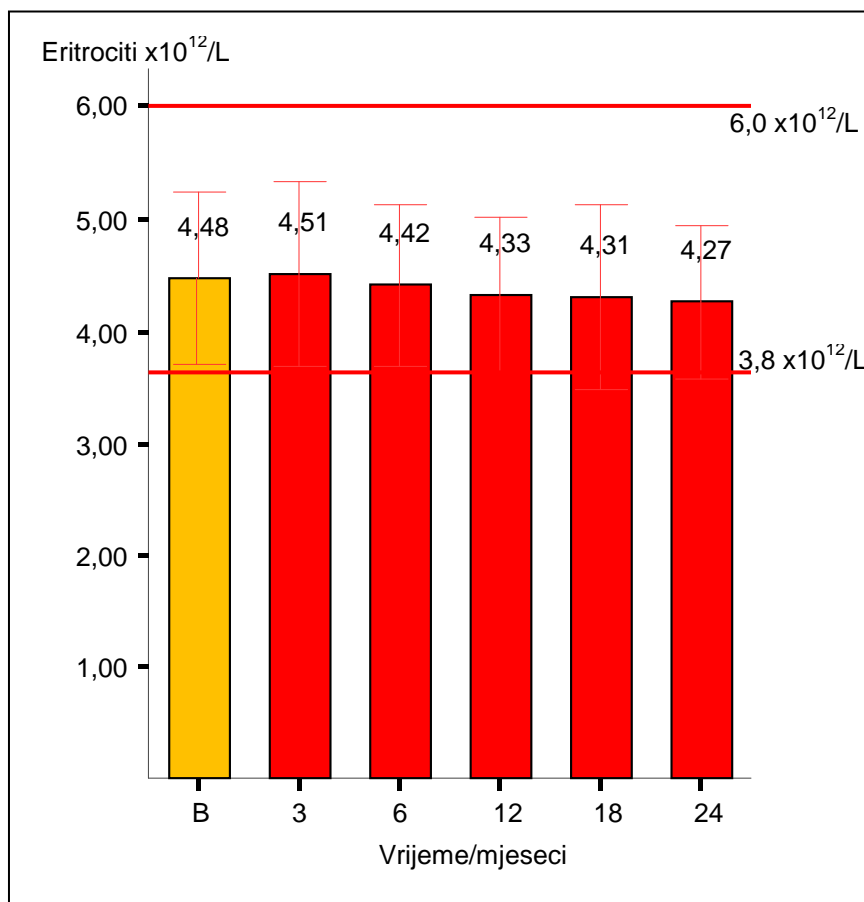
Prikazani trend promjena limfocita je statistički značajan  $p < 0,05$ .



Grafikon 22. Analiza trenda promjena sedimentacije (SE) bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

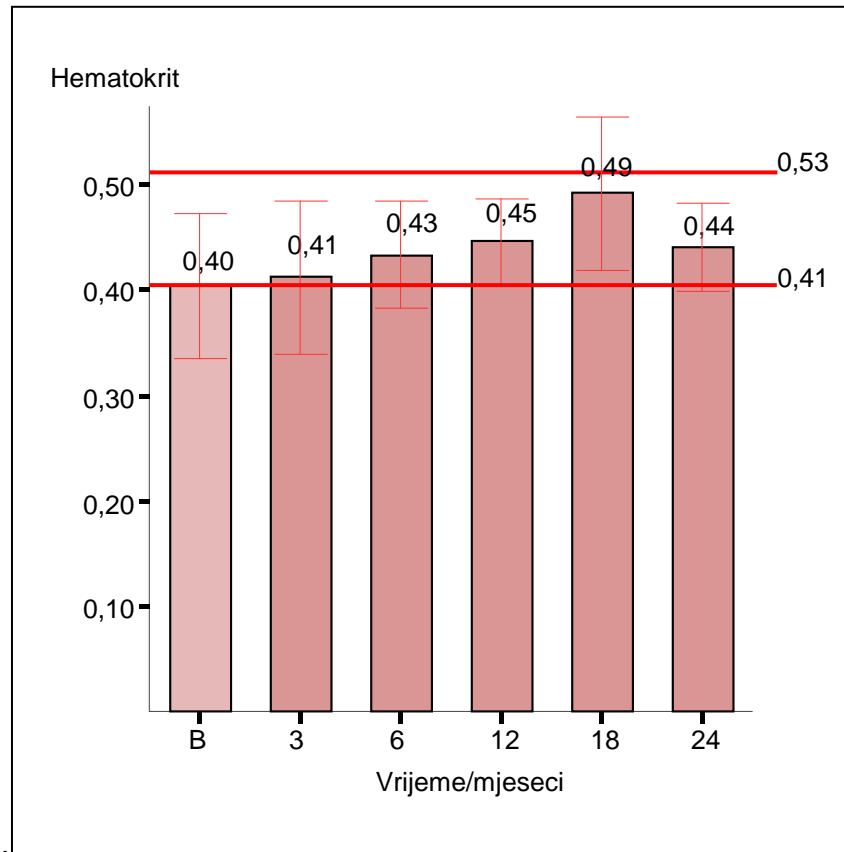
Prosječne vrijednosti SE su se kretale iznad referentnih vrijednosti >10 mm/h. Bazično i do dvanaestog mjeseca nema statistički značajnih promjena prosječnih vrijednosti SE  $p < 0,05$ , od osamnaestog mjeseca do 24 mjeseca sedimentacija je u blagom rastu, i taj porast je statistički značajan  $p = 0,0001$ . Bazično prosječne SE iznosile su 14,0 mm/h (10-38 mm/h), nakon početka cART u osamnaestom mjesecu 15,0 mm/h (6-27 mm/h), a na kraju opservacionog perioda evidentirane su najviše prosječne vrijednosti 19 mm/h (11-30 mm/h).

## 7.6. Analiza trenda promjena krvne slike bazično i tokom cART.



Grafikon 23. Analiza trenda promjena eritrocita bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART. Prosječne vrijednosti eritrocita su se kretale u okvirima referentnih vrijednosti između 3,8-6,0 x10<sup>12</sup>/l, trend promjena vrijednosti eritrocita u toku 24 mjeseca nije statistički značajan p>0,05.

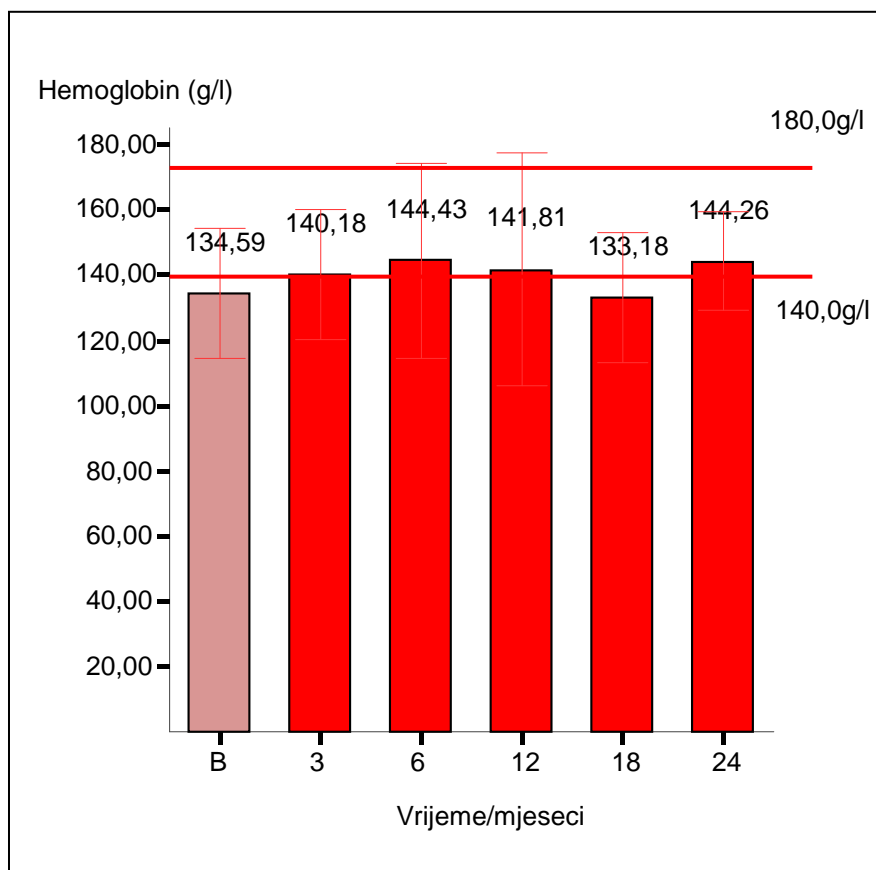
Bazično, prije početka cART prosječne vrijednosti eritrocita iznosile su 4,48 ± 0,78 x10<sup>12</sup>/l. Nakon 3 mjeseca od početka cART prosječne vrijednosti eritrocita iznosile su 4,51 ± 0,83 x10<sup>12</sup>/l. Nakon 6 mjeseci od početka cART prosječne vrijednosti eritrocita iznosile su 4,42 ± 0,73 x10<sup>12</sup>/l. Nakon 12 mjeseci od početka cART prosječne vrijednosti eritrocita iznosile su 4,33 ± 0,69 x10<sup>12</sup>/l. Nakon 18 mjeseci od početka cART prosječne vrijednosti eritrocita iznosile su 4,31 ± 0,82 x10<sup>12</sup>/l. Nakon 24 mjeseca od početka cART prosječne vrijednosti eritrocita iznosile su 4,27 ± 0,70 x10<sup>12</sup>/l.



Grafikon 23. Analiza trenda promjena hematokrita bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

Prosječne vrijednosti hematokrita nakon početka ART kretale u okvirima referentnih vrijednosti 0,41-0,53,

Bazično, su se vrijednosti hematokrita kretale  $0,40 \pm 0,07$ , odnosno na donjoj referentnoj granici od 0,41, ali bez statistički značajnog odstupanja od iste ( $p > 0,05$ ). Dalje, vrijednosti hematokrita rastu do 18 mjeseca na cART ( $0,49 \pm 0,6$ ) i taj trend rasta je statistički značajan ( $p < 0,05$ ), da bi se u 24 mjesecu zabilježio blagi pad na  $0,44 \pm 0,4$ .

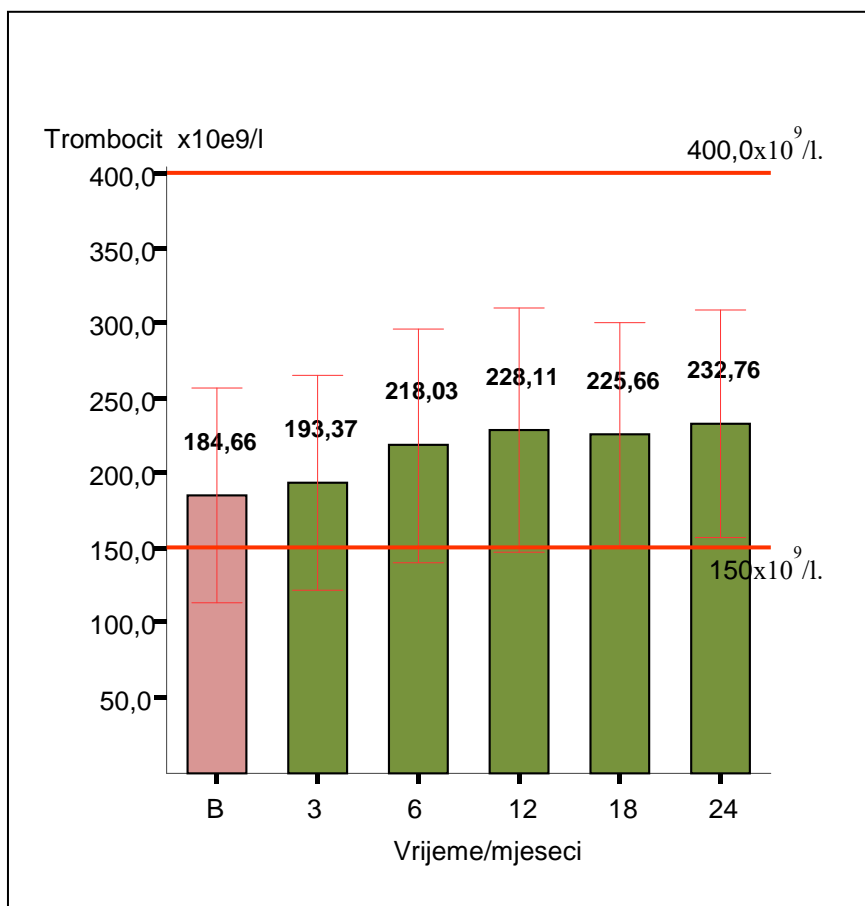


Grafikon 23. Analiza trenda promjena hemoglobina bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

Bazično vrijednosti hemoglobina kretale su se  $134,59 \pm 19,82$  g/l i ispod su donje referentne granice, a to odstupanje je statistički značajno  $p=0,02$ .

Na cART hemoglobin ima statistički značajan trend rasta ( $p<0,05$ ), tako da vrijednosti istog u 6 mjesecu iznose  $144,43 \pm 3,0,16$  g/l. U daljem toku opet se bilježi značajan pad na  $141,81 \pm 35,62$  g/l, da bi na kraju opservacionog perioda od 24 mjeseca njegove vrijednosti porasle na  $144,26 \pm 24$  g/l, odnosno bile u okvirima referentnih vrijednosti 140,0-180,0 g/l.



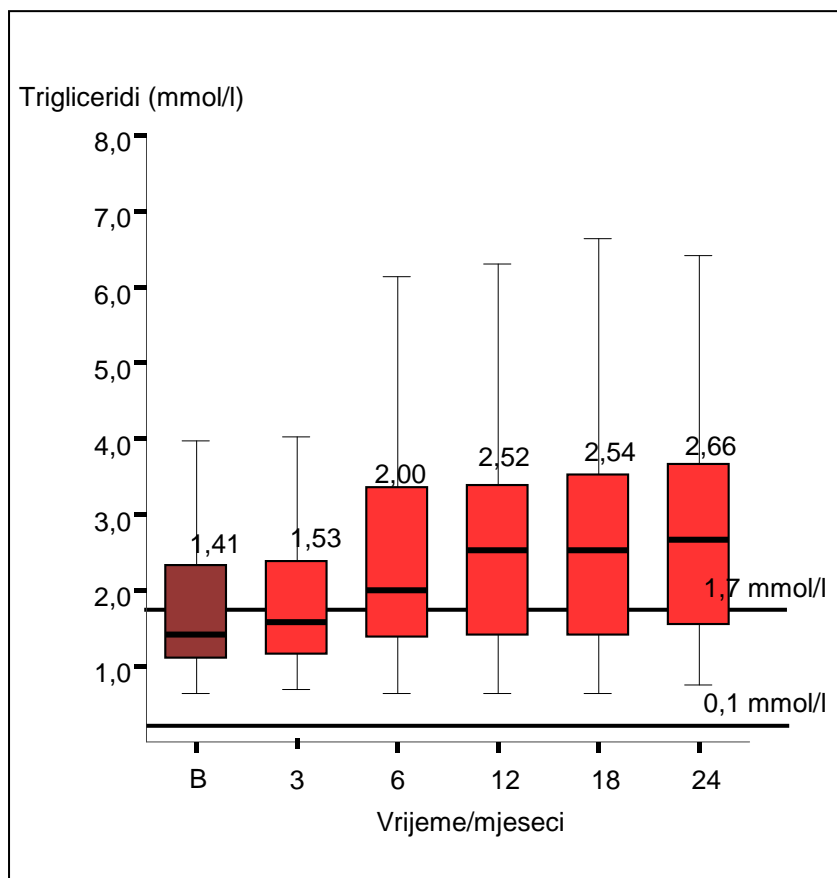


Grafikon 24. Analiza trenda promjena trombocita bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

Prosječne vrijednosti trombocita su se kretale u okvirima referentnih vrijednosti između 150,0-400,0 x10<sup>9</sup>/l, trend promjena vrijednosti trombocita u toku 24 mjeseca je statistički značajan p<0,05. Taj trend se odnosi na prelaz između 3 i 6. mjeseca terapije.

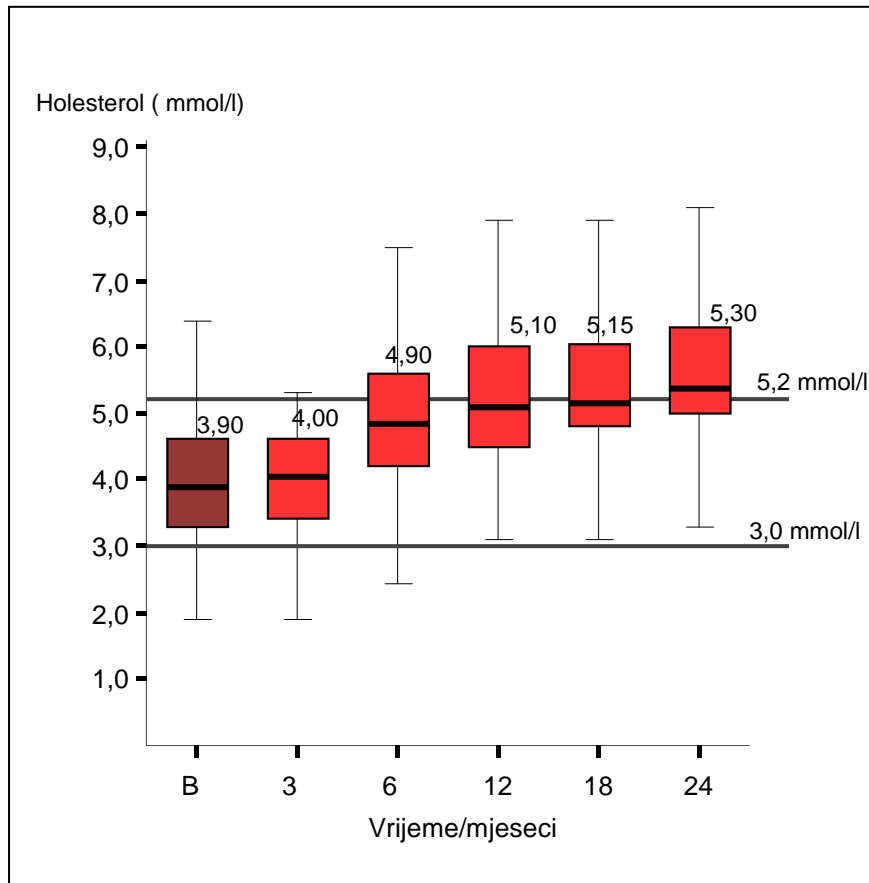
Bazično, prije početka cART, su prosječne vrijednosti trombocita iznosile 184,66 ±71,38 x10<sup>9</sup>/l. Nakon tri mjeseca od početka cART prosječne vrijednosti trombocita su iznosile 193,37 ± 72,0 x10<sup>9</sup>/l. Nakon 6 mjeseci od početka cART prosječne vrijednosti trombocita iznosile su 218,03 ± 81,34 x10<sup>9</sup>/l. Nakon 12 mjeseci od početka cART prosječne vrijednosti trombocita iznosile su 228,11 ± 81,34 x10<sup>9</sup>/l. Nakon 18 mjeseci od početka cART prosječne vrijednosti trombocita iznosile su 225,66 ± 74,09 x10<sup>9</sup>/l. Nakon 24 mjeseca od početka cART prosječne vrijednosti trombocita iznosile su 232,76 ± 2,28 x10<sup>9</sup>/l.

## 7.7. Analiza trenda promjena lipidograma i ITM, bazično i tokom cART



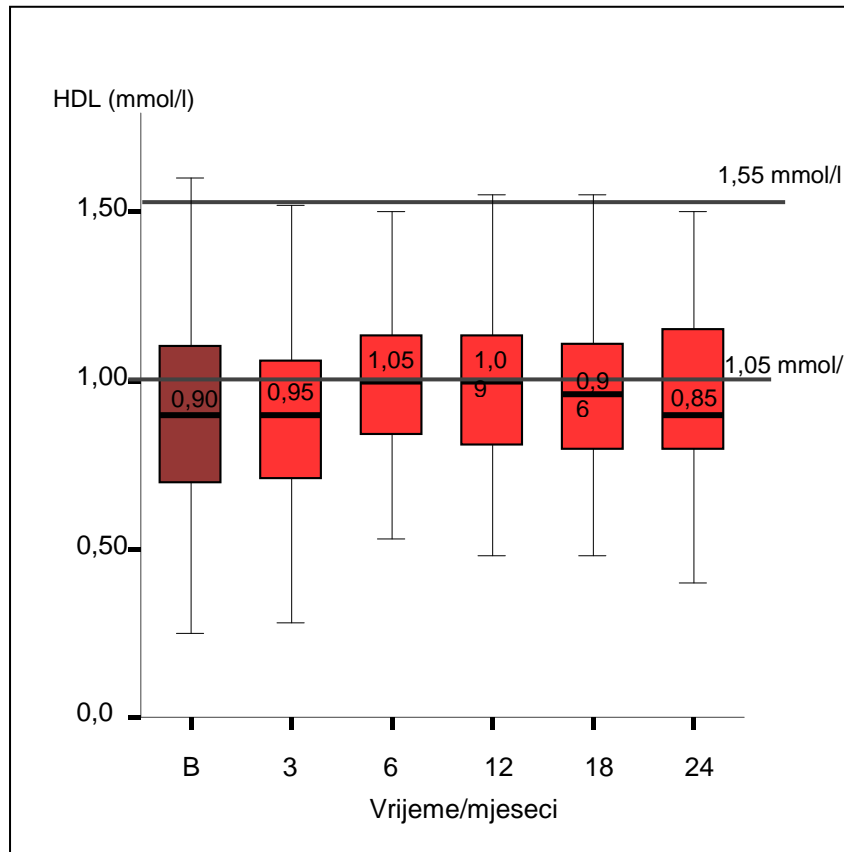
Grafikon 25. Analiza trenda promjena triglicerida bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

Bazično i nakon 3 mjeseca cART prosječne vrijednosti triglicerida su se kretale u okvirima referentnih vrijednosti 0,1-1,7 mmol/l, i iznosile su bazično 1,41 mmol/l (1,09-2,35 mmol/l) i nakon tri mjeseca 1,53 mmol/l (1,10-2,40 mmol/l). Nakon tri mjeseca terapije postoji statistički značajan trend rasta ( $p < 0,05$ ) triglicerida, već nakon šest mjeseci trigliceridi su prešli gornju referentnu granicu i iznosili 2,0 mmol/l (1,39-3,46 mmol/l). Trend blagog rasta zadržao se do 24 mjeseca, kada i prosječne vrijednosti triglicerida 2,66 mmol/l (1,56-3,73 mmol/l) bile statistički značajno ( $p = 0,001$ ) iznad gornje referentne granice.



Grafikon 26. Analiza trenda promjena holesterola bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

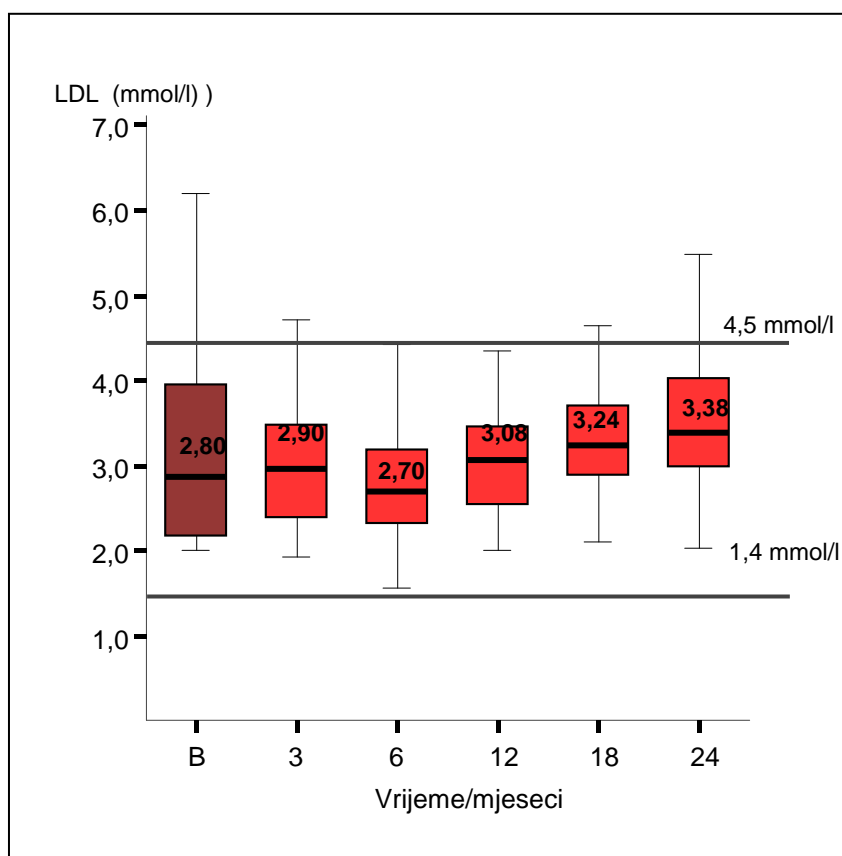
Bazično i nakon 3 mjeseca cART prosječne vrijednosti holesterola su se kretale u okvirama referentnih vrijednosti 3,0-5,2 mmol/l, i iznosile su bazično 3,90 mmol/l (3,30-4,60 mmol/l), a nakon tri mjeseca 4,0 mmol/l (3,40-4,60 mmol/l). Nakon 6 mjeseci terapije postoji statistički značajan trend rasta ( $p < 0,05$ ) holesterola 4,90 mmol/l (4,20-5,60 mmol/l) sve do 24 mjeseca, kada i prosječne vrijednosti prelaze gornju referentnu vrijednost od 5,30 mmol/l (5,0-6,30 mmol/l). Od 12 do 24 mjeseca prosječne vrijednosti holesterola su se približile gornjoj granici, nakon 12 mjeseci holesterol je u prosjeku iznosio 5,10 mmol/l (4,5-6,0 mmol/l), nakon 18 mjeseci 5,15 mmol/l (4,80-6,08 mmol/l) i nakon 24 mjeseca 5,30 mmol/l (4,95-6,20 mmol/l).



Grafikon 27. Analiza trenda promjena HDL-a bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART Bazično i nakon 3 mjeseca cART prosječne vrijednosti HDL-a su se kretale ispod donje referentne vrijednosti 1,05 mmol/l, i iznosile su bazično 0,95 mmol/l (0,70-1,10 mmol/l).

Nakon tri mjeseca 0,95 mmol/l (0,75-1,05mmol/l), nakon 6 mjeseci terapije postoji statistički značajan trend rasta ( $p < 0,05$ ) HDL-a 1,05 mmol/l (0,85-1,15 mmol/l) sve do 12 mjeseci, kada i prosječne vrijednosti prelaze gornju referentnu vrijednost, 1,09 mmol/l (0,80-1,15 mmol/l). Od 12 do 24 mjeseca prosječne vrijednosti HDL-a značano se smanjuju ( $p < 0,05$ ) i ispod su donje referentne granice, tako da nakon 18 mjeseci HDL je u prosjeku iznosio 0,96 mmol/l (0,80-1,12 mmol/l), sto je približno vrijednostima nakon 24 mjeseca 0,90 mmol/l (0,80-1,18 mmol/l).

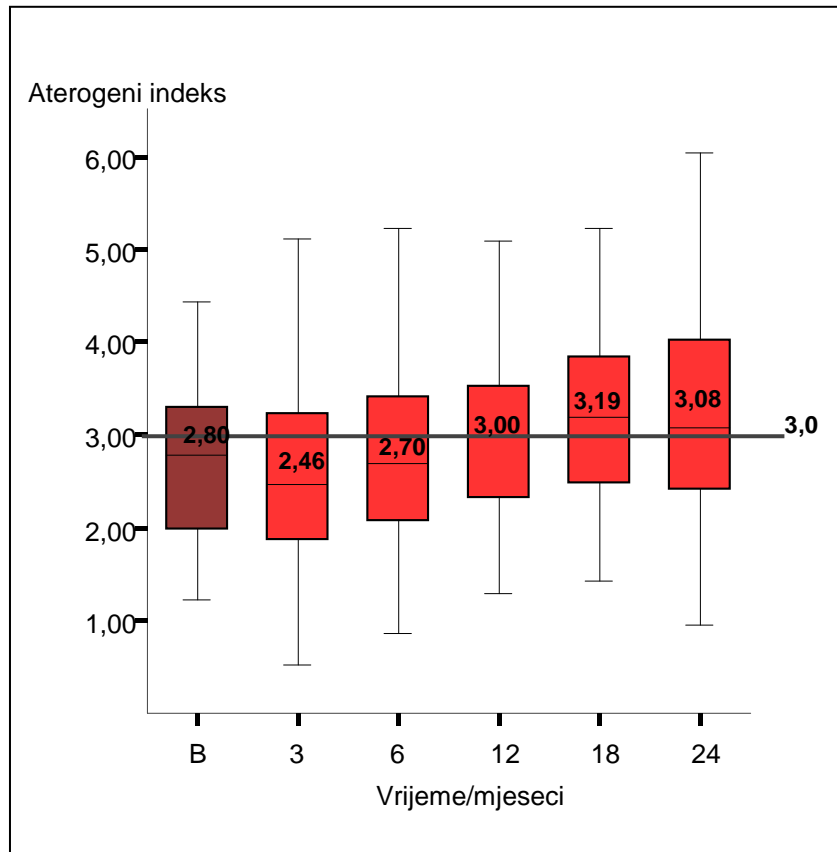
Opisani trend promjena vrijednosti HDL-a je statistički značajan  $p < 0,05$ .



Grafikon 28. Analiza trenda promjena LDL-a bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

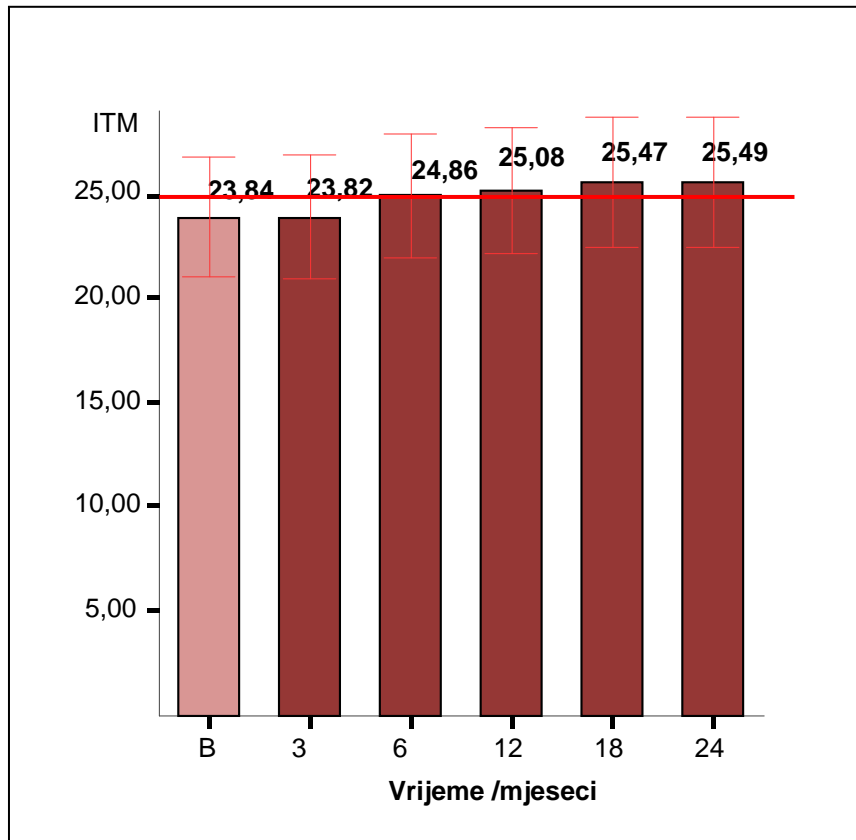
Bazično, nakon 3 i 6 mjeseci cART prosječne vrijednosti LDL-a su se kretale u okvirima referentnih vrijednosti 1,4-4,5 mmol/l.

Bazično, LDL iznosio je 2,80 mmol/l (2,17-3,98 mmol/l), nakon 3 mjeseca 2,90 mmol/l (2,29-3,40 mmol/l) i nakon 6 mjeseci 2,70 mmol/l (2,33-3,21 mmol/l). Nakon 6 mjeseci počinje statistički značajan rast ( $p=0,001$ ) LDL-a ka gornjoj referentnoj granici, u 12 mjesecu iznosio je 3,08 mmol/l (2,54–3,5 mmol/l) nakon 18 mjeseci 3,24 mmol/l (2,89-3,70 mmol/l). Trend rasta LDL-a održava do 24 mjeseca kada su prosječne vrijednosti iznosile 3,38 mmol/l (3,0-4,04 mmol/l).



Grafikon 28. Analiza trenda promjena aterogenog indeksa bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

Bazično, nakon 3 i 6 mjeseci cART u prosjeku aterogeni indeks bio je ispod referentne granice od 3. Nakon šest mjeseci postoji statistički značajan trend promjene, odnosno rasta aterogenog indeksa ( $p=0,001$ ), tako da je aterogeni indeks nakon 18 i 24 mjeseca bio iznad referentne granice od 3, i iznosio u prosjeku 3,19 (2,55-3,8) odnosno 3,08 (2,41-4,04).



Grafikon 28. Analiza trenda promjena ITM-a bazično (B) i tokom od 24 mjeseca cART

Postoji statistički značajan trend rasta ITM tokom 24 mjeseca cART  $p=0,0001$ .

Bazične vrijednosti ITM (prije početka cART) iznosile su u prosjeku  $23,84 \pm 2,84$ , nakon 3 mjeseca  $23,82 \pm 2,96$ , nakon 6 mjeseci  $24,86 \pm 3,05$  i bile su u prosjeku u kategoriji normalno uhranjenih ( $ITM < 25$ ). Nakon 12 mjeseci prosječne vrijednosti ITM su prešle u kategoriju pretjerane težine ( $ITM > 25$ ), i iznosile su  $25,08 \pm 3,03$ , nakon 18 mjeseci  $25,47 \pm 3,11$ , a nakon 24 mjeseca  $25,49 \pm 3,08$ .

## 8. DISKUSIJA

Istraživanje je pokazalo da kod pacijenata sa HIV infekcijom na cART veći odnos CD4/CD8 i terapijski režim NNRTIs+NRTI u odnosu na PI+NRTI djeluju protektivno na razvoj KVB, dok su više vrijednosti CRP-a u korelaciji sa većim rizikom za KVB. Takođe u istraživanju je dokazano da CRP i CD4/CD8 odnos mogu biti markeri koji razlikuju srednji/nizak stepen rizika KVB nakon 12 mjeseci cART.

U toku posljednje dvije decenije, zahvaljujući otkriću novih lijekova i upotrebi visoko aktivne antiretrovirusne terapije, došlo je do značajnog povećanja životnog vijeka HIV/AIDS bolesnika. Shodno tome vođenje pacijenata sa HIV infekcijom, osim terapijskog izbora ART, prešao je na upravljanje dugoročnim komplikacijama hronične HIV infekcije, negativnim i sporednim efektima ART i poboljšanju kvaliteta života pacijenata sa HIV-om naročito u razvijenim zemljama. U slabije razvijenim zemljama i zemljama u razvoju, rastuća incidenca HIV infekcije s jedne strane, a nizak standard s druge strane, predstavlja osnovni problem u tretmanu i kliničkom vođenju HIV/AIDS bolesnika. Stoga se traga za pojednostavljenim protokolom u vođenju HIV/AIDS-a i za jeftinijim i bržim markerima za praćenje aktivnosti bolesti, efikasnosti terapije i prognoze hroničnih ne-AIDS bolesti (79).

Presječna studija Kim SB i sar. analizirala je prediktivne faktore na KVB kod HIV inficiranih pacijenata tokom deset godina visokoaktivne antiretrovirusne terapije u odnosu na populaciju HIV neinficiranih uz pomoć Framinghmovog rizik skora (FRS). Rezultati ove studije ukazuju da nije bilo razlike u riziku za KVB u odnosu prisutvo/odsustvo HIV infekcije, kao ni na tip terapijskog režima kod HIV inficiranih (NNRT u odnosu na PI teraoijski izbor). Autori ovo objašnjavaju činjenicom da je korišten FRS u za čiji proračun nije potrebno navoditi terapijski profil kao što je slučaj sa D:A:D kalkulatorom. Model D:A:D izračunava rizik za KVB budući starost, pol, sistolni krvni pritisak, status pušenja, porodična istorija KVB, dijabetes, ukupni holesterol, HDL holesterol, tretman i dužinu tretmana lijekovima: indinavir, lopinavir/ritonavir i abakaviru (108).

Naši rezultati su slični rezultatima Sankatsing RR i sar. koje su dobili u presječnoj studiji mjerenjem debljine intime medije karotidne arterije. HIV inficirani na cART duže od 24 mjeseca koja uključuje NNRT u odnosu na PI imali su manji rizik KVB. Naime, autori su također dobili da je mjerenje debljine intime medije validan surogat marker za KVB, koji



su računali pomoću FRS. U zaključku ove studije autori podvlače da su u praćenju rizika za KVB neizostavni i markeri tradicionalnog rizika KVB (starost, spol, pušački status, lipidi i sl.), te da se na iste mora računati u sklopu terapijskog odabira i daljeg kliničkog monitoringa HIV/AIDSa (109).

U prilog našim rezultatima je i studija Kiage JN i sar. Rezultati ove studije ukazuju na to da su terapijski modeli prve linije cART-a u koji nisu uključivali inhibitore proteaze (PI) povezani sa kardioprotektivnim lipidnim profilima koji karakteriše značajno povećanje HDL-a i smanjenje ukupnog holesterola (110).

Nekoliko studija ustanovilo pozitivnu povezanost između cART i KVB rizika, takođe postoje suprotni podaci koji pokazuju da cART može poboljšati endotelnu funkciju i ispoljavati protektivne efekte u pogledu nastanka ateroskleroze. Interesantno je da razlike postoje u relativnom riziku za nastanak KVB između i unutar klasa antiretrovirusnih lijekova. U literaturnim podacima pronađene su informacije o štetnim događajima anti-HIV lijekova (D:A:D studija) kojima je pokazana povezanost između korištenja specifičnih inhibitora proteaze, abakavira i didanozina i povećanog rizika za nastanak infarkta miokarda, mada naknadno sprovedene studije nisu potvrdile ovakav rezultat (111).

U našoj studiji u regresionom modelu, koji je osim tradicionalnih riziko faktora za KVB, sadržavao CRP, CD4/CD8 odnos i cART, pokazali smo da nakon 24 mjeseca ART, terapijska kombinacija NNRT+NRT u odnosu na PI+NRT ima prediktivni značaj na rizik KVB. Terapija (cART) u ovom regresionom modelu prvi put je nakon 24 mjeseca pokazala statistički značajan nezavistan uticaj na rizik za KVB ( $\beta=0,197$ ;  $p=0,013$ ) zajedno sa ITM, starošću ispitanika, kao i vrijednostima CRP-a i CD4/CD8 odnosa ( $p<0,05$ ). Ispitanici koji su u kombinovanoj terapiji imali PI, imali su veći rizik za KVB.

Rezultati mnogih studija koje su ispitivale povezanost CD4/CD8 odnosa ili broja CD8 sa morbiditetom i mortalitetom kod HIV-inficiranih pacijenata na ART bile su protivrječne. Broj CD4 koji je izmjeren pri ART startu gubi svoju prediktivnu vrijednost u daljem vremenu, kako dužina ART-a raste, dok je CD4/CD8 odnos, barem u nekim istraživanjima, dobro prognozira razvoj ne-AIDS bolesti i smrtnost nakon dugogodišnje ART (112).

Tako su Mussini i sar. su pokazali da je mali broj pacijenta podvrgnut ART uspio postići odnos CD4/D8  $>1$ , iako je uspješno postignuta virusna supresija. Nizak CD4/CD8 odnos bio je povezan sa povećanim rizikom za nastanak težih ne-AIDS oboljenja, kao i češće

smrtne ishode. Poredeći efekte u odnosu na različite terapijske kombinacije ovom studijom je pokazano je da kombinacija lijekova tenofoviar i emtricitabina bila povezana s bržim postizanjem normalizacije CD4/CD8 odnosa u odnosu na kombinacije lijekova starijije generacija NRTI. Kao moguće objašnjenje autori ističu da kombinacija lijekova tenofoviar i emtricitabina ispoljava ispoljava manji toksični učinak na koštanu srž. Njihovi rezultati sugerišu na činjenicu da je potpuni oporavak imunske disfunkcije izazvane HIV virusom rijetka pojava, bez obzira na oporavak CD4 i da neravnoteža između CD4 i CD8 ćelija koja se održava kod ovih pacijenata može poslužiti kao važan biomarker za identifikaciju pacijenata sa najlošijom prognozom. Kao potencijalni patogeni mehanizam koji povezuje nizak odnos CD4/CD8 i veći rizik za nastanak ne-AIDS oboljenja, mogao bi biti u odgovoru da je nizak odnos marker dukotrajne aktivacije imuniteta. Na kraju autori zaključuju da bi nizak odnos CD4/CD8 kliničari mogli koristiti kao potencijalni biomarker rizika za nastanka non-AIDS oboljenja, nezavisno od oporavka CD4 ćelija (36).

U opštoj populaciji, odnos CD4/CD8 opada sa starošću i povezan je sa morbiditetom i mortalitetom uopšte. Tako se ovaj odnos smatra dobrim pokazateljem kumulativne upale i imunskih promjena povezanih sa starenjem (113).

Ovaj odnos može predstavljati kombinovani efekat upale i imunskih promjena koje se nazivaju "immuno inflamaging". Iako mehanizmi koji su u osnovi djelimične korekcije CD4/CD8 i trajno povećanog broja CD8 T ćelija kod dugotrajno liječenih pacijenata ostaju jos uvijek nerazjašnjeni, nedavne studije su pokazale da pacijenti sa značajnim oporavkom CD4 T ćelija i niskim odnosom CD4/CD8 i dalje imaju povećanu imunu aktivaciju i imaju veći rizik za ne-AIDS bolesti i veći rizik za smrtnost (93).

Naša studija pokazala je nizak odnos CD4/CD8 kod HIV pozitivnih pacijenata bazično prije terapije 0,21 (0,11-0,39), i značajan trend rasta ( $p < 0,05$ ) u toku terapije, bez obzira na terapijski režim. Ovaj odnos nije se pokazao značajnim prediktorom (u multivarijantnoj regresionoj analizi) za razvoj KVB u toku prvih 12 mjeseci cART ( $p > 0,05$ ). Od dvanaestog do dvadeset četvrtog mjeseca, ovaj odnos ima prediktivni značaj ( $p < 0,05$ ) za razvoj KVB (što je ovaj odnos veći rizik za razvoj KVB je manji). Predikciju su nezavisno multivarijanto pokazali starost i ITM ispitanika, odnosno što su ispitanici stariji i imaju veći *ITM* imaju i veći rizik za razvoj KVB.

Grupa autora, Serrano-Villar i sar. pokazala je da CD4/ CD8 odnos kod osoba zaraženih HIV-om, na ART, sa dobrim imunološkim odgovorom, može biti klinički korisni prediktor

ne-AIDS bolesti. Ista studija pokazala je negativnu korelaciju ovog odnosa sa debljinom intime-medije karotidne arterije i pozitivnu korelaciju sa glomerularnom filtracijom eGFR, odnosno da je CD4/CD8 manji kod ispitanika sa većim zadebljanjem intime medija karotidne arterije i da ispitanici sa većim CD4/CD8 imaju bolju glomerularnu filtraciju (114).

Dalje, studija Menozzi M. i sar. je pokazala da nizak odnos CD4/CD8 HIV inficiranih nije bio povezan sa prevalencom većeg broja komorbiditeta, ali pacijenti sa CD4/CD8 odnosom  $<0,8$  pokazali su veću prevalencu za rizik KVB. Kod multivarijantne logističke regresije CD4/CD8  $<0,8$  pokazao se kao značajan nezavisni preprediktor povećanog rizika KVB, što podržava ulogu imuno-aktivacije-starenja u patogenezi KVB (48).

U našoj studiji, CD4/CD8 odnos pokazao se kao značajan marker koji može razlikovati nizak rizik KVB (1-5%) od srednjeg rizika ( $>5-10\%$ ) za razvoj KVB već od dvanaestog mjeseca ART pa na dalje. U osamenaestom mjesecu vrijednosti CD4/CD8 veće od 0,44 mogu razlikovati nizak od srednjeg rizika sa senzitivnošću 72,2% i specifičnošću 63,6%. Sličan rezultat dobili smo i u dvadeset četvrtom mjesecu, kada su vrijednosti CD4/CD8 odnosa  $>0,53$  imale senzitivnost 66,0% i specifičnost 73,9%.

Kohortna studija Castilho JL i sar., je otkrila da nizak odnos CD4/CD8 nakon prve godine virološke supresije kod HIV-inficiranih odraslih bio nezavisno povezan sa ozbiljnim rizikom za KVB. Ova povezanost je bila najjača među pacijentima starosti ispod 50 godina, iako su analize bile ograničene malim brojem kardiovaskularnih događaja kod starijih pacijenata. Dobar odgovor na cART, bez obzira na borj CD4 limfocita, odnos CD4/CD8 je bio u jakoj korelaciji sa starošću ispitanika, što jako podržava tezu da odnos CD4/CD8 može biti marker imunskog starenja povezanog sa starenjem kod odraslih HIV inficiranih osoba (41).

Slične rezultate smo dobili u našem istraživanju, nakon 24 mjeseca ART. Značajni nezavisni prediktori u povećanju rizika za KVB su bili: ITM (Beta=0,303), veći ITM povećava rizik za KVB, nakon toga dob ispitanika (Beta=0,257), stariji ispitanici imaju veći rizik za KVB, zatim CRP (Beta=0,224), veće vrijednosti ovog parametra imaju ispitanici sa većim rizikom za KVB. CD4/CD8 odnos zadržao se kao značajan nezavisni prediktor između 12-24 mjeseca ART (Beta=-0,200) s tim da veći CD4/CD8 odnos smanjuje rizik za KVB.

Ograničeni resursi nerazvijenih, slabije razvijenih zemalja i zemalja u razvoju ukazuju na povećanu incidencu smrtnih događaja u početnim mjesecima nakon inicijacije antiretrovirusne terapije (ART). Stoga je neophodno pronalaženje jeftinijih, pouzdanih markera, kao alata za identifikaciju pacijenata sa najvećim rizikom od loših ishoda. Autori Chaisson LH i Sar. su analizirali povišene koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) u predviđanju neželjenih ishoda (smrtnosti) kod HIV pozitivnih pacijenata nakon inicijalne ART. Studija je sprovedena na dvije klinike u Ugandi na 1293 ispitanika i tokom tri mjeseca pokazala je da je rizik od smrtnosti u jakoj vezi sa povišenim bazičnim CRP-om i oportunističkim infekcijama. U zaključku su sugerisali da bazični CRP testovi, prije inicijalne ART, može smanjiti neželjene događaje identificiranjem onih koji imaju visok rizik za letalni ishod (115).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da su povišeni nivoi CRP su povezano sa nastankom ateroskleroze, odnosno uopšteno povezani za nastanak KVB (116). De Luca i sar. su pokazali da je CRP bio povezan a rizikom KVB, nezavisno o tradicionalnim kardiovaskularnim faktorima rizika, poput: replikacije HIV-a, kao i od tipa primljenjene ART-e u vrijeme praćenja HIV zaraženih pacijenata. Njihovi rezultati pokazuju da pacijenti sa vrijednostima CRP-a  $>3,3$  mg/l imaju osam puta već rizik za nastanak KVB u poređenju s pacijentima čiji je CRP iznosi  $<0,9$  mg/l. Studija je pokazala još i to da su veće vrijednosti ukupnog holesterola i niži nivoi HDL-a povećavali rizik za nastanak KVB nezavisno od CRP-a. Autori zaključuju da CRP može biti koristan dopunski biomarker za predikciju rizika nastanka KVB kod HIV-inficiranih pacijenata koji primaju cART (111).

Grupa autora Moran CA i sar., pokazala je da su u kohorti HIV negativnih žena sa sličnim faktorima rizika za KVB, bazične i više vrijednosti CRP-a su u pozitivnoj korelaciji sa napredovanjem plaka intime medije karotidne arterije, ali ne i HIV inficiranih žena, što ukazuje na to da je subklinička kardiovaskularna patogeneza plaka intime medie različita kod HIV inficiranih žena (117).

Komparativna studija Hanna DB i sar. provedena na HIV inficiranim u odnosu na HIV neinficirane osobe, pratila je tradicionalne markere rizika za KVB mjereći debljinu intime medije karotidne arterije. U poređenju sa neinficiranim ispitanicima, HIV-inficirani imali su više nivoa CRP-a, D-dimera, IL-6 i fibrinogena, a vrijednosti CRP-a i IL-6 su se značajno razlikovale kod HIV inficiranih u odnosu na HIV neinficirane. Razlike u nivoima CRP i IL-6 kod HIV pozitivnih bile su najveće u starosnoj grupi od 6 do 29 godina. Nakon

stratifikacije na HIV-inficirane pod terapijom ART i bez terapije, nivoi CRP-a i fibrinogena nisu se značajno razlikovali bez obzira na dob ispitanika. U zaključku ove studije se navodi da se efekti HIV-a na strukturu karotidne arterije mogu razlikovati tokom čitavog životnog vijeka. Tradicionalni prediktori rizika za KVB (dob, pol, pušački status, lipidni status, ART, itd.) imaju veću ulogu kod starijih, dok HIV infekcija ima manju ulogu kod starijih odraslih, u odnosu na mlađe ispitanike (118).

Ispitujući komparativno razlike u nivou CRP-a kod HIV inficiranih pacijenata sa srčanimi bez srčanih oboljenja, Westhorpe i sar. su pokazali da pacijenti sa prisutnim srčanim oboljenjima imaju blago više nivoe CRP-a u plazmi u odnosu na pacijente sa HIV-om bez prisutnih srčanih oboljenja, ali utvrđena razlika nije bila statistički značajna. Logističkom regresijom CRP nije se pokazao statistički značajnim prediktorom za nastanak KVB kod HIV inficiranih pacijenata. Autori vjeruju da nivoi CRP-a mogu ukazivati na povećani rizik od budućih srčanih događaja, ali da se takav rizik mora tumačiti na način da se tokom HIV infekcije uopšteno povećavaju nivoi CRP-a (119).

Rezultati naše studije ukazali su da bazično, prije početka terapije, nivo CRP-a i rizik za KVB nisu u značajnoj korelaciji  $p > 0,05$ . Ovakva korelacija se zadržala i nakon početka terapije i na dalje u trećem i šestom mjesecu. Nakon dvaneastog mjeseca terapije CRP je značajnoj pozitivnoj i blagoj korelaciji sa rizikom za KVB, što su veće vrijednosti CRP-a veći je rizik za KVB. Nakon 18 mjeseci cART, CRP je se zadržao pozitivnu, jaku korelaciju sa rizikom za KVB, a ista korelacija održala se i nakon 24 mjeseca od početka cART. Visoke vrijednosti CRP-a imali su ispitanici sa višim rizikom za KVB.

Vrijednosti CRP-a bazično i tokom 12 mjeseci cART terapije bile su ujednačene, bez značajnog trenda rasta ( $p > 0,05$ ). Bazično vrijednosti CRP-a su iznosile u prosjeku 2,45 mg/l (1,50-5,0 mg/l), a u dvanaestom mjesecu 2,4 mg/l (1,42-4,75 mg/l). Nakon 12 mjeseci su prosječne vrijednosti CRP-a statistički značajno porasle ( $p < 0,05$ ) i u osamnaestom mjesecu bile su 3,5 mg/l (2,1-5,10 mg/l). Trend blagog rasta nastavio se do 24 mjeseca, kada je CRP iznosio u prosjeku 3,9 mg/l (2,3-5,6 mg/l).

Prosječne vrijednosti (mediane) CRP-a tokom opservacije od 24 mjeseca bile su u okvirima referentnih granica, do 5,0 mg/l, dok su se vrijednosti oko 75 percentile, nakon 18 mjeseci kretale iznad referentne granice od 5,0 mg/l.

Studija McComsey GA i sar. je otkrila da su više bazične vrijednosti CRP povezane sa povećanom stopom progresije različitih ne-AIDS bolesti uključujući i KVB. Takoreći

pokazali su da viši nivoi nekoliko inflamatornih biomarkera (CRP, IL1, TNF alfa) povezani nezavisno od CD4 sa povećanim rizikom od AIDS ili ne-AIDS događaja. HIV infekcija je povezana sa povećanim nivoima CRP kod muškaraca, dok je HIV/HCV koinfekcija povezana sa smanjenim nivoima CRP kod muškaraca i žena. Dalje, autori su uočili povezanost između tri imuno-markera (CRP, IL-6 i d-dimer) i KVB HIV inficiranih, ali nije bilo moguće detektovati konzistentnu vezu sa zadebljanejm intime medije karotide, za bilo koje imuno-kreatore (120).

Povišeni nivoi C-reaktivnog proteina (CRP) su povezani sa povećanim rizikom za kardiovaskularne bolesti u opštoj populaciji. Korisnost CRP-a u predviđanju rizika od KVB kod HIV-inficiranih i HIV/HCV koinficiranih pacijenata, koji mogu imati veće stope KVB od neinficiranih pojedinaca, nedovoljno je istražena (121).

U preglednom članku „HIV infekcija, nivoi CRP i rizik od infarkta miokarda“ autori Triant VA i sar. su pokazali da u univarijantnoj analizi HIV infekcija i povišeni nivoi CRP-a bili značajno povezani sa povećanim rizikom za akutni infarkt miokarda. U modelu prilagođenom starosti, polu, rasi, hipertenziji, dijabetesu i dislipidemiji, obje varijable (HIV infekcija i CRP) ostale su značajne. HIV-inficirani pacijenti sa povišenim nivoima CRP-a imali su četiri puta veću šansu da imaju akutni infarkt miokarda nego HIV-neinficirani pacijenti sa normalnim nivoima CRP (122).

U studiji Vishwanath A i sar. autori su došli do zaključka da CRP može biti odličan prediktor rizika od KVB kod HIV-inficiranih pacijenata. Pošto je CRP jeftin za mjerenje i lako dostupan, može postati klinički korisno sredstvo za praćenje rizika od KVB kod HIV pozitivnih pacijenata. Međutim, potrebne su dodatne studije da bi se analizirao uticaj dodavanja ovog markera na kardiovaskularne rizike prije uvođenja rutinskog mjerenja CRP (79).

Dalje se navodi da su nivoi CRP su nezavisno povezani sa KVB događajima, uključujući infarkt miokarda, moždani udar, koronarnu revaskularizaciju, kongestivnu srčanu insuficijenciju, smrtnost zbog KVB, i autor sugeriše da se CRP treba mjeriti kod svih HIV pacijenata sa najvećim rizikom od KVB i najmanje šestomjesečno nakon ili barem onoliko često koliko i CD4 broj kako bi se pratio profil/rizik za KVB pacijenata.

Studija Guimarães MM i sar. je pokazala povezanost između CRP nivoa i ITM, potom obima struka, debljine subskapularne i suprapubične masti i intraabdominalne masti,

mjerenje ultrazvukom. Studija je takođe pokazala pozitivnu i značajnu korelaciju između nivoa CRP i tradicionalnih markera kardiovaskularnog rizika kao što su visok krvni pritisak, ukupni holesterol, LDL holesterol, trigliceridi, nivoi glukoze i glukoze natašte. Povezanost između visokih koncentracija CRP i utvrđeni kardiovaskularni faktori rizika mogu dodatno ojačati hipotezu da je CRP marker za prekliničku kardiovaskularnu bolest kod HIV-inficiranih pacijenata (123).

Naši rezultati pokazali su značajnu prediktivnu moć CRP-a za rizik za KVB, tokom ART tretmana. Naime, u multivarijantnoj regresionoj analizi se CRP pokazao statistički značajnim prediktorom za rizik razvoja KVB zajedno sa tradicionalnim markerima starosti, ITM i surogat markerom CD4/CD8 odnosom nakon 18 mjeseci ART. Nakon 24 mjeseca ART nezavisno značajan prediktor za rizik KVB (uz CRP, ITM i starost) pokazao se terapijski režim NNRTI+PI u odnosu na NNRTI+NRTI.

U prvom slučaju (nakon 18 mjeseci ART), analizom ROC krive dobili smo da CRP >5,15 mg/l može razlikovati srednji (>5-10%) od niskog rizika (1-5%) za KVB, odnosno na ovoj vrijednosti CRP ima senzitivnost 77,3% i specifičnost 85,2%. Nakon 24 mjeseca vrijednosti CRP-a >5,31 mg/l imale su veću senzitivnost 78,3% i veću specifičnost 86,8%, u poređenju sa prethodnim 18-mjesečnim presjekom.

Značajnu korelaciju između vrijednosti CRP-a i CD4/CD8 odnosa pokazali smo Spirmanovom korelacijom ( $p < 0,05$ ) od 12 do 24 mjeseca ART. Korelacija je srednje jaka i negativna (inverzna), veće vrijednosti CRP-a imali su ispitanici sa manjim CD4/CD8, i obrnuto.

Bosnu i Hercegovinu, kao i zemlje u okruženju koje nisu dio EU, karakteriše povećavanje troškova u zdravstvenom sektoru, što se jednim djelom može objasniti i starenjem stanovništva, i odlaskom mlađe populacije u zemlje Zapadne Evrope. Uvođenjem novih tehnologija i većeg spektra laboratorijskih nalaza, činjenica je da liječenje postaje „skuplje“ i teže dostupno. Tako bi pronalazak jeftinijih i pouzdanijih markera, u ovom slučaju CRP-a i CD4/CD8 odnosa, bio jako značajan u redovnoj kontroli rizika za KVB, kod HIV inficiranih pacijenata tokom antiretrovirusnog tretmana (124).

Dislipidemija je jedan od vodećih rizika za KVB. Činjenica je da se HIV inficiranim terapijom produžio životni vijek, ali su istovremeno učestale ne-AIDS komplikacije, u prvom redu KVB. Dosadašnja istraživanja su pokazala da primjena ART tipično se

manifestuje smanjenjem HDL holesterola (HDL-C), povećanjem LDL-C, povećanjem ukupnog holesterola, kao i povećanjem nivoa triglicerida u krvi (125).

Bilo da se radi o dislipidemiji kao posljedici primjene ART ili kod ljudi iz opšte populacije dislipidemija je utvrđeni faktor rizika za kardiovaskularne bolesti, što je uzrok sveprisutnog morbiditeta i povećanja stope smrtnosti u većini zemalja u razvoju. Kao zajednički patogeni faktor rizika, prihvaćeno je da dislipidemija povećava šansu za nastanak diabetes mellitusa (DM), ateroskleroze i bezalkoholne bolesti masne jetre (126), te da se ista može dovesti i u vezu sa hroničnom bolesti bubrega (127).

Kada su u pitanju KVB, dislipidemija je jedan snažan faktor rizika za razvoj moždanog udara, koronarne bolesti srca, infarkta miokarda i periferne vaskularne bolesti (128).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da se dislipidemija koja se javlja kod pacijenata sa HIV-om sve više prepoznaje kao problem kod bolesnika cART, a posebno onih pacijenata koji se tretiraju sa lijekovima iz skupine PI. Postoji podatak da je učestalost dislipidemije od 70% do 80% pacijenata tretiranih sa PI. Najčešće dislipidemija se manifestuje u formi visokih triglicerida i LDL-C, te smanjenih nivoa HDL-C, kao i u akumulaciji ApoE i ApoC III (125). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da su nivo ukupnog holesterola, nivo triglicerida, LDL, te vrijednost aterogenog indeksa imali statistički značajan trend rasta u periodu praćenja HIV zaraženih pacijenta. Suprotno njima, vrijednost HDL u periodu praćenja kod HIV zaraženih pacijenta imala je statistički značajan trend pada.

Indumati i sar. su pokazali da pacijenti zaraženi HIV-om, a tretirani ART-om pokazuju trend rasta za ukupni holesterol, nivo triglicerida i LDL tokom vremena, ali nivo HDL se nije značajno mijenjao. Obzirom na sklonost promjeni lipidnog profila autori sugerišu da bi bilo poželjno već 3-6 mjeseci od početka primjene ART praviti monitornog lipidnog profila (129).

Slične rezultate pokazala je studija Zephy i sar. koji su uočili trend rasta ukupnog holesterola i triglicerida, kao i trend pada HDL kod HIV pacijenata tretiranih ART (130).

U svojoj presječnoj studiji Augustemak de Lima i sar. su dokazali značajno više nivoe ukupnog holesterola, triglicerida i LDL, te značajno niže nivoe HDL kod djece i adolescenata zaraženih HIV-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Isti autori su ustanovili značajno više nivoe glukoze u krvi, CRP, IL-6, TNF- $\alpha$ , te značajno višu vrijednost intima-medija debljine u karotidnim arterijama kod djece i adolescenata zaraženih HIV-om u



odnosu na kontrolnu skupinu. Njihovi rezultati su pokazali da su sistolni krvni pritisak i TNF- $\alpha$  bili značajni prediktori intima-medija debljine u karotidnim arterijama kod djece i adolescenata zaraženih HIV-om. Kod bolesnika koji su koristili ART baziranu na primjeni inhibitora proteaze, muški spol, masno tkivo u trupu, glukoza i IL- 6 su bili značajni prediktori intima-medija debljine u karotidnim arterijama. Autori sugerišu da djeca i adolescenti inficirani HIV-om mogu biti izloženi riziku za nastanak preuranjene ateroskleroze zbog naglašene hronične upale i dislipidemije, te da su istima potrebne intervencije s ciljem poboljšanja lipidnog profila, ublažavanja upale i smanjenja kardiovaskularnog rizika (131).

U studiji koju su sproveli Njoroge i sar. nisu utvrđene statistički značajne razlike u nivou ukupnog holesterola između HIV zaraženih i HIV nezaraženih pacijenata (132).

Gowdaiah i sar. su pokazali da su nivoi triglicerida statistički značajno viši, a da su nivoi HDL-C statistički bili značajno niži u skupini HIV zaraženih pacijenata u odnosu na kontrolnu skupinu. Stratificirajući pacijente prema stadiju bolesti rezultati njihove studije su pokazali da pacijenti sa naprednim stadijima bolesti imaju značajno više nivoa triglicerida u krvi u poređenju s pacijentima nižih stadija bolesti. Njihovi rezultati su pokazali i trend porasta nivoa triglicerida, kao i trend rasta VLDL tokom vremena praćenja pacijenata. Autori vjeruju da mehanizam povećanja lipida u krvi kod HIV zaraženih pacijenata leži u osnovi citokinima posredovane lipidne peroksidacije. Imajući u vidu činjenicu povezanosti između TG u plazmi i nivoa cirkulirajućeg interferona (IFN)  $\alpha$  koja je prethodno pokazana kod pacijenata s AIDS-om, autori navode na pretpostavku da interferon- $\alpha$  povećava nivo TG na način da smanjuje njihov klirens i povećava de novo jetrenu lipogenezu i sintezu VLDL (133).

U studiji koju su sproveli Njoroge i sar. nisu utvrđene statistički značajne razlike u nivou HDL holesterola, kao ni u odnosu ukupnog holesterola i HDL holesterola, između HIV zaraženih i HIV nezaraženih pacijenata (132).

S obzirom na to da su rezultati našeg istraživanja tokom praćenja u vremenu pokazali značajan trend rasta holesterola, značajan trend rasta LDL, značajan trend rasta nivoa triglicerida, kao i značajan trend pada HDL, odnosno jednom riječju pozitivan trend za nastanak dislipidemije, mišljenja smo da bi pacijentima sa HIV infekcijom tokom redovnih rutinskih kontrolnih pregleda bilo esencijalno pratiti i parametre lipidnog profila, kako bi se mogao imati bolji uvid u potencijalni razvoj rizika koji bi mogao dovesti do

ozbiljnijih komorbiditeta. S obzirom na to da je dislipidemija priznati faktor rizika za nastanak KVB i drugih oboljenja, uključujući metaboličke bolesti i dr., naše preporuke bi bile da se ovim pacijentima pristupa sa oprežnošću u smislu preventivnog djelovanja na nastanak iste, kako bi se izbjegle njene moguće posljedice. Također je važno upoznati i same pacijente koji su podvrgnuti ART da mogu imati povećane šanse za nastanak dislipidemije, te istima skrenuti pažnju na samokontrolni način preveniranja ove bolesti, bilo da se radi o promjeni načina hranjenja ili drugih navika života kojima bi se mogao spriječiti nastanak same dislipidemije. Disciplina HIV-inficiranih pacijenata u bi mnogome mogla imati pozitivne efekte u prevenciji dislipidemije, jer predstavlja stanje na koje sam pacijent može uticati.

Opšte je prihvaćeno da je gojaznost postala globalni javno-zdravstveni problem. Gojazni pacijenti izloženi su velikom riziku za nastanak velikog broja oboljenja, uključujući: KVB, gastrointestinalne poremećaje, diabetes mellitus tipa 2, artritis, maligna oboljenja, kognitivno oštećenje, bubrežne bolesti, retinopatiju, respiratorne bolesti, kao i probleme psihičke prirode koji mogu značajno uticati na odvijanje normalnog svakodnevnog života. Pokazano je da gojaznost kao riziko faktor, na direktan ili indirektan način, u velikoj mjeri povećava stopu smrtnosti (134).

Cefalu i sar. ističu da čak smanjenje tjelesne težine za svega 3-5% može uticati na značajno smanjenje rizika za nastanak KVB, a da veći gubici tjelesne težine imaju i veći učinak na smanjenje rizika za nastanak istih. Autori ističu da bi početni cilj u smislu gubitaka tjelesne težine trebao da iznosi od 5 do 10% (135).

Sa istorijske tačke gledišta pacijenti sa HIV/AIDS su determinisani kao pacijenti koji pokazuju sklonost gubitku tjelesne težine, te ovakav trend je bio i prihvaćen kao prognostički biomaker progresije bolesti. Međutim u razvijenim zemljama, a posebno uvođenjem ART u tretiranju HIV zaraženih pacijenata, došlo se do suprotnih saznanja, odnosno u grupi ovih pacijenata uočeno je povećanje prevalencije gojaznosti (136).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je u periodu praćenja kod HIV zaraženih pacijenta ITM imao statistički značajan trend rasta. Oni su u skladu sa rezultatima studije Hasse i sar. koji su uočili značajan trend rasta ITM kod pacijenata sa HIV-om koji su bili podvrgnuti ART (137).

Slične rezultate, ali na populaciji ženskih pacijenata zaraženih HIV-om a tretiranih ART-om, pokazala je studija koju su sproveli McCormick i sar., koji su uočili trend rasta ITM, odnosno povećanje prevalence pojavljivanja gojaznosti kod istih (138).

S obzirom na to da su rezultati našeg istraživanja pokazali statistički značajan trend rasta ITM, koji je ujedno priznati parametar gojaznosti, mišljenja smo da bi pacijentima zaraženim HIV-om a tretiranim ART, trebalo sa početkom terapije uvesti standardnu rutinsku kontrolu praćenja ovog parametra. S obzirom na to da ITM može postati i ozbiljan riziko faktor za veliki broj oboljenja, odnosno komorbiditeta, mišljenja smo da bi ljekari trebali svoje pacijente upozoriti na mogućnost porasta ITM tokom liječenja, jer je ITM faktor na koji pacijent može uticati na način mijenjanja režima ishrane i/ili stila života uopšteno.

Prije početka upotrebe ART, hematološke abnormalnosti su uobičajena pojava kod HIV inficiranih pacijenata. Najčešći poremećaji koji su zabilježeni u nekoliko istraživanja su uključivali: anemiju, leukopeniju i trombocitopeniju.

Neizostavno je reći da se tokom primanja ART-a, hematološke abnormalnosti također mogu pojaviti zbog sekundarnih nuspojava od strane same ART, mada u većini slučajeva pacijentima podvrgnutim ART-u poboljšavaju se generalno parametri krvne slike (139).

Ispitujući hematološke abnormalnosti kod HIV zaraženih pacijenata Dhal i sar. su kod istih utvrdili učestalost leukopenije kod 2,40% pacijenata, 29% je imalo neutropeniju, 30% limfocitopeniju, te 20% monocitopeniju (140).

Analizajući trend promjena leukocita bazično i tokom od 24 mjeseca cART naši rezultati su pokazali da su se vrijednosti leukocita kretale u okvirima referentnih vrijednosti između  $4,0-10,0 \times 10^9/l$ , a trend promjena vrijednosti leukocita u toku 24 mjeseca nije statistički značajan  $p>0,05$ . Također, rezultati našeg istraživanja nisu pokazali statistički značajan trend promjena od bazičnih vrijednosti pa do 24 mjeseca praćenja pacijenata kada su bili u pitanju monociti i neutrofilni leukociti.

Naši rezultati nisu u skladu s rezultatima studije koju su sproveli Ebonyi i sar. koji su tokom 12-mjesečnog praćenja pacijenata uočili statisčki značajan trend pada ukupnog broja leukocita, neutrofilnih leukocita i monocita. Njihovi rezultati su pokazali da su HIV inficirani pacijenti imali više bazične vrijednosti i ukupnog broja leukocita, neutrofilnih

leukocita i monocita u odnosu na vrijednosti mjerenja na 6 i 12 mjeseci tokom tretiranja pacijenata ART-om (139).

Njima slične rezultate u smislu trenda pada leukocita 6 mjeseci nakon primanja cART u odnosu na bazične vrijednosti pokazala je studija koju su sproveli Kibaru i sar (141).

Prije početka tretiranja kod djece zaražene sa HIV-om, Bhowmik i sar. su uočili prisustvo leukopenije kod 34% djece, a neutropenije kod 19% djece (142).

Anzinger i sar su pokazali da upalni medijatori proizvedeni u monocitima, ali ne i upalni medijatori proizvedeni od strane T-ćelijske aktivacije, predviđaju ne-AIDS oboljenja u virološki potisnutim HIV-om zaraženim osobama liječenim cART-om. Pokazano je da nivo IL-6, citokina proizvedenog od strane visokih nivoa monocita koji se također može proizvesti i od strane drugih tipova ćelija produciranih u određenim okolnostima je bio povezan s povećanim šansama za ne-AIDS oboljenja i za smrtni ishod. Autori sugerišu da iako je aktivacija T-ćelija opsežno ispitana u kontekstu HIV infekcije liječene cART-om, aktivacija monocita tek počinje biti prepoznata kao važan izvor upale i uopšteno važan medijator i prediktor ne-AIDS oboljenja (143).

Uprkos 30-godišnjem intenzivnom istraživanju, još uvijek postoji ograničeno razumijevanje o tome kako virus HIV-1 umanjuje sposobnost imunološkog sistema da se bori protiv uobičajenih infekcija. Iako je opšte poznato da su T-ćelije ključna ćelijska populacija koja se normalno bori s napadačima, još uvijek nije dovoljno rasvijetljeno zašto isti gube sposobnost funkcionisanja kod HIV-1-inficiranih pojedinaca. U posljednjem periodu otkriveno je da virus HIV-1 aktivira drugu vrstu ćelija, neutrofila, kao najbrojnih leukocita u perifernoj krvi. Aktivirani neutrofilni negativno utiču na funkciju T ćelija i sprječavaju ih da proizvode citokine. Za citokine se zna da su zaštitni proteini koji posreduju u imunološkom odgovoru na bakterije i viruse. Ovaj nedavno identifikovan mehanizam imunosupresije posredovan neutrofilima može promijeniti razumijevanje patogeneze HIV-1 i otvoriti nove perspektive u smislu uvođenja novih terapija usmjerenih na gubitak imunološke funkcije u HIV-1/AIDS-u (144).

U većini slučajeva kod bolesnika zaraženih HIV-om teška neutropenija je povezana sa značajnim gubitkom CD4+ ćelija i povećanjem količine virusa koji je prisutan u tijelu pacijenata. Odgovarajuće liječenje HAART-om korisno je za postizanje povećanja broja neutrofila, odnosno popravljanja stanja neutropenije kod ovih pacijenata (145).

Kada su u pitanju limfociti, naši rezultati su pokazali da su bazično prosječne vrijednosti istih iznosile 32% (20-41%), kao i u trećem mjesecu nakon početka ART 32% (18-41,7%). Potom je utvrđen blagi trend rasta do 12 mjeseca 38% (30,2-44,7%), i blagi trend pada do 24 mjeseca 29,0% (18-36,0%), a u konačnici trend promjena limfocita je bio statistički značajan  $p < 0,05$ .

Naši rezultati su u skladu s rezultatima Ebonyi i sar. koji su u odnosu na bazične vrijednosti limfocita, 12 mjeseci nakon početka ART ustanovili statistički značajan porast istih u perifernoj krvi (139).

Reda i sar. su pokazali značajan porast broja CD4 limfocita i tjelesne težine među pacijentima koji su uzimali ART u istočnoj Etiopiji. Njihovi rezultati su pokazali da se srednji broj CD4 limfocita poboljšao tokom petogodišnjeg perioda, osim u 54. i 60. mjesecu gdje je srednji broj CD4 ćelija pokazao blagi pad (146).

Pokazano je da su neutrofilija i limfocitopenija, odnosno odnos neutrofila/limfocita nezavisni prediktori mnogih bolesti, uključujući i akutno zatajenje srca, ali i druge nekardiološke bolesti. S obzirom na to da se ovaj odnos rutinski može odrediti, isti se može upotrijebiti u smislu praćenja rizika za napredovanje niza bolesti, kao i za praćenje djelovanja ART na njegovu vrijednost. Pokazano je da je odnos neutrofila/limfocita 10, 15 i 20 dana nakon primjene cART-a bio statistički značajno niži kod tretiranih životinja cART-a u odnosu na kontrolnu grupu. Interesantno je da se ovaj odnos 10 dana nakon primjene cART-a, statistički značajno smanjio davanjem cART-a u dozama 15 mg/kg, dok se s dozama od 20 mg/kg statistički značajno nije razlikovao u odnosu na kontrolne ispitanike. Uopšteno pad odnosa neutrofila/limfocita može se pripisati direktnom djelovanju ovih lijekova na neutrofilne/limfocitne progenitorske ćelije, koji uzrokuju depresivnu aktivnost koštane srži. Međutim odnos se poboljšava kako se tijelo prilagođava primjeni lijeka. Ta činjenica bi mogla objasniti povećanje odnosa s povećanjem primijenjene doze (147).

Sedimentacija eritrocita je jednostavan test iz krvi koji mjeri brzinu pada crvenih krvnih tokom prvog sata u cjevčici u koju se prethodno stavi antikoagulans krvi. Izražava se u mm plazme iznad nivoa istaloženih eritrocita. Ovaj se test široko koristi kao nespecifični test za mnoga patološka stanja kao što su infekcije, upalne bolesti i maligne bolesti. Poznato je da je sedimentacija eritrocita kod žena obično viša, jer imaju manji broj eritrocita

u odnosu na muškarce, a tokom menstruacije i trudnoće njene vrijednosti mogu se privremeno povećati (148).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da HIV inficirani pacijenti imaju značajno više vrijednosti sedimentacije eritrocita u odnosu na zdrave ispitanike (149).

Naši rezultati su pokazali da su se vrijednosti SE kretale iznad referentnih vrijednosti  $>10\text{mm/h}$ . Iako bazično i do dvanaestog mjeseca nije bilo statistički značajnih promjena prosječnih vrijednosti SE, od dvanasetog mjeseca do 24 mjeseca SE je bila u blagom rastu, i taj posrast je bio statistički značajan.

Dalela i sar. su pokazali da je kod HIV zaraženih pacijenata vrijednost sedimentacije 6 mjeseci, te 12 mjeseci od početka ART imala značajno nižu vrijednost u odnosu na bazične vrijednosti. Važno je istaći da su rezultati njihovog istraživanja pokazali i to da je sedimentacija eritrocita 12 mjeseci od početka ART bila niža u odnosu na njenu vrijednost 6 mjeseci od početka ART-a (150).

Ifeanyichukwu i sar. su pokazali da je vrijednost sedimentacije eritrocita statistički značajno viša i kod HIV zaraženih pacijenata koji su na ART i kod HIV zaraženih pacijenata koji nisu na ART u odnosu na kontrolne ispitanike (151).

Interesantne rezultate predložila je studija koju je sprovedla Venkataramana i koja je pokazala da je sedimentacija eritrocita sa vrijednošću  $>20\text{ mm}$  statistički značajan prediktor pojave niskih vrijednosti CD4 limfocita kod HIV zaraženih pacijenata. Sedimentacija eritrocita sa vrijednošću  $>20\text{ mm}$  bila je statistički značajan prediktor pojave niskih vrijednosti CD4 limfocita kod HIV zaraženih pacijenata i nakon što su pacijenti bili podijeljeni prema polu. Njeni rezultat je pokazao da su sedimentacija eritrocita i CRP statistički značajno negativno korelirali s brojem CD4+ T-ćelija kod HIV zaraženih pacijenata (152).

Jedan od najčešćih nalaza kod pacijenata sa HIV jeste smanjen ukupan broj eritrocita u krvi, odnosno, anemija. Tako, Bhowmik i sar. su pokazali da je anemija najčešća hematološka anomalija kod djece zaražene HIV-om prije početka ART-a. Isti autori su pokazali da su i anemija i dokazana limfopenija bile značajno učestalije u naprednijim fazama bolesti (142).

Analizajući trend promjena u broju eritrocita od bazičnih vrijednosti pa tokom 24 mjeseca cART, naši rezultati pokazali su sa su se prosječne vrijednosti eritrocita kretale u okvirima referentnih, bez značajnog trenda promjene. Vrijednost hematokrita u odnosu na bazične vrijednosti imao je statistički značajan porast tek 18 mjeseci tokom sprovođenja ART-a. U odnosu na bazične vrijednosti hemoglobina utvrđen je statistički značajan njegov porast već u 6 mjesecu od početka ART-a.

Naši rezultati su u skladu s rezultatima Kibaru i sar. koji su u odnosu na bazične vrijednosti hemoglobina, već 6 mjeseci nakon početka ART ustanovili statistički značajan njegov porast. S obzirom na to da su autori ustanovili da su se pored nalaza hemoglobina popravljali i drugi hematološki indeksi, poput: MCV, MCH, autori vjeruju da je pozitivni učinak cART-a vjerovatno posljedica smanjenja virusnog opterećenja, smanjenja razaranja zrelih hematopoetskih ćelija višestrukih linija i poboljšanje odgovora organizma na otpuštanje eritropoetina (141).

Ebonyi i sar. su utvrdili statistički značajno povećanje vrijednosti hemoglobina u 6. mjesecu od početka ART u odnosu na bazične vrijednosti. Njihovi rezultati su pokazali da je vrijednost hemoglobina i 12 mjeseci od početka ART-a bila statistički značajno viša u odnosu na bazične vrijednosti. Autori vjeruju da je učinak ART-a u pogledu oporavka hematoloških parametara vidljiv i na samom njenom početku (139).

U istraživanju koje su sproveli Esan i sar. zabilježeno je da su HIV-om zaražena djeca koja su primala suplemente željeza imala povišene vrijednosti hemoglobina, te na taj način smanjila prevalenciju za nastanak anemije za 40%, ali je pokazano da je željezo povećavalo rizik za nastanak malarije (153).

Čest nalaz bolesnika koji su zaraženi HIV-om je trombocitopenija i ista može biti prva klinička manifestacija u asimptomatskih pacijenata. Trombocitopenija može napredovati tokom vremena i može dovesti do ozbiljnih krvarenja (154).

Mehanizam trombocitopenije koji je povezan s HIV-om može se razlikovati u različitim fazama HIV bolesti. U ranoj fazi bolesti, koju karakteriše nisko virusno opterećenje dominira mehanizam imunološke trombocitopenijske purpure s prisutnošću antitrombocitnih antitijela i povećanim uništavanjem trombocita. U stadiju napredne HIV-1 infekcije, kada u organizmu vlada visoko virusno opterećenje i kojeg karakteriše nizak broj

CD4 ćelija, smanjen broj trombocita je uglavnom uzrokovan njihovom smanjenom proizvodnjom (155).

Fan i sar. su pokazali da niži broj CD4+ ćelija je povezan s povećanim rizikom za nastanak trombocitopenije kod HIV inficiranih pacijenata (154)

Seyoum i sar. su pokazali da je broj trombocita statistički značajno niži, a protrombinsko vrijeme, vrijednosti INR-a i APTT-a statistički značajno viši kod pacijenata sa HIV-om, bilo da se radi o pacijentima na cART ili cART naivnim pacijentima u odnosu na seronegativne pacijente (156).

Analizajući trend promjena u broju trombocita od bazičnih vrijednosti pa tokom 24 mjeseca cART naši rezultati nisu pokazali da je trend bio statistički značajan, odnosno na svakom slijedećem mjerenju (3,6,12,18 i 24 mjeseca) njihov broj se povećavao. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Kibaru i sar. koji su utvrdili statistički značajno povećanje broja trombocita u 6. mjesecu od početka ART u odnosu na bazične vrijednosti (141).

Slične rezultate pokazala je i studija koji su sproveli Ibeh i sar., autori su pokazali značajan porast broja trombocita u krvi u 12. sedmici od početka ART u odnosu na vrijednosti prije početka terapije. Njihov rezultat ukazuje na smanjenu učestalost trombocitopenije kod HIV inficiranih osoba tretiranih ART-om (157).

S obzirom na to da su rezultati našeg istraživanja pokazali statistički neznačajan trend mijenjanja u pogledu broja leukocita, broja neutrofila, broja monocita, broja eritrocita, te statistički značajan trend rasta vrijednosti hemoglobina i broja trombocita navodi na zaključak da ART, koja ima primarno za cilj supresiju viremije kod HIV inficiranih pacijenata, može poboljšati i hematološke abnormalnosti koje pogađaju ovu skupinu pacijenata.



## 9. ZAKLJUČCI

Odnos CD4/CD8 i CRP pokazali su značajan trend rasta tokom 24 mjeseca kombinovane antiretrovirusne terapije.

CD4/CD8 odnos kao marker imuno-rekonstrukcije je u pozitivnoj i srednje jakoj korelaciji sa CRP-om kao markerom inflamacije nakon 12 mjeseci cART, pa sve do kraja opservacionog perioda. Oba markera rastu od početka cART i oba su prediktori rizika za KVB nakon 12 mjeseci cART terapije.

CD4/CD8 odnos se pokazao značajnim i nezavisnim prediktorom za razvoj KVB od 12 mjeseca terapije do kraja opservacionog perioda. Vrijednosti CD4/CD8 odnosa ispod 0,43 u osamnaestom mjesecu i 0,53 u dvadeset četvrtom mjesecu cART, mogu biti markeri niskog rizika (1-5 %) za KVB, AUC = 0,72 sa senzitivnošću 72,2 % i specifičnost 63,6% nakon 18 mjeseci, odnosno AUC = 0,76 sa senzitivnošću 66,0 % i specifičnošću od 73,9 % nakon 24 mjeseca cART.

CRP pokazao se značajnim i nezavisnim prediktorom za razvoj KVB od 18 mjeseca terapije do kraja opservacionog perioda. Vrijednosti CRP-a iznad 5,15 u osamnaestom mjesecu i 5,31 u 24 mjesecu cART, mogu biti markeri srednjeg rizika (>5-10%) KVB, AUC = 0,87 sa senzitivnošću 77,3 % i specifičnošću 85,2 % nakon 18 mjeseci, odnosno AUC = 0,88 sa senzitivnošću 78,3 % i specifičnošću od 86,8 % nakon 24 mjeseca cART.

Kombinacija antiretrovirusnih lijekova PI plus NRTI u odnosu na NNRTI plus NRTI se pokazala nezavisnim značajnim prediktorom za razvoj KVB nakon 24 mjeseca terapije.

Elementi krvne slike (eritrociti, hemoglobin, hematokrit, trombociti) kao i leukociti i elementi leukocitarne formule (neutrofili, limfociti, monociti) tokom cART nisu pokazali značajnija odstupanja od referentnih vrijednosti.

Lipidni profil (holesterol, trigliceridi, HDL, LDL, aterogeni index) pokazao je značajan trend promjena/rasta tokom ART, osim HDL-a koj je bazično nizak, početkom terapije počinje rasti, da bi da bi do kraja 24 mjeseca opet padao, odnosno bio ispod referentne vrijednosti.

Indeks tjelesne mase ima blagi kontinuirani trend rasta, da bi od 12 do 24 mjeseca u prešao granicu idealne tjelesne mase od 25, odnosno ispitanici nakon ovog perioda su u prosjeku u kategoriji prekomjerne tjelesne težine.

*Ovom studijom odbacili smo nulte hipoteze, odnosno prihvatili alternativne da su CD4/CD8 odnos i CRP značajani prediktori u praćenju promjena kardiovaskularnog rizika HIV pozitivnih pacijenata, CD4/CD8 nakon 12 mjeseci, a CRP nakon od 18 mjeseci cART pa do kraja opservacionog perioda.*

## 10. LITERATURA

1. Zhang W, Cao S, Martin JL, Mueller JD, Mansky LM. Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. *AIMS Biophys.* 2015 i 2(3):343-369.
2. Nkenfou CN, Nana CT, Payne VK. Intestinal parasitic infections in HIV infected and non-infected patients in a low HIV prevalence region, West-Cameroon. *PLoS One.* 2013 i 8(2):e57914.
3. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 19th ed. McGraw-Hill Education i 2015.
4. Global HIV & AIDS statistics — 2018 fact sheet (2018) Dostupno na : <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet> (prostupljeno, decembar 2018).
5. Oladipo EK. and Awoyelu EH. Pathogenesis of HIV: Pathway to eradication. *Adv. Appl. Sci. Res.*, 2015, 6(5):81-87.
6. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'. *Human Immunodeficiency Virus (HIV). Transfus Med Hemother.* 2016 i 43(3):203-22.
7. Seng R, Goujard C, Krastinova E, Mialhes P, Orr S, Molina JM, Saada M, Piroth L, Rouzioux C, Meyer L. Influence of lifelong cumulative HIV viremia on long-term recovery of CD4+ cell count and CD4+/CD8+ ratio among patients on combination antiretroviral therapy. *Aids.* 2015 Mar 13;29(5):595-607.
8. Masiá M, Padilla S, Barber X, Sanchis M, Terol G, Lidón F, Gutiérrez F. Comparative Impact of Suppressive Antiretroviral Regimens on the CD4/CD8 T-Cell Ratio: A Cohort Study. *Medicine (Baltimore).* 2016 i 95(11):e3108.
9. Araínga M, Su H, Poluektova LY, Gorantla S, Gendelman HE. HIV-1 cellular and tissue replication patterns in infected humanized mice. *Sci Rep.* 2016 i 6:23513.
10. Klatt EC. *Pathology of HIV/AIDS.* Mercer University School of Medicine Savannah, Version 28, 2017.

11. Ripa M, Chiappetta S, Tambussi G. Immunosenescence and hurdles in the clinical management of older HIV-patients. *Virulence*. 2017 i 8(5):508-528.
12. Coming of Age. a guide to ageing well with HIV. (2018). Internet: <http://www.justri.org/coming-of-age/> (pristupljeno, decembar 2018).
13. The Lancet HIV. Preparing for an ageing HIV epidemic. 2017;4:7. Internet: [https://www.thelancet.com/journals/lanhiv/article/PIIS2352-3018\(17\)30114-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanhiv/article/PIIS2352-3018(17)30114-5/fulltext). (pristupljeno, decembar 2018).
14. Divakar DD, Al Kheraif AA , Ramakrishnaiah R , Khan AA , Sandeepa NC , Alshahrani OA, Ali Alahmari A. Oral manifestations in human immunodeficiency virus infected pediatric patients receiving and not receiving antiretroviral therapy: a cross sectional. *Paediatr Croat*. 2015;59:152-8
15. Forsyth AD, Valdiserri RO. Reaping the prevention benefits of highly active antiretroviral treatment: policy implications of HIV Prevention Trials Network 052. *Curr Opin HIV AIDS*. 2012 i 7(2):111-6.
16. Trickey A, May MT, Vehreschild JJ, Obel N, Gill MJ, Crane HM, Boesecke C, Patterson S, Grabar S, Cazanave C, Cavassini M. Survival of HIV-positive patients starting antiretroviral therapy between 1996 and 2013: a collaborative analysis of cohort studies. *The Lancet HIV*. 2017 Aug 1;4(8):e349-56.
17. European AIDS Clinical Society (EACS). Internet : <http://www.eacsociety.org/home/home.html> (pristupljeno, decembar 2018).
18. Camacho R, Teófilo E. Antiretroviral therapy in treatment-naive patients with HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2011 Dec 1 i 6:S3-11.
19. Gojak R, Hadžiosmanović V, Baljić R, Zečević L, Corić J, Mijailović Z. CD4/CD8 ratio as a predictor for the occurrence of metabolic syndrome in HIV/AIDS patients during 6 months of cART therapy. *J Med Biochem*. 2019 i 38.
20. Hadžiosmanović V. Antiretrovirusno liječenje. Čardaklija Z., urednik. Kliničke vodilje za tretman HIV-a i AIDS-a u Bosni i Hercegovini. Sarajevo, Udruženje za partnerstvo za zdravlje. 2013: 17-56.

21. Kliničke vodilje za tretman HIV-a i AIDS-a. Internet : <http://sjz.ba/klinicke-vodilje-za-tretman-hiv-a-i-aids-a-bosanski-jezik> (pristupljeno, decembar 2018).
22. EACS Guidelines Archive. Internet: <http://www.eacsociety.org/guidelines/guidelines-archive/archive.html> (pristupljeno, decembar 2018).
23. 7, Bhatnagar A. Environmental determinants of cardiovascular disease. *Circulation research*. 2017 Jul i 121(2):162-80.
24. Valdés S, García-Torres F, Maldonado-Araque C, Goday A, Calle-Pascual A, Soriguer F, Castaño L, Catalá M, Gomis R, Rojo-Martínez G, Di@ bet. es study group. Prevalence of obesity, diabetes and other cardiovascular risk factors in Andalusia (southern Spain). Comparison with national prevalence data. The Di@ bet. es study. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2014 Jun 1;67(6):442-8.
25. Chen S, Sun Y2 Agrawal DK. Vitamin D deficiency and essential hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2015 i 9(11):885-901.
26. Pilakkadavath Z, Shaffi M. Modifiable risk factors of hypertension: A hospital-based case-control study from Kerala, India. *J Family Med Prim Care*. 2016 i 5(1):114-9.
27. Halade GV, Kain V. Obesity and Cardiometabolic Defects in Heart Failure Pathology. *Compr Physiol*. 2017 Sep 12 i 7(4):1463-1477.
28. Ni WQ, Liu XL, Zhuo ZP, Yuan XL, Song JP, Chi HS, Xu J. Serum lipids and associated factors of dyslipidemia in the adult population in Shenzhen. *Lipids Health Dis*. 2015 i 14:71.
29. Pham TV, Torres M. Human Immunodeficiency Virus Infection-Related Heart Disease. *Emerg Med Clin North Am*. 2015 i 33(3):613-22.
30. Anand AR, Rachel G, Parthasarathy D. HIV Proteins and Endothelial Dysfunction: Implications in Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2018 i 5:185.
31. Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N. *Essentials of Clinical Immunology*. John Wiley & Sons, 2015.
32. Damjanov I, Jukić S, Nola M, *Patologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2011.*

33. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012: 925135.
34. McBride JA<sup>1, 2,3</sup>, Striker R<sup>1,2</sup>. Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLoS Pathog.* 2017 Nov 2; 13(11):e1006624.
35. Riddler S, Aga E, Bosch R et al. Continued Slow Decay of the Residual Plasma Viremia Level in HIV-1- Infected Adults Receiving Long-term Antiviral Therapy. *J Infect Dis* 2016: 213:556–60.
36. Mussini C, Lorenzini P, Cozzi-Lepri A, Lapadula G, Marchetti G, Nicastri E, Cingolani A, Lichtner M, Antinori A, Gori A, Monforte AD. CD4/CD8 ratio normalisation and non-AIDS-related events in individuals with HIV who achieve viral load suppression with antiretroviral therapy: an observational cohort study. *The lancet HIV.* 2015 Mar 1;2(3):e98-106.
37. Serrano-Villar S, Deeks S. CD4/CD8 ratio: an emerging biomarker for HIV. *Lancet HIV.* 2015 Mar 1; 2(3):76–7.
38. Rajasuriar R, Wright E, Lewin SR. Impact of antiretroviral therapy (ART) timing on chronic immune activation/inflammation and end-organ damage. *Curr Opin HIV AIDS.* 2015; 10(1):35-42.
39. Serrano-Villar S, Sainz T, Lee SA, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, Ferre AL, Hayes TL, Somsouk M, Hsue PY, Van Natta ML. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8<sup>+</sup> T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS pathogens.* 2014 May 15;10(5):e1004078.
40. Hoenigl M, Chaillon A, Little SJ. CD4/CD8 Cell Ratio in Acute HIV Infection and the Impact of Early Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis.* 2016; 63(3):425-6.
41. Castilho JL, Shepherd BE, Koethe J, Turner M, Bebawy S, Logan J, Rogers WB, Raffanti S, Sterling TR. CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio, age, and risk of serious noncommunicable diseases in HIV-infected adults on antiretroviral therapy. *AIDS.* 2016 Mar 27; 30(6):899-908.

42. Serrano-Villar S, Sainz T, Moreno S. Monitoring the CD4/CD8 ratio: a promising indicator of disease progression in HIV-infected individuals? *Future Virol.* 2015 i 10(1):1–4.
43. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018 i 13:757-772.
44. Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Ivanova ON, Kochetkov SN, Starodubova ES, Bartosch B, Isaguliants MG. Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid Med Cell Longev.* 2016 i 8910396., 2016.
45. Teto G., Kanmogne G. D., Torimiro J. N., et al. Lipid peroxidation and total cholesterol in HAART-Naïve Patients infected with circulating recombinant forms of human immunodeficiency virus type-1 in Cameroon. *PLoS ONE.* 2013 i e65126., 8(6):.
46. Muller GC, Gottlieb MG, Luz Correa B, Gomes Filho I, Moresco RN, Bauer ME. The inverted CD4:CD8 ratio is associated with gender-related changes in oxidative stress during aging. *Cell Immunol.* 2015 i 296(2):149-54.
47. Raggi P, Corwin C. Heart aging measured with coronary artery calcium scoring and cardiovascular risk assessment algorithms in HIV infected patients. *Virulence.* 2017 i 8(5):539-544.
48. Menozzi M, Zona S, Santoro A, Carli F, Stentarelli C, Mussini C, Guaraldi G. CD4/CD8 ratio is not predictive of multi-morbidity prevalence in HIV-infected patients but identify patients with higher CVD risk. *J Int AIDS Soc.* 2015 i 19709., 17(4Suppl 3):.
49. Gao P, Rong HH, Lu T, Tang G, Si LY, Lederer JA, Xiong W. The CD4/CD8 ratio is associated with coronary artery disease (CAD) in elderly Chinese patients. *Int Immunopharmacol.* 2017 i 42:39-43.
50. Calza L, Colangeli V, Magistrelli E, Rossi N, Rosselli Del Turco E, Bussini L, Borderi M, Viale P. Prevalence of metabolic syndrome in HIV-infected patients naive to antiretroviral therapy or receiving a first-line treatment. *HIV clinical trials.* 2017 May 4;18(3):110-7.

51. Husain NE, Noor SK, Elmadhoun WM, Almobarak AO, Awadalla H, Woodward CL, Mital D, Ahmed MH. Diabetes, metabolic syndrome and dyslipidemia in people living with HIV in Africa: re-emerging challenges not to be forgotten. *HIV AIDS (Auckl)*. 2017 i 9:193-202.
52. Nguyen KA, Peer N, Mills EJ, Kengne AP. A meta-analysis of the metabolic syndrome prevalence in the global HIV-infected population. *PLoS One*. 2016 i 11(3):e0150970.
53. Diouf A, Cournil A, 2015, Groupe d'étude de la Cohorte ANRS 1215. Prevalence of metabolic complications after 10 years of antiretroviral treatment in Senegal. *Bull Soc Pathol Exot*. i 107(4):234–237.
54. Tiozzo E, Konefal J, Adwan S, Martinez LA, Villabona J, Lopez J, Cutrono S, Mehdi SM, Rodriguez A, Woolger JM, Lewis JE. A cross-sectional assessment of metabolic syndrome in HIV-infected people of low socio-economic status receiving antiretroviral therapy. *Diabetology & metabolic syndrome*. 2015 Dec;7(1):15.
55. Tesfaye DY, Kinde S, Medhin G, et al. Burden of metabolic syndrome among HIV-infected patients in Southern Ethiopia. *Diabetes Metab Syndr*. 2015 i 8(2):102–107.
56. Riangwiwat T, Kohorn LB, Chow DC, Souza SA, Ndhlovu LC, Wong JW, Gangcuangco LM, Shikuma CM. CD4/CD8 Ratio Predicts Peripheral Fat in HIV-Infected Population. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016 i e17–e19., 72(1).
57. Chandrashekhara S. C - reactive protein: An inflammatory marker with specific role in physiology, pathology, and diagnosis. *IJRCI*, 2015 i SR3, 2(S1).
58. Brown AO, Millett ER, Quint JK, Orihuela CJ. Cardiotoxicity during invasive pneumococcal disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015 i 739–45, 191.
59. Agassandian M, Shurin GV, Ma Y, Shurin MR. C-reactive protein and lung diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015 i 77–88, 53.
60. Ansar W, Ghosh S. CRP: Historical Perspective, Structure, Evolution, Synthesis, Clinical and Biological Functions. *Biology of C Reactive Protein in Health and Disease*, 2016 i 33–43.



61. Wu Y, Potempa LA, El KD, Filep JG. C-reactive protein and inflammation: conformational changes affect function. *Biol Chem*, 2015 i 1181–97, 396.
62. Trial J, Potempa LA, Entman ML. The role of C-reactive protein in innate and acquired inflammation: new perspectives. *Inflamm Cell Signal*, 2016 i e1409, 3(2)
63. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of inflammation and infection. *Frontiers in immunology*, 2018 i 9.
64. Kaur M. C-reactive protein: A prognostic indicator. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 2017 i 7(2, 1.
65. Zibae Nezhad MJ, GhanbariP, ShahryariB, AghasadeghK. C-Reactive Protein in Angiographically Documented Stable Coronary Disease. *ICRJ*. 2009 i 3(2):97-101.
66. Salazar J, Martínez MS, Chávez-Castillo M, Núñez V, Añez R et al. C-Reactive Protein: An In-Depth Look into Structure, Function, and Regulation. *Int Sch Res Notices*. 2015 i 653045., 2015.
67. Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 2013 i 7, 4:.
68. Stancel N, Chen CC, Ke LY, Chu CS, Lu J, Sawamura T, et al. Interplay between CRP, Atherogenic LDL, and LOX-1 and Its Potential Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chem*, 2016 i 320–7, 62.
69. ). Zimmermann O, Li K, Zaczekiewicz M, Graf M, Liu Z, Torzewski J.C-reactive protein in human atherogenesis: facts and fiction. *Mediators Inflamm*. 2015 i 2015:561428.
70. Szalai AJ, McCrory MA, Xing D, Hage FG, Miller A et al. Inhibiting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease: promising evidence from rodent models. *Mediators Inflamm*. 2015 i 2015:353614.
71. Valkanova V, Ebmeier KP, Allan CL. CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Affect Disord*, 2013 i 736–44, 150.

72. Paschoal RS, Silva DA, Cardili RN, Souza CD. Metabolic syndrome, C-reactive protein and cardiovascular risk in psoriasis patients: a cross-sectional study. *Anais brasileiros de dermatologia*, 2018 i 222-8, 93(2).
73. Baumeister D, Akhtar R, Ciufolini S, Pariante CM, Mondelli V. Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Mol Psychiatry*, 2016 i 642–9, 21.
74. Braig D, Nero TL, Koch HG, Kaiser B, Wang X, Thiele JR, et al. Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites. *Nat Commun*, 2017 i 14188, 8.
75. Qu J, Lü X, Liu Y, Wang X. Evaluation of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6 & serum amyloid A as diagnostic biomarkers of bacterial infection in febrile patients. *The Indian journal of medical research*, 2015 i 315, 141(3).
76. Shrivastava AK, Singh HV, Raizada A, Singh SK. C-reactive protein, inflammation and coronary heart disease. *The Egyptian Heart Journal*, 2015 i 89-97, 67(2).
77. Swiatkiewicz I, Kozinski M, Magielski P, Fabiszak T et al. Value of C-reactive protein in predicting left ventricular remodelling in patients with a first ST-segment elevation myocardial infarction. *Mediators of inflammation*, 2012 i 2012.
78. Li F, Huang H, Song L, Hao H, Ying M. Effects of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome on blood pressure and C-Reactive Protein in male hypertension patients. *J Clin Med Res*, 2016 i 220–4, 8(3).
79. Vishwanath A, Quaiser S, Khan R. Role of high-sensitivity C-reactive protein measurements in HIV patients. *Indian journal of sexually transmitted diseases*, 2016 i 123, 37(2).
80. Stępień M, Stępień A, Wlazeł RN, Paradowski M, Banach M, Rysz J. Obesity indices and inflammatory markers in obese non-diabetic normo-and hypertensive patients: a comparative pilot study. *Lipids in health and disease*. 2014 Dec;13(1):29-38.

81. Zeba AN, Delisle HF, Rossier C, Renier G. Association of high-sensitivity C-reactive protein with cardiometabolic risk factors and micronutrient deficiencies in adults of Ouagadougou, Burkina Faso. *British Journal of Nutrition*. 2013 Apr;109(7):1266-75.
82. Leal Vde O, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta*, 2013 i 87–94.
83. Carr BI, Akkiz H, Guerra V, Üsküdar O et al. C-reactive protein and hepatocellular carcinoma: analysis of its relationships to tumor factors. *Clinical practice (London, England)*, 2018 i 15:625.
84. She S, Xiang Y, Yang M, et al. C-reactive protein is a biomarker of AFP-negative HBV-related hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 2015 i 543–54, 47:.
85. Wang X, Hassan W, Jabeen Q, Khan GJ, Iqbal F. Interdependent and independent multidimensional role of tumor microenvironment on hepatocellular carcinoma. *Cytokine*, 2018 i 150–9, 103:.
86. Svensson E, Mor A, Rungby J, Berencsi K, Nielsen JS, Stidsen JV, Friborg S, Brandslund I, Christiansen JS, Beck-Nielsen H, Sørensen HT. Lifestyle and clinical factors associated with elevated C-reactive protein among newly diagnosed Type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study from the nationwide DD2 cohort. *BMC endocrine disorders*. 2014 Dec;14(1):74..
87. Thiele JR, Zeller J, Bannasch H1 Stark GB, Peter K, Eisenhardt SU. Targeting C-Reactive Protein in Inflammatory Disease by Preventing Conformational Changes. *Mediators Inflamm*. 2015 i 2015:372432.
88. Winston A, Jose S, Fisher M, Walsh J, Nelson M, Gilson R, Post F, Johnson M, Leen C, Chadwick D, Hay P. Host, disease, and antiretroviral factors are associated with normalization of the CD4: CD8 ratio after initiating antiretroviral therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015 Dec 1;136(6):1682-5.
89. Currier JS, Lundgren JD, Carr A, et al. Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. *Circulation* 2008 i 118:29–35.

90. Hsue PY, Deeks SG, Hunt PW. Immunologic basis of cardiovascular disease in HIV-infected adults. *J Infect Dis.* 2012 205 Suppl3:S375-82.
91. Stephan C, Hill A, Xi N, van Delft Y, Moecklinghoff C. Research letter: is monitoring for CD4 counts still needed for the management of patients with long-term HIV RNA suppression? *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012 Dec 15 i 61(5):e73-5.
92. Lucero T, Torres B, Leon A, et al. Rate and predictors of non-AIDS events in a cohort of HIV-infected patients with a CD4 T cell count above 500 cells/mm<sup>3</sup>. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2013 i 993–99., 29:.
93. Lu W, Mehraj V, Vyboh K, Cao W, Li T, Routy JP. CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients. *J Int AIDS Soc.* 2015 i 18:20052.
94. Baker JV, Peng G, Rapkin J, et al. CD4+ count and risk of non-AIDS diseases following initial treatment for HIV infection. *AIDS* 2008 i 22:841–8.
95. Lichtenstein KA, Armon C, Buchacz K, et al. Low CD4+ T cell count is a risk factor for cardiovascular disease events in the HIV outpatient study. *Clin Infect Dis* 2010 i 51:435–47.
96. Kaplan RC, Kingsley LA, Gange SJ, et al. Low CD4+ T-cell count as a major atherosclerosis risk factor in HIV-infected women and men. *AIDS* 2008 i 22:1615–24.
97. Abrams D, Levy Y, Losso MH, et al. Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 2009 i 361:1548–9.
98. Karim R, Mack WJ, Kono N, Tien PC, Anastos K, Lazar J, Young M, Desai S, Golub ET, Kaplan RC, Hodis HN. T-cell activation, both pre- and post-HAART levels, correlates with carotid artery stiffness over 6.5 years among HIV-infected women in the WIHS. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999).* 2014 Nov 1;67(3):349.
99. Kim KW, Kim BM, Moon HW, Lee SH, Kim HR. Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015 i 17:41.

100. Obradović-Tomašević B, Vujasinović-Stupar N, Tomašević R. Novi faktori rizika za kardiovaskularne bolesti kod bolesnika sa reumatoidnim artritisom. *Med Pregl*. 2008 i 601-606., LXI (11-12):.
101. Tanigaki K, Sundgren N, Khera A, Vongpatanasin W, Mineo C, Shaul PW. Fcγ receptors and ligands and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2015 Jan 16 i 116(2):368-84.
102. Mangili A, Polak JF, Quach LA, Gerrior J, Wanke CA. Markers of atherosclerosis and inflammation and mortality in patients with HIV infection. *Atherosclerosis*. 2011 i 214(2):468-73.
103. Duprez DA, Neuhaus J, Kuller LH, Tracy R, Bellosso W, De Wit S, Drummond F, Lane HC, Ledergerber B, Lundgren J, Nixon D, Paton NI, Prineas RJ, Neaton JD. Inflammation, coagulation and cardiovascular disease in HIV-infected individuals. *PLoS One*. 2012 i 7:e44.
104. Nordell AD, McKenna M, Borges AH, Duprez D, Neuhaus J, Neaton JD. Severity of cardiovascular disease outcomes among patients with HIV is related to markers of inflammation and coagulation. *J Am Heart Assoc*. 2015 i 3:e000844.
105. Pirš M, Jug B, Eržen B, Šabović M, Karner P, Poljak M, Tomažič J. Cardiovascular risk assessment in HIV-infected male patients: a comparison of Framingham, SCORE, PROCAM and DAD risk equations. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2015 i 23(3):43-7.
106. Nery MW, Martelli CM, Aparecida Silveira E, Sousa CA, Falco MD, Castro AD, Esper JT, Turchi MD. Cardiovascular risk assessment: a comparison of the Framingham, PROCAM, and DAD equations in HIV-infected persons. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
107. Friis-Møller N, Thiebaut R, Reiss P, Weber R, D'Arminio Monforte A, De Wit S, El-Sadr W, Fontas E, Worm S, Kirk O, Phillips A. Predicting the risk of cardiovascular disease in HIV-infected patients: the data collection on adverse effects of anti-HIV drugs study. *European journal of cardiovascular prevention & rehabilitation*. 2010 Oct;17(5):491-501.

108. Kim SB, Kim YC, Kim MH, Song JE, Oh DH, Ahn JY, Ku NS, Kim HW, Jeong SJ, Han SH, Song YG. A comparison of the predicted risk for cardiovascular disease between HIV-infected and uninfected persons in Korea. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2013 Nov 1;45(11):855-62.
109. Sankatsing RR, Wit FW, Vogel M, de Groot E, Brinkman K, Rockstroh JK, Kastelein JJ, Stroes ES, Reiss P. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients treated with protease inhibitors as compared to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Atherosclerosis*. 2009 Feb 1;202(2):589-95.
110. Kiage JN, Heimbürger DC, Nyirenda CK, Wellons MF, Bagchi S, Chi BH, Koethe JR, Arnett DK, Kabagambe EK. Cardiometabolic risk factors among HIV patients on antiretroviral therapy. *Lipids in health and disease*. 2013 Dec 1;12(1):50.
111. De Luca A, de Gaetano Donati K, Colafigli M, Cozzi-Lepri A, De Curtis A, Gori A, Sighinolfi L, Giacometti A, Capobianchi MR, D'Avino A, Iacoviello L. The association of high-sensitivity c-reactive protein and other biomarkers with cardiovascular disease in patients treated for HIV: a nested case-control study. *BMC infectious diseases*. 2013 Dec;13(1):414.
112. Trickey A, May MT, Schommers P, Tate J, Ingle SM, Guest JL, Gill MJ, Zangerle R, Saag M, Reiss P, Monforte AD. CD4: CD8 Ratio and CD8 Count as Prognostic Markers for Mortality in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients on Antiretroviral Therapy: The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CC). *Clinical Infectious Diseases*. 2017 Jul 11;65(6):959-66.
113. Sainz T, Alvarez-Fuente M, Navarro ML, Diaz L, Rojo P, Blazquez D, et al. Subclinical atherosclerosis and markers of immune activation in HIV-infected children and adolescents: the CaroVIH Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2014 1; 65(1):42-9.
114. Serrano-Villar S, Moreno S, Fuentes-Ferrer M et al. The CD4:CD8 ratio is associated with markers of age-associated disease in virally suppressed HIV-infected patients with immunological recovery. *HIV Med* 2014 1; 15:40-9.
115. Chaisson LH, Semitala FC, Asege L, Mwebe S, Katende J, Nakaye M, Andama AO, Marquez C, Atuhumuza E, Kanya M, Cattamanchi A. Point-of-care C-reactive protein and

risk of early mortality among adults initiating antiretroviral therapy. *Aids*. 2019 Apr 1;33(5):895-902.

116. Bian F, Yang X, Zhou F, Wu PH, Xing S, Xu G, Li W, Chi J, Ouyang C, Zhang Y, Xiong B, Li Y, Zheng T, Wu D, Chen X, Jin S. C-reactive protein promotes atherosclerosis by increasing LDL transcytosis across endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2014 i 171(10):267.

117. Moran CA, Sheth AN, Mehta CC, Hanna DB, Gustafson DR, Plankey MW, Mack WJ, Tien PC, French AL, Golub ET, Quyyumi A. The association of C-reactive protein with subclinical cardiovascular disease in HIV-infected and HIV-uninfected women. *Aids*. 2018 May 15;32(8):999-1006.

118. Hanna DB, Guo M, Bůžková P, Miller TL, Post WS, Stein JH, Currier JS, Kronmal RA, Freiberg MS, Bennett SN, Shikuma CM. HIV infection and carotid artery intima-media thickness: pooled analyses across 5 cohorts of the NHLBI HIV-CVD Collaborative. *Clinical Infectious Diseases*. 2016 Apr 26;63(2):249-56.

119. Westhorpe CL, Schneider HG, Dunne M1, Middleton T, Sundararajan V, Spelman T, Carter V, Crowe SM, Dart A, Mijch A, Kotsanas D, Woolley I. C-reactive protein as a predictor of cardiovascular risk in HIV-infected individuals. *Sex Health*. 2014 Dec i 11(6):580-586

120. McComsey GA, Kitch D, Sax PE, Tierney C, Jahed NC, Melbourne K, Ha B, Brown TT, Bloom A, Fedarko N, Daar ES. Associations of inflammatory markers with AIDS and non-AIDS clinical events after initiation of antiretroviral therapy: AIDS clinical trials group A5224s, a substudy of ACTG A5202. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2014 Feb 1;65(2):167.

121. Reingold JS et al. Association of HIV infection and HIV/HCV coinfection with C-reactive protein levels: The Fat Redistribution and Metabolic Change in HIV Infection (FRAM) study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008 Jun i 48:142.

122. Triant VA. Cardiovascular disease and HIV infection. *Current HIV/AIDS Reports*. 2013 Sep i 10(3):199-206.

123. Guimarães MM, Greco DB, Figueiredo SM, Fóscolo RB, Oliveira AR, Jr, Machado LJ. High-sensitivity C-reactive protein levels in HIV-infected patients treated or not with antiretroviral drugs and their correlation with factors related to cardiovascular risk and HIV infection. *Atherosclerosis*. 2008;201:434–9.
124. Bosna i Hercegovina, izvjestaj o razvoju 2015. Internet: [http://www.dep.gov.ba/razvojni\\_dokumenti/izvjestaji/Archive.aspx?langTag=bs-BA&template\\_id=140&pageIndex=1](http://www.dep.gov.ba/razvojni_dokumenti/izvjestaji/Archive.aspx?langTag=bs-BA&template_id=140&pageIndex=1) (pristupljeno decembar, 2018.).
125. Husain NE, Ahmed MH. Managing dyslipidemia in HIV/AIDS patients: challenges and solutions. *HIV AIDS (Auckl)*. 2014 i 7:1-10.
126. Gao N, Yu Y, Zhang B, Yuan Z, Zhang H, Song Y, Zhao M, Ji J, Liu L, Xu C, Zhao J. Dyslipidemia in rural areas of North China: prevalence, characteristics, and predictive value. *Lipids in health and disease*. 2016 Dec i 15(1):154.
127. Khatiwada S, Rajendra KC, Gautam S, Lamsal M, Baral N. Thyroid dysfunction and dyslipidemia in chronic kidney disease patients. *BMC Endocr Disord*. 2015 i 15:65.
128. Olamoyegun MA, Oluyombo R, Asaolu SO. Evaluation of dyslipidemia, lipid ratios, and atherogenic index as cardiovascular risk factors among semi-urban dwellers in Nigeria. *Ann Afr Med*. 2016 i 15(4):194-199.
129. Indumati V, Vijay V, Shekhanawar MS, Rajeshwari, Amareshwaras M, Shantala D. Comparison of Serum Lipid Profile in HIV Positive Patients on ART with ART Naïve Patients. *J Clin Diagn Res*. 2014 i 8(10):CC06-9.
130. Zephy D, Lakshmi LJ, Ashraff R. Lipid Profile among Art Treated and Untreated Patients in HIV Positive Cases. *Arch Med*. 2015, 8:2.
131. Augustemak de Lima LR, Petroski EL, Moreno YMF, Silva DAS, Trindade EBMS, Carvalho AP Back IC. Dyslipidemia, chronic inflammation, and subclinical atherosclerosis in children and adolescents infected with HIV: The PositHIVe Health Study. *PLoS One*. 2018 i 13.



132. Njoroge A, Guthrie BL, Bosire R, Wener M, Kiarie J, Farquhar C. Low HDL-cholesterol among HIV-1 infected and HIV-1 uninfected individuals in Nairobi, Kenya. *Lipids Health Dis.* 2017 i 16(1):110.
133. Gowdaiah PK, Reddy SS, Joseph J. Clinical study of lipid abnormalities in anti-retroviral treatment-naive HIV patients. *Int J Adv Med.* 2015 i 2(4):365-369.
134. Fruh SM. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J Am Assoc Nurse Pract.* 2017 i 29(S1):S3-S14.
135. Cefalu WT, Bray GA, Home PD, Garvey WT, Klein S, Pi-Sunyer FX, Hu FB, Raz I, Van Gaal L, Wolfe BM, Ryan DH. Advances in the Science, Treatment, and Prevention of the Disease of Obesity: Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum. *Diabetes Care.* 2015;38(8):1567-82.
136. Biggs C, Spooner E. Obesity and HIV: a compounding problem. *South African Journal of Clinical Nutrition* 2017 i 1(1):1–6.
137. Hasse B, Iff M, Ledergerber B, Calmy A, Schmid P, Hauser C, Cavassini M et al. Obesity Trends and Body Mass Index Changes After Starting Antiretroviral Treatment: The Swiss HIV Cohort Study. *Open Forum Infect Dis.* 2014 i 1(2):ofu040.
138. McCormick CL, Francis AM, Iliffe K, Webb H, Douch CJ, Pakianathan M, Macallan DC. Increasing Obesity in Treated Female HIV Patients from Sub-Saharan Africa: Potential Causes and Possible Targets for Intervention. *Front Immunol.* 2014 i 5:507.
139. Ebonyi AO, Oguche S, Ochoga MO1, Agbaji OO, Anejo-Okopi JA, Abah IO, Okonkwo PI2, Idoko JA3. Changes in the haematological parameters of HIV-1 infected children at 6 and 12 months of antiretroviral therapy in a large clinic cohort, North-Central Nigeria. *J Virus Erad.* 2017;3(4):208-211.
140. Dhal N, Panda S, Mohapatra N, Pattanayak NC, Pattanaik R. Study of haematological abnormalities in HIV infected patients and its correlation with CD4 counts. *Int J Res Med Sci.* 2018 i 6(9):2937-2942.

141. Kibaru EG, Nduati R, Wamalwa D, Kariuki N. Impact of highly active antiretroviral therapy on hematological indices among HIV-1 infected children at Kenyatta National Hospital-Kenya: retrospective study. *AIDS Res Ther.* 2015 i 12:26.
142. Bhowmik A, Banerjee P. Hematological manifestation in HIV infected children. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2015 i 25(2):119-23.
143. Anzinger JJ1, Butterfield TR1, Angelovich TA2, Crowe SM3, Palmer CS4. Monocytes as regulators of inflammation and HIV-related comorbidities during cART. *J Immunol Res.* 2014 i 2014:569819.
144. Bowers NL, Helton ES, Huijbregts RP, Goepfert PA, Heath SL, Hel Z. Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog.* 2014 i 10(3):e1003993.
145. Shi X, Sims MD, Hanna MM, Xie M, Gulick PG, Zheng YH, Basson MD, Zhang P. Neutropenia during HIV infection: adverse consequences and remedies. *Int Rev Immunol.* 2014 i 33(6):511-36.
146. Reda AA, Biadgilign S, Deribew A, Gebre B, Deribe K. Predictors of change in CD4 lymphocyte count and weight among HIV infected patients on anti-retroviral treatment in Ethiopia: a retrospective longitudinal study. *PLoS One.* 2013 i 8(4):e58595.
147. Osime EO, Innih SO. Effect of highly active antiretroviral therapy on neutrophil/lymphocyte ratio using white rabbit. *Sahel Med J.* 2017 i 20:72-4.
148. 2016, Raheem AH. Erythrocyte sedimentation rate in patients with positive sputum for AFB and negative HIV serological test. *Muthanna Medical Journal.* i 3(1):17-23.
149. Nwabuko CO. Relationship between Some Hematologic Parameters (ESR, CDC) and CD4-Positive Lymphocyte Count in HIV Sero-Positive Anti-Retroviral-Naïve Individuals with Tuberculosis Co-Infection. *J Blood Lymph.* 2018 i 212., 8(2).
150. Dalela G, Baig VN. Correlation between Total Leukocyte Count, Absolute lymphocyte count, Hemoglobin, Erythrocyte sedimentation rate and CD4 Count in HIV/AIDS Patients *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 2015;4(9):366-371.

151. Ifeanyichukwu OM, Bright EO. Effect of HIV infection on some haematological parameters and immunoglobulin levels in hiv patients in benin city, Southern Nigeria. *J HIV Retrovirus*. 2016 i 2:2.
152. 2013, Venkataramana K. A study of biological markers in HIV disease progression and management in the highly active antiretroviral therapy (HAART) era. *Am J Biosci Bioeng*. i 1(2):24-37.
153. Esan MO, van Hensbroek MB, Nkhoma E, Musicha C, White SA, Ter Kuile FO, Phiri KS. Iron supplementation in HIV-infected Malawian children with anemia: a double-blind, randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2013 i 57(11):1626–1634.
154. Fan HW, Guo FP, Li YJ, Li N, Li TS. Prevalence of thrombocytopenia among Chinese adult antiretroviral-naïve HIV-positive patients. *Chin Med J (Engl)*. 2015 i 128(4):459-64.
155. Zetterberg E, Neuhaus J, Baker JV, Somboonwit C, Llibre JM, Palfreeman A, Chini M, Lundgren JD, 2013, INSIGHT SMART Study Group. *AIDS*. i 27(1):59-68.
156. Seyoum M, Enawgaw B, Getaneh Z, Engidaye G, Asrie F, Melku M. Basic Coagulation Parameters among Human Immunodeficiency Virus-Infected Adults in Gondar, Northwest Ethiopia: A Comparative Cross-Sectional Study. *Biomed Res Int*. 2018 May 15 i 2018:5320827.
157. Ibeh BO, Omodamiro OD, Ibeh U, Habu JB. Biochemical and haematological changes in HIV subjects receiving winniecure antiretroviral drug in Nigeria. *J Biomed Sci*. 2013 i 20:73.

## SKRAĆENICE

Skraćenica	Značenje (bosanski)	Značenje (engleski)
HIV	Virus humane imunodeficijencije	
AIDS	SIDA - sindrom stečene imunodeficijencije	Acquired Immune Deficiency Syndrome
CRP	C-reaktivni protein	
RNK	Ribonukleinska kiselina	
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina	
RT	Reverzna transkriptaza	
gp120	Glikoprotein ovojnice gp120	Envelope glycoprotein GP120
gp41	Glikoprotein 41	glycoprotein 41
CD4	Podtip T limfocita	Cluster of differentiation 4 T lymphocyte
CCR5	C-C hemokinski receptor tip 5	C-C chemokine receptor type 5
CXCR4	C-X-C hemokinski receptor tip 4	C-X-C chemokine receptor type 4
CD8	Podtip T limfocita	Cluster of differentiation 8 T lymphocyte
ART	Antiretroviralna terapija	Antiretroviral therapy
UN	Ujedinjene nacije	United Nations
cART	Kombinirana antiretroviralna terapija	Combined antiretroviral therapy
EACS	Evropsko kliničko udruženje za AIDS	The European AIDS Clinical Society
HBV	Virus B hepatitisa	Hepatitis B virus
HCV	Virus C hepatitisa	Hepatitis C virus
NNRTI	Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors
NRTI	Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze	Nucleoside reverse transcriptase inhibitors
PI	Inhibitori proteaze	Protease inhibitors
INSTI	Inhibitori prenosa integrazne niti	Integrase strand transfer inhibitors
PI/r	Inibitori proteaze pojačani ritonaviro	Ritonavir boosted protease inhibitors
TDF	Tenofovir	Tenofovir
FTC	Emtricitabin	Emtricitabine
EFV	Efavirenz	Efavirenz
ABC	Abakavir	Abacavir
3TC	Lamivudin	Lamivudine
NVP	Nevirapin	Nevirapine
ATV	Atazanavir	Atazanavir
DRV	Darunavir	Darunavir
LPV/r	Lopinavir/ritonavir	Lopinavir/ritonavir
RAL	Raltegravir	Raltegravir
SQV/r	Sakvinavir/ritonavir	Saquinavir/ritonavir
AZT	Zidovudin	Zidovudine
FPV/r	Fosamprenavir/ritonavir	Fosamprenavir/ritonavir
ddI	Didanozin	Didanosine

MVC	Maravirok	Maraviroc
HLA	Humani leukocitni antigen	Human leukocyte antigen
mL	Militara	
BIH	Bosna i Hercegovina	
EU	Evropska unija	European Union
d4T	Stavudin	Stavudine
IDV	Indinavir	Indinavir
KVB	Kardiovaskularne bolesti	
SAD	Sjedinjene američke države	
hsCRP	Visoko senzitivni C-reaktivni protein	High Sensitivity C-Reactive Protein
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija	
ITM	Indeks tjelesne mase	BMI-Body Mass Index
BSI	Indeks oblika tijela	Body Shape Index
MS	Metabolički sindrom	
LDL	Lipoproteinski holesterol niske gustine	Low-density lipoprotein
HDL	Holesterol visoke gustine	High-density lipoprotein
ET-1	Endotelin-1	
NK ćelije	Ćelije prirodne ubice	Natural killer cells
IL	interleukin	
TH ćelije	T pomoćne ćelije	T helper cells
CD14	Podtip 14 T limfocita	Cluster of differentiation 14 T lymphocyte
CD28	Podtip 28 T limfocita	Cluster of differentiation 28 T lymphocyte
CMV	Citomegalovirus	Cytomegalovirus
itd.	I tako dalje	
IDF	Međunarodna federacija za šećernu bolest	The International Diabetes Federation
TNF- $\alpha$	Faktor tumorske nekroze alfa	Tumor necrosis factor alpha
IgM	Imunoglobulin M	
IgG	Imunoglobulin G	
mg/L	Miligrama po litru	
ICAM-1	Intracelularne adhezije molekule-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
VCAM-1	Vaskularne adhezije molekule-1	Vascular cell adhesion protein 1
KCUS	Klinički centar Univerziteta u Sarajevu	
PROCAM	Munsterska prospektivna kardiovaskularna studija	Prospective Cardiovascular Münster Study
D:A:D	kalkulator za izračunavanje rizika od KVB, koji uključuje i anti HIV lijekove	Data Collection of Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) equation risks.
FITC	Florescin-izotiocijanat	Fluorescein isothiocyanate
PE	Fikoeritrin	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-hlorofil	Peridinin chlorophyll
APC	Alofikocianin	Allophycocyanin
FSC	Raspršivanje svjetla prema naprijed	Forward Scatter
SSC	Raspršivanje svjetla u stranu	Side scatter
CD19	Podtip 19 B limfocita	Cluster of Differentiation 19 B cell
WBC	Broj leukocita	White blood count
Lym	Broj limfocita	Lymphocytes

CD3	Podtip T limfocita	Cluster of differentiation 3 T cell
CD16	Podtip NK ćelija	Cluster of differentiation 16 NK cell
CD56	Podtip NK ćelija	Cluster of differentiation 56 NK cell
mmol/L	Milimola po litru	
SE	Sedimentacija eritrocita	
mm	Milimetara	
g/L	Grams po litru	
μL	Mikrolitara	
ROC	ROC kriva	Receiver Operating Characteristics
AUC	Površina ispod ROC krive	Area Under the Curve

## **BIOGRAFIJA**

Dr Refet Gojak rođen je 12.05.1974. godine Gojkovićima, opština Prijepolje, R.Srbija.

Osnovno i srednje obrazovanje - Gimnaziju „ Prof. Branko Radičević“ završio je u Prijepolju. Studije medicine upisuje šk. 1994. godine u na Medicinskom fakultetu u Univerziteta u Nišu, a završava 2003. na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Sarajevu. Nakon diplomiranja radio kao asistent na Fakultetu zdravstvenih studija. Od 2006. godine je uposlenik KCU Sarajevo, gdje završava specijalizaciju iz infektivnih bolesti 2011. godine.

Doktorske studije upisuje 2009. godine na Fakultetu medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, a usmeni doktorski ispit položio je 2016 godine.

Od 2014. godine radio kao asistent na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Sarajevu, oblast Infektologija.

Objavio je 37 autorskih i koautorskih radova publikovanih u stručnim domaćim i starnim časopisima.

Živi i radi u Sarajevu, Bosna i Hercegovina, oženjen, otac troje djece.

## BIBLIOGRAFIJA

Radovi koji su bili uslov za prijavu završne doktorske disertacije

Br.	Autori i naziv rada	SCI	Imp. faktor
1.	<b>Gojak R</b> , Hadziosmanovic V, Baljic R, Zecevic L, Coric J, Mijailovic Z. CD4/CD8 ratio as a predictor for the occurrence of metabolic syndrome in HIV/AIDS patients during 6 months of cART therapy. J Med Biochem. 2019; 38	sci	1,37
2.	Baljic R, <b>Gojak R</b> , Konjo H, Hukic M. Granulysin as a novel factor for the prognosis of the clinical course of chickenpox. Epidemiology & Infection. 2018 May;146(7):854-7.	sci	2,04
3.	Adrovic A, Oztunc F, Barut K, Koka A, <b>Gojak R</b> , Sahin S, Demir T, Kasapcopur O. The frequency of pulmonary hypertension in patients with juvenile scleroderma. Bosnian journal of basic medical sciences. 2015 Sep;15(4):30.	sci	0,5
4.	Luljeta NA, Mehic B, <b>Gojak R</b> , Arber N. The Frequency of Influenza-Like Illness in Patients with Allergic Asthma on Immunotherapy. Immunome Research. 2015 May 1;11(2):1.	sci	0,47
5.	Denislic M, Tiric-Campara M, Resić H, Al-Hashel JY, <b>Gojak R</b> , Ravnik J. A neurophysiological study of large-and small-diameter nerve fibers in the hands of hemodialysis patients. International urology and nephrology. 2015 Nov 1;47(11):1879-87.	sci	1,42
6.	Lujinović A1, Kulenović A, Kapur E, <b>Gojak R</b> . Morphological aspects of myocardial bridges. Bosn J Basic Med Sci. 2013 Nov;13(4):212-7.	sci	0,5
7.	<b>Gojak R</b> , Ferhatovic M, Bajramovic N, Hadzic A, Gazibera B, Bankovic D. Importance of Quick Test for Screening of Former Drug Users. Medical Archives. 2012 Jan 1;66:30.(2), 46-48	/	/



## **PRILOG**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA  
КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

### **УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ**

**Редни број - РБ:**

**Идентификациони број - ИБР:**

**Тип документације - ТД:** Monografija

**Тип записа - ТЗ:** Tekstualni printani materijal

**Врста рада - ВР:** Doktorska disertacija

**Аутор - АУ:** Refet Gojak

**Ментор/коментор - МН:** Prof.dr Željko Mijailović, vanredni professor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

**Наслов рада - НР:** Значај CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> количника и С-реактивног протеина у праћењу кардиоваскуларног ризика код HIV позитивних пацијената током сART терапије

**Језик публикације - ЈП:** Bosanski (latinično pismo)

**Језик извода - ЈИ:** Bosanski / Engleski

**Земља публикавања - ЗП:** R.Srbija

**Уже географско подручје - УГП:** Kragujevac

**Година - ГО:** 2019.

**Издавач - ИЗ:** Autorski reprint

**Место и адреса - МС:** Fakultet medicinskih nauka, Kragujevac, Svetozara Markovića br. 69, 34000 Kragujevac, Srbija

**Физичи опис рада - ФО:** 10 poglavlja, 143 stranica, 25 tabela, 28 grafikona, 157 referenci; 4 priloga

**Научна област - УДК:** Medicina

**Научна дисциплина - ДИ:** Infektologija

**Предметна одредница/ кључне речи – ПО :** CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> odnos; C-reaktivni protein, kardiovaskularna bolest, HIV/AIDS, сART

**Чува се - ЧУ:** Biblioteka Fakulteta medicinskih nauka u Kragujevcu, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac

**Важна напомена- МН:** Istraživanje je rađeno na Klinici za infektivne bolesti KCU Sarajevo, uz dozvole instituta za Nauku i razvoj, i етичког комитета KCU Sarajevo.

**Извод - ИД:** *Uvod:* HIV-infekcija se karakteriše progresivnim manjkom CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T-ćelija zbog njihove smanjene sinteze, povećanog uništavanja i izrazite aktivacije i ekspanzije CD<sub>8</sub><sup>+</sup> T limfocita. CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> odnos (količnik, *engl.* ratio) se sve više pojavljuje kao marker različitih ishoda kod HIV-inficiranih pojedinaca. S druge strane CRP je tradicionalno opisivan kao dobar marker akutne upale i danas je jedan od standardnih testova koji se koriste u svakodnevnoj kliničkoj praksi, za postavljanje dijagnoze i praćenje prognoze upale. Međutim, uloga CRP-a u različitim fiziološkim procesima, naročito kod perzistentne

infekcije i imunske aktivacije nije do kraja jasna. Efikasnom i savremenom terapijom HIV-a život ovakvih pacijenta je značajno produžen. Primarni cilj antiretrovirusne terapije (ART) je spriječiti HIV-povezane bolesti i smrtnost, a sekundarni cilj je da se smanji rizik od prijenosa HIV-a. Ovaj cilj se najbolje postiže pomoću efikasne cART, kojom se maksimalno inhibira HIV replikacija, tako da plazmatska HIV RNK (viremija) ostaje ispod nivoa kojeg je moguće detektovati pomoću komercijalno dostupnih testova.

**Cilj:** Osnovni cilj ovog istraživanja je da se ispita kolika je moć CD4/CD8 odnosa i CRP-a da predvidi razvoj rizika kardiovaskularne bolesti (KVB) kod HIV pozitivnih pacijenata koji primaju cART terapiju.

**Materijal i metode:** U retrospektivno-prospektivnoj kohortnoj studiji ponovljenih mjerenja bilo je uključeno 76 HIV pozitivnih ispitanika. Za određivanje udjela (procenta) CD4+ i CD8+ ćelija, iz periferne krvi pacijenata, korištena je metoda protočne citometrije. U ovoj studiji evaluirane su vrijednosti biokemijskih parametara (CRP-a, lipidnog statusa), parametara krvne slike (eritrociti, hemoglobin, hematokrit, trombociti), leukociti i leukocitarna formula te sedimentacija kao nespecifični parametri akutne upale, potom imunološki parametar CD4/CD8 odnos, antropometrijska mjerenja- ITM, te vrsta cART terapije. Za statističku analizu korišten je softver SPSS, odnosno parametrijski i neparametrijski testovi, Spirmanova (rho) korelacija, standardna regresiona analiza i ROC kriva.

**Rezultati:** U istraživanje je uključeno 76 ispitanika, 67 (88,2 %) muškaraca i 9 (11,8 %) žena. Ispitanici su prosječne starosti  $35,2 \pm 8,7$  godina, najmlađi ispitanik imao je 18, a najstariji 57 godina. Standardnom regresionom analizom, ispitan je uticaj nezavisnih prediktora (starosti, pola, navike pušenja, familijarne anameze za KVB, ITM, cART, sistolnog i dijastolnog pritiska, holesterola, triglicerda, HDL-a, ŠUK-a, CRP-a, CD4 i CD4/CD8) na zavisno promjenljivu rizik za KVB bazično i nakon 3, 6, 12, 18 i 24 mjeseca cART. Od 12. do 24. mjeseca osim standardnih rizikofaktora za predikciju razvoja KVB, CD4/CD8 odnos i CRP se javljaju kao značajni prediktori. Nakon 24 mjeseca cART, CRP se pokazao kao najbolji prediktor rizika za KVB ( $\beta=0,224$ ;  $p=0,026$ ), veće vrijednosti ovog parametara utiču na veći rizik za KVB, potom CD4/CD8 odnos ( $\beta=-0,200$ ;  $p=0,025$ ), s tim da veći odnos smanjuje vjerovatnoću za rizik KVB. Terapija (cART) u ovom regresionom modelu prvi put je nakon 24 mjeseca pokazala statistički značajan uticaj na rizik za KVB ( $\beta=0,197$ ;  $p=0,013$ ). Ispitanici koji su u kombinovanoj terapiji imali PI, imaju veći rizik za KVB. Od 18. mjeseca cART CRP može biti marker srednjeg rizika za KVB, a nakon 24 mjeseca vrijednosti CRP-a od 5,31 mg/L ima najveću senzitivnost 78,3% i najveću specifičnost 86,8%, kao marker srednjeg u odnosu na niski rizik za KVB ( $p=0,0001$ ;  $AUC=0,882$ ). Od 12 mjeseca cART CD4/CD8 odnos može biti marker niskog rizika za KVB. Nakon 24 mjeseca terapije prosječna vrijednost CD4/CD8 odnosa od 0,53 ima najveću senzitivnost 66,0% i najveću specifičnost 73,9%, kako marker niskog u odnosu na srednji rizik za KVB ( $p=0,001$ ;  $AUC =0,762$ ).

**Zaključci:** Količnik CD4/CD8 i CRP su se pokazali se kao značajni prediktori za rizik KVB, i kao markeri koji mogu razlikovati nizak/srednji rizik za KVB kod HIV pacijenata nakon 12 mjeseci cART.

**Ključne riječi:** CD4/CD8 odnos, C-reaktivni protein, HIV, AIDS, kardiovaskularna bolest, cART

**Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП:** 12.07.2017.

**Датум одбране - ДО:**

**Чланови комисије - КО:**

- 1. Prof. Dr Predrag Čanović, redovni profesor na Fakultetu medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu za užu naučnu oblasti Infektivne bolesti, Predsednik**
- 2. Prof. Dr Olgica Gajović, vanredni profesor na Fakultetu medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu za užu naučnu oblast infektivnih bolesti, član**
- 3. Doc. Dr Maja Ružić, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu za užeu naučnu oblast Infektivne bolesti, član**

## KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

**Accession number - ANO: Monograf documentation**

**Identification number - INO:**

**Documentation type - DT: Textual printed material**

**Type of record - TR: Textual printed material**

**Contents code - CC: PhD Thesis**

**Author - AU: Refet Gojak**

**Menthor/co-mentor - MN: Željko Mijailović, PHD, MD, Associate Professor**

**Title - TI: Significance of CD<sub>4</sub> / CD<sub>8</sub> ratio and C-reactive protein in monitoring cardiovascular risk in HIV positive patients during cART therapy**

**Language of text - LT: Bosnian (Latin)**

**Language of abstract: Bosnian/ English**

**Country of publication - CP: Serbia**

**Locality of publication - LP: Kragujevac**

**Publication year - PY: 2019**

**Publisher - PU: Author reprint**

**Publication place - PP: Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia**

**Physical description - PD: 10 chapters, 143 pages, 25 tables, 28 charts, 157 references; 4 attachments**

**Scientific field - SF: MEDicine**

**Scientific discipline - SD: Infectology, Infection diseases**

**Subject/key words - SKW:**

**UDC**

**Holding data: Library of the Faculty of Medical Sciences in Kragujevac, Svetozara marovića 69, 34000 Kragujevac**

**Note- N: The research was carried out at the Clinical Center for Infectious Diseases KCU Sarajevo, with the licenses of the Institute for Science and Development, and the Ethics Committee of the KCU Sarajevo.**

## ABSTRACT

**Introduction:** HIV infection is characterized by a progressive deficiency of CD4+ T cells due to their reduced synthesis, increased destruction and marked activation and expansion of CD8+ T lymphocytes. The CD4/CD8 ratio is increasingly emerging as a marker of different outcomes in HIV-infected individuals. On the other hand, CRP has traditionally been described as a good marker of acute inflammation and is today one of the standard tests used in everyday clinical practice to diagnose and monitor inflammation prognosis.

However, the role of CRP in various physiological processes, especially in persistent infections and immune activation, is not entirely clear. The primary goal of antiretroviral therapy (ART) is to prevent HIV-related diseases and mortality, and the secondary goal is to reduce the risk of HIV transmission. This goal is best achieved by using efficient combination ART (cART), which maximally inhibits HIV replication, so that plasma HIV RNA (viral load) remains below the level that can be detected by commercially available tests.

**Aim:** The main objective of this study is to examine the power of the CD4/CD8 ratio and CRP in predicting the risk of development of cardiovascular disease (CVD) in HIV positive patients receiving cART therapy.

**Material and methods:** In the retrospective-prospective cohort study of repeated measurements, 76 HIV positive subjects were included. The method of flow cytometry was used to determine the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the peripheral blood of patients. In this study the values of biochemical parameters (CRP, lipid status), blood parameters (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, platelets), leukocytes, leukocyte formula, and sedimentation as non-specific parameters of acute inflammation were evaluated, followed by immunocompetent CD4/CD8 ratio, anthropometric measurements - ITM, and cART therapy type. For statistical analysis SPSS software was used, i.e. parametric and nonparametric tests, Spearman's (rho) correlation, standard regression analysis and ROC curve.

**Results:** The study included 76 subjects, 67 (88.2%) males and 9 (11.8%) women. The average age of subjects was  $35.2 \pm 8.7$  years; the youngest subject was 18 and the oldest 57 years old. By standard regression analysis, the influence of independent predictors (age, gender, smoking habits, familial anamnesis for CVD, ITM, cART, systolic and diastolic pressure, cholesterol, triglycerides, HDL, blood sugar, CRP, CD4 and CD4/CD8 ratio) on the dependent variable risk of CVD, baseline and after 3, 6, 12, 18 and 24 months of cART was examined. From 12 to 24 months apart from the standard risk factors for predicting the development of CVD, CD4/CD8 ratio and CRP appear as significant predictors. After 24 months of cART, CRP proved to be the best risk predictor of CVD (beta = 0.224; p = 0.026), higher values of this parameter affect higher risk for CVD, then CD4/CD8 ratio (beta -0.200, p = 0.025), with a higher ratio decreasing the likelihood of CVD risk. Therapy (cART) in this regression model showed the first time after 24 months a statistically significant impact on CVD risk (beta = 0.197; p = 0.013). Subjects who had PI in combination therapy had a higher risk for CVD. From 18 months of cART CRP may be a medium risk marker for CVD, and after 24 months the CRP value of 5.31 mg/L has the highest sensitivity of 78.3% and the highest specificity of 86.8%, as a marker of medium compared to low risk for CVD (p = 0.0001; AUC = 0.882). After 12 months of cART CD4/CD8 ratio can be a low risk marker for CVD. After 24 months of therapy, the average CD4/CD8 ratio of 0.53 had the highest sensitivity 66.0% and the highest specificity was 73.9%, as the marker of low compared to medium risk for CVD (p = 0.001, AUC = 0.762).

**Conclusion:** CD4/CD8 ratio and CRP counts have been shown to be significant CVD risk predictors, and as markers that may differentiate low and intermediate risk for CVD in HIV patients after 12 months of cART.

**Key words:** CD4/CD8 ratio, C-reactive protein, HIV, AIDS, cardiovascular disease, cART

**Accepted by the Scientific Board on - ASB:** 12.07.2017.

**Defended on - DE:**

**Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:**

1. Predrag Čanović, PHD, MD, full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Infectious Diseases, President
2. Olgica Gajović, PHD, MD, associate professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for a narrow scientific field of infectious diseases, member
3. Maja Ružić, PHD, MD, Assistant Professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad for the scientific field Infection disease, member

## Mišljenje etičkog komiteta KCU Sarajevo

KLINIČKI CENTAR UNIVERZITETA  
SARAJEVO

ETIČKI KOMITET  
Sarajevo, 27.12.2016. godine



INSTITUT ZA NAUČNO-ISTRAŽIVAČKI RAD I RAZVOJ  
N/r Direktorice  
Prof. dr. Enra Suljić

KLINIKA ZA INFektivNE BOLESTI  
N/r Dr. Refet Gojak

**PREDMET: Mišljenje Etičkog komiteta o etičkom aspektu ispitivanja u okviru projekta doktorskog rada**

Etički komitet je razmatrao Vaš zahtjev i zaključio slijedeće:

Etički komitet nema primjedbi što se tiče etičkog aspekta kliničkog ispitivanja u okviru projekta Vašeg doktorskog rada pod naslovom "PREDIKTIVNI ZNAČAJ CD4/CD8 KOLIČNIKA I CRP-a U PRAĆENJU KARDIOVASKULARNOG RIZIKA KAO NE-AIDS DEFINIRANE BOLESTI KOD HIV POZITIVNIH PACIJENATA TOKOM cART TERAPIJE"

Mentor (Sarajevo): Prof. dr. Mirza Dilić

Mentor (Kragujevac): Prof. dr. Željko Mijalović

S poštovanjem,

Za  
Predsjednica Etičkog komiteta  
Doc. dr. Mirijana Haxhibegović-Karahdić

*Mirijana Haxhibegović-Karahdić*

KLINIČKI CENTAR UNIVERZITETA  
U SARAJEVU  
ETIČKI KOMITET

## Potvrda o izvodljivosti studije istraživanja za doktorsku disertaciju

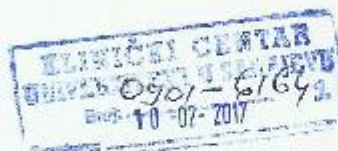


Institut za  
naučnoistraživački  
rad i razvoj

Broj: 0901 - 2 - \_\_\_\_\_ /17

Sarajevo, \_\_\_\_\_ 2017. godine

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA



### POTVRDA o izvodljivosti studije istraživanja za doktorsku disertaciju Mr.sc.dr. Refeta Gojaka


Na CXXXIV sjednici Naučnog vijeća Kliničkog centra Univerziteta Sarajevo održanoj 06.02. 2017. godine, razmatran je prijedlog projekta doktorske disertacije Mr.sc.dr. Refeta Gojaka pod nazivom "PREDIKTIVNI ZNAČAJ CD4/CDB KOLIČNIKA I CRP-a U PRAĆENJU KARDIOVASKULARNOG RIZIKA KAO NE-AIDS DEFINIRANE BOLESTI KOD HIV POZITIVNIH PACIJENATA TOKOM cART TERAPIJE". Imenovani je Institutu za naučno-istraživački rad i razvoj KCUS dostavio sve tražene podatke. Supervizor/Mentor I predloženog projekta je Prof.dr. Mirza Dilić (Sarajevo), dok je Supervizor/Mentor II Prof.dr. Željko Mijanović (Kragujevac).

Nakon uvidu u prijedlog projekta doktorske disertacije Mr.sc.dr. Refeta Gojaka članovi Naučnog vijeća jednoglasno su dali **SAGLASNOST** za izdavanje potvrde o izvodljivosti studije istraživanja za navedenu doktorsku disertaciju unutar Kliničkog centra Univerziteta Sarajevo.

U prilogu Vam šaljem saglasnost Etičkog komiteta i organizacionih jedinica Kliničkog centra Univerziteta Sarajevo, u kojima će se provoditi istraživački dio projekta doktorske disertacije.

S poštovanjem,

Pripremila: Senada Mujezinović  
sekretar Naučnog vijeća

  
PREDSJEDNICA NAUČNOG VIJEĆA I  
DIREKTORICA  
DISCIPLINE ZA NAUKU I NASTAVU  
Prof.dr. Ena Mehmedika-Suljić

  
GENERALNA DIREKTORICA  
KLINIČKOG CENTRA  
UNIVERZITETA SARAJEVO  
Prof.dr. Sebija Izetbegović



**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

---

---

---

која је одбрањена на \_\_\_\_\_  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

---

---

---

која је одбрањена на \_\_\_\_\_

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

---

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

## CD4/CD8 RATIO AS A PREDICTOR FOR THE OCCURRENCE OF METABOLIC SYNDROME IN HIV / AIDS PATIENTS DURING 6 MONTHS OF cART THERAPY

ODNOS CD4/CD8 KAO PREDIKTOR POJAVE METABOLIČKOG SINDROMA KOD PACIJENATA SA HIV-OM/AIDS-OM TOKOM 6 MESECI cART TERAPIJE

Refet Gojak<sup>1</sup>, Vesna Hadžiosmanović<sup>1</sup>, Rusmir Baljić<sup>1</sup>, Lamija Zečević<sup>2</sup>, Jozo Ćorić<sup>3</sup>, Željko Mijailović<sup>4</sup>

<sup>1</sup>University Clinical Centre Sarajevo, Clinic for Infectious Diseases, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

<sup>2</sup>University Clinical Centre Sarajevo, Department of Immunology, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

<sup>3</sup>University Clinical Centre Sarajevo, Department of Clinical Biochemistry, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

<sup>4</sup>University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Infectious Diseases

### Summary

**Background:** HIV infection is characterized by progressive depletion of CD4<sup>+</sup> T cells due to their reduced synthesis and increased destruction followed by marked activation and expansion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. CD4/CD8 ratio was traditionally described as a marker of immune system ageing in the general population, but it increasingly appears as a marker of different outcomes in the HIV-infected population. The main objective of this study is to examine the power of CD4/CD8 ratio in predicting the occurrence of metabolic syndrome (MetS) in HIV-positive patients receiving cART therapy.

**Methods:** 80 HIV/AIDS subjects were included in a retrospective case-control study. Flow cytometry was used to determine the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in peripheral blood of these patients. The values of biochemical parameters (triglycerides, HDL, blood sugar, blood counts), immunological parameters (CD4/CD8, PCR), anthropometric measurements and type of cART therapy were evaluated in this study.

**Results:** After six months of cART therapy 19 (23.8%) subjects had all the elements necessary for making the diagnosis of MetS. Using multivariate analysis CD4/CD8 ratio was statistically significant ( $p < 0.05$ ) and had the largest effect on development of MetS (Wald = 9.01; OR = 0.45), followed by cART (Wald = 7.87; OR = 0.10) and triglycerides (Wald = 5.27; OR = 1.7). On the other hand,

### Kratak sadržaj

**Uvod:** HIV-infekcija se karakteriše progresivnim gubitkom CD4<sup>+</sup> T-ćelija zbog njihove smanjene sinteze, povećanog uništavanja i izrazite aktivacije i ekspanzije CD8<sup>+</sup> T limfocita. Količnik CD4/CD8 je tradicionalno opisan kao marker imunostarenja u opštoj populaciji, ali se sve više pojavljuje kao marker različitih ishoda kod HIV-inficiranih pojedinaca. Osnovni cilj istraživanja je da se ispita kolika je moć CD4/CD8 količnika da predvidi nastanak metaboličkog sindroma kod HIV pozitivnih pacijenata koji primaju cART terapiju.

**Metode:** U retrospektivnoj studiji slučaj/kontrola je bilo uključeno 80 HIV/AIDS ispitanika. Za određivanje udela (procenta) CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija iz periferne krvi pacijenata, korišćena je metoda protočne citometrije. U ovoj studiji evaluirane su vrednosti biohemijskih parametara (trigliceridi, HDL, šećer u krvi, KS), imunoloških parametara (CD4/CD8, PCR), antropometrijska merenja, te vrsta cART.

**Rezultati:** Nakon 6 meseci cART terapije 19 (23,8%) ispitanika je ispunjavalo sve kriterijume za postavljanje dijagnoze MS. Multivarijantnom analizom statistički značajan ( $p < 0,05$ ) i najveći uticajan na razvoj MS je imao količnik CD4/CD8 (Wald = 9,01; OR = 0,45), potom cART (Wald = 7,87; OR = 0,10), i na kraju trigliceridi (Wald = 5,27; OR = 1,7). S druge strane, telesna težina i obim struka nisu pokazali statistički značajan uticaj na razvoj MS nakon šest meseci cART,  $p > 0,05$ .

Address for correspondence:

Refet Gojak

Clinic for Infectious Diseases,

University Clinical Centre Sarajevo,

25 Bolnička Street, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

phone: +387 33 297 25; Fax: +387 33 297 019

e-mail: refetmd@gmail.com

body weight and waist circumference showed no statistically significant effect on the development of MetS after six months of cART,  $p > 0.05$ .

**Conclusions:** CD4/CD8 ratio proved to be a significant marker for prediction of metabolic syndrome in HIV/AIDS patients.

**Keywords:** HIV/AIDS, metabolic syndrome, CD4/CD8 ratio, cART

## Introduction

HIV (human immunodeficiency virus) is a retrovirus which infects immune cells, especially CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, and leads to progressive decay of these cells. CD4 cell count is used as a measure of immune function, and a lower CD4 cell count points to a weaker immune system (1). The reduction of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes after HIV infection has several explanations, one of which is that frequent infections in these patients lead to chronic activation of T-lymphocytes that ends with their apoptosis in a process called activation-induced cell death. The t-cell loss is the most reliable indicator of disease progression (2). However, not all T-cell subpopulations are deteriorated. HIV-infection is characterized by progressive CD4<sup>+</sup> T-cell deficiency due to reduced synthesis and increased cell death, but with marked activation and expansion of the CD8<sup>+</sup> T-cell compartment (3). CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are helper lymphocytes because they excrete cytokines that can activate other immune cells. CD8 lymphocytes are also called cytotoxic because they directly destroy virus-infected cells or tumour cells. CD4 lymphocytes are further divided into two subgroups, TH1 lymphocytes which excrete interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma that can activate macrophages and natural killer (NK) cells, and TH2 lymphocytes which excrete IL-4, IL-5 and IL-10 that induce a humoral immune response (4).

Early treatment reduces the duration of high viremia exposure. New guidelines for treatment commencement recommend beginning treatment in case of symptomatic primary infection or at low CD4<sup>+</sup> count (5).

Combination antiretroviral therapy (cART) is recommended for all HIV infected persons in order to reduce the risk of disease progression and virus resistance to certain drugs. The primary goal of cART is to prevent HIV-related diseases and mortality, and the secondary goal is to reduce the risk of HIV transmission (6, 7). It is important to point out that cART leads to a significant reduction in some immune activation markers, but they are still significantly increased compared to uninfected controls (8). Although cART has dramatically increased the survival of patients with HIV infection, it can lead to several persistent metabolic abnormalities. However, data on the incidence of metabolic

**Zaključak:** Količnik CD4/CD8 se pokazao se kao značajan marker u predikciji metaboličkog sindroma kod HIV/AIDS pacijenata.

**Cljučne reči:** HIV/AIDS, metabolički sindrom, odnos CD4/CD8, cART

syndrome (MetS) in persons infected with HIV vary considerably in various observational studies (9). MetS is a complex condition characterized by physical and metabolic abnormalities, which include central obesity, increased blood pressure, dyslipidemia and hyperglycemia (10).

At the beginning of studying HIV, it was suggested that besides viremia, the parameters of immunity activation such as CD8 lymphocytes, CD4/CD8 ratio or CD4 and CD8 lymphocyte percentage should be followed (11).

The CD4/CD8 ratio was traditionally described as an immunostimulatory marker in the general population but it increasingly appears as a marker of interest in HIV-infected individuals because it has been shown to identify individuals with persistent immune dysfunction that are at higher risk for non-AIDS events (such as MetS) and mortality despite the normalization of CD4 counts during therapy. Early cART has been found to be associated with a faster increase in CD4<sup>+</sup> counts, as well as an increase in CD4/CD8 ratio (8). Lower CD4/CD8 ratio is also associated with increased morbidity and mortality of diseases not primarily related to HIV (12).

This study aims to examine the extent to which the CD4/CD8 ratio can predict the occurrence of metabolic syndrome in HIV-positive non-treated patients receiving cART therapy.

## Materials and Methods

### Patients

80 HIV/AIDS subjects of both genders were included in a retrospective case-control study. Data was obtained from histories of HIV/AIDS patients who were hospitalized at the Clinic for Infectious Diseases of Clinical Center of the University of Sarajevo in the period from 2008–2018. Inclusion criteria for patients were: HIV/AIDS patients, aged > 18 years, both genders, which had not previously been treated with antiretroviral therapy. Criteria for exclusion from the study were: subjects who at the time of therapy commencement had 3 or more criteria for MetS, an active opportunistic disease or severe infectious disease, acute or chronic inflammatory disease, hypothyroidism, Cushing's syndrome, acute or chronic kidney disease, acute or

chronic hepatitis, liver cirrhosis or pregnancy. All HIV/AIDS patients treated in the clinic above during the study period were included in the study if they met inclusion criteria (and did not meet the criteria for exclusion) to avoid selection bias.

Metabolic syndrome diagnosis was established if the patients met at least 3 out of the following 5 criteria: waist circumference over 94 cm in men, or over 80 cm in women; increased blood pressure (systolic  $\geq$  130 mm Hg and/or diastolic  $\geq$  85 mm Hg); elevated triglyceride levels ( $\geq$  1.7 mmol/L), reduced levels of high-density lipoprotein (HDL) ( $<$  1.03 mmol/L in men and  $<$  1.29 mmol/L in women); and elevated fasting glucose levels ( $\geq$  5.6 mmol/L) (13).

The following data was taken from the medical histories of patients: age, sex, habits, HIV transmission mode, anthropometric measurements, values of biochemical parameters (triglycerides, HDL, blood sugar, blood count), immunological parameters (CD4/CD8, PCR), and type of cART therapy. Immunological laboratory parameter measurements of this study were part of the usual treatment of patients with HIV infection.

#### *Immunophenotyping of lymphocytes*

In the test tube with the anticoagulant Ethylene-Diamino-Tetra-Acetate (Vacutainer Tubes with K3EDTA-Becton Dickinson, Plymouth, United Kingdom) for immunophenotyping lymphocyte profiles using the method of flow cytometry, patients full-blood was treated with monoclonal antibodies (FITC, PE, PerCP, APC) (Table I) to determine the expression of certain cellular receptors within 48 hours upon receiving the sample and according to the manufacturer's protocol (BD Bioscience, San Jose, CA, USA and BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) at the Department of Clinical Immunology of Clinical Centre of University of Sarajevo.

In the analyzed sample lymphocytes were defined via the gating method by size and cell granulation (FSC vs SSC). After that, lymphocyte subpopulations were determined by fluorescence on

dual-parameter histograms. In each sample, 10,000 cells were analyzed, and the results were expressed as the percentage (proportion) of the examined cells in each subpopulation of lymphocytes. Cell subpopulations were analyzed in the DIVA program, version 6.1.3 (DB Bioscience, San Jose, CA, USA). The absolute number of individual subpopulations (the number of cells per 1 mL of blood) was determined by the formula:

$$\text{Abs CD4 (CD8)} = \text{WBC} \times \text{Lym}/100 \times (\% \text{ positive cells Cd4 or CD8})/100$$

#### *Ethics*

The research was approved by the Ethics Committee of the University Clinical Center of Sarajevo and implemented according to the basic principles of the Helsinki Declaration (last version of 2008) on the rights of patients involved in biomedical research.

#### *Statistical analysis*

The statistical analysis of data was done using a licensed statistical program for Windows (version 19.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) and Microsoft Excel (version 11 of Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). The collected data was analyzed at the level of descriptive statistics with central tendency measures (arithmetic mean and median) and variance measures (standard deviation and standard error). Considering the normal distribution of continuous variables, which was proved by the Kolmogorov-Smirnov test, we used the Independent Samples T-test to calculate the significance of differences between this data. Univariate binary logistic regression investigated the individual influence of independent variables on the binary dependent variable MetS (yes/no) after six months of cART therapy. Multivariate binary regression analysis investigated the effect of independent predictors (model 1) that demonstrated in the univariate analysis significant influence on the dependent variable MetS (yes/no) after 6 months of cART therapy. All analyses were evaluated at a level of statistical significance of  $p < 0.05$ . After statistical processing of data, results were presented in tables.

## **Results**

The study included 80 HIV/AIDS subjects: 72 (90%) men and 8 (10%) women. The age of subjects at the time they were tested and detected with HIV/AIDS for men was  $34.3 \pm 8.5$  years and  $38.6 \pm 11.1$  years for women. Smokers were less represented (33 or 41.3%) compared to non-smokers (47 or 58.8%). The majority of subjects were not intravenous (IV) drug users (70; 87.5%), while 10

**Table I** Combination of monoclonal antibodies.

	FITC	PE	PerCP	APC
Tube 1	CD3	CD8	CD45	CD4
Tube 2	CD3	CD15+56	CD45	CD19

FITC – Fluorescein isothiocyanate, PE – Phycoerythrin, PerCP - Peridinin Chlorophyll Protein Complex, APC – Allophycocyanin, CD – cluster of differentiation.

(12.5%) subjects were. MSMs (men who have sex with men) dominate with 49 subjects (61.3%), 30 (37.5%) subjects were heterosexual, and one subject (1.2%) was without clear sexual orientation.

After 6 months of ART therapy the values of CD4/CD8 ratio increased significantly to  $0.51 \pm 0.35$  ( $p = 0.0001$ ). Out of all  $n = 80$  subjects 19 (23.8%) developed MetS, and 61 (76.3%) did not. Metabolic syndrome was developed by 11 of 29 subjects or 37.9% on PI + NRT therapy, and 8 out of 51 subjects or 15.6% on NNRT + NRT therapy. Subjects who developed MetS after 6 months of therapy had mean values of waist circumference for men ( $94.8 \pm 3.5$  cm), and women ( $89.0 \pm 28$  cm); triglyceride levels of  $3.6 \pm 1.9$ ; fasting glucose levels of  $5.6 \pm 0.9$ ; systolic pressure levels of  $130.5 \pm 16.4$ ; diastolic levels of  $82.3 \pm 7.5$ ; HDL levels for men ( $0.84 \pm 0.20$ ), and women ( $1.11 \pm 0.02$ ).

Using univariate binary logistic regression, the individual influence of independent variables on the development of MetS (yes/no) after six months of cART therapy was investigated. The most statistically significant individual influence ( $p < 0.05$ ) according to Wald coefficients has been shown by the following variables:

The CD4 percentage before the onset of therapy has the individual strongest influence (Wald = 9.03; OR = 0.87) along with CD4/CD8 ratio (Wald = 6.56, OR = 0.58). This is followed by triglycerides (Wald = 6.4, OR = 1.89), waist circumference (Wald = 4.8; OR = 1.14), cART (Wald = 4.8; OR = 0.30) and body weight (Wald = 4.5, OR = 1.05). Other variables (gender, age, smoking status, height, BMI, systolic and diastolic pressure, CD8%, RNA PCR, HDL, fasting glucose and blood count elements) were not of significant influence (Table II).

**Table II** Univariate binary logistic regression.

Variable	B	S.E.	Wald	df	p	OR	95.0% C.I. for OR	
							Lower	Upper
Gender (M/F)	-0.847	1.103	0.590	1	0.442	0.429	/	/
Age (years)	0.035	0.029	1.44	1	0.229	1.035	/	/
Smoking status(yes/no)	0.328	0.529	0.383	1	0.536	1.387	/	/
Height (cm)	5.956	3.813	2.440	1	0.118	386.144	/	/
Weight (kg)	0.050	0.023	<b>4.51</b>	1	0.034	1.051	1.009	1.100
BMI	0.101	0.083	1.479	1	0.224	1.106	/	/
Waist circumference (cm)	0.133	0.060	<b>4.84</b>	1	0.028	1.142	1.015	1.285
Systolic pressure (mmHg)	0.052	0.038	1.901	1	0.168	1.054	/	/
Diastolic pressure (mmHg)	-0.033	0.055	0.359	1	0.549	0.968	/	/
CD4 (%)	-0.130	0.043	<b>9.03</b>	1	0.003	0.878	0.807	0.956
CD8 (%)	-0.017	0.022	0.604	1	0.437	0.983	/	/
CD4/CD8 Ratio	-0.531	0.207	<b>6.56</b>	1	0.010	0.588	0.392	0.883
PCR RNA (log)cells/ml	0.015	0.290	0.003	1	0.959	1.015	/	/
Triglycerides (mmol/L)	0.638	0.252	<b>6.40</b>	1	0.011	1.894	1.155	3.105
HDL (mmol/L)	-0.085	0.361	0.056	1	0.813	0.918	/	/
Erythrocytes $\times 10^{12}/L$	-0.214	0.307	0.486	1	0.486	0.808	/	/
Blood glucose (mmol/L)	0.461	0.427	1.166	1	0.280	1.585	/	/
Leukocytes $\times 10^9/L$	0.211	0.133	2.525	1	0.112	1.235	/	/
Lymphocytes %	0.756	2.031	0.139	1	0.710	2.131	/	/
Thrombocytes $\times 10^9/L$	0.002	0.004	0.424	1	0.515	1.002	/	/
cART(NNRTIs + NRTI compared to PI + NRTI)	-1.189	0.543	<b>4.79</b>	<b>1</b>	<b>0.028</b>	0.304	0.105	0.882

CD – cluster of differentiation, BMI – body mass index, HDL – high-density lipoprotein, cART – combined antiretroviral therapy, NNRTIs – Non-nucleoside reverse transcription inhibitors, NRTI – nucleoside reverse transcription inhibitors, PI – Protease inhibitors.

**Table III** Multivariate binary logistic regression.

Variable		B	Wald	df	p.	OR
Model 1	Body weight (kg)	0.020	0.164	1	0.686	1.020
	Waist circumference (cm)	0.236	<b>2.830</b>	1	0.093	1.266
	Triglycerides (mmol/L)	0.767	<b>5.270</b>	1	0.022	2.152
	CD4/CD8 ratio	-0.803	<b>9.012</b>	1	0.003	0.448
	cART(NNRTIs+NRTI compared to PI+NRTI)	-2.249	<b>7.866</b>	1	0.005	0.106
	Constant	-27.197	6.240	1	0.012	0.0001

CD – a cluster of differentiation, cART – combined antiretroviral therapy, NNRTIs – Non-nucleoside reverse transcription inhibitors, NRTI – nucleoside reverse transcription inhibitors, PI – Protease inhibitors.

Multivariate analysis of parameters (which proved to be significant in univariate regression analysis) yielded Model 1 where the values of Cox & Snell  $R^2 = 0.338$  and Nagelkerke  $R^2 = 0.507$  show that the set of variables explain 33.8% to 50.7% of the variance. Further results of the Hosmer and Lemeshow test support the claim that the model is good,  $\chi^2 = 19.910$   $p = 0.084$ .

Surrogate marker CD4/CD8 ratio showed the most statistically significant ( $p < 0.05$ ) and greatest influence on MetS development (Wald = 9.01, OR = 0.45), followed by cART (Wald = 7.87, OR = 0.10), and triglycerides (Wald = 5.27; OR = 1.7). In this analysis, body weight and waist circumference did not show a statistically significant effect on MetS development after six months of cART,  $p > 0.05$  (Table III).

## Discussion

In our study, we have shown that the choice of cART drugs (NNRTIs + NRTI vs PI + NRTIs) and CD4/CD8 ratio have a protective effect on the occurrence of MetS in patients with HIV/AIDS, while larger waist circumference and triglyceride levels at the beginning of therapy increase the risk of MetS development.

ART therapy has been available in Bosnia and Herzegovina (B&H) since 2003. The choice of cART depends on the CD4 count, viremia, HIV resistance, adherence prognosis, comorbidities, adverse drug effects, interaction with other drugs, as well as the cost of the drug itself. Due to the realistically low number of HIV infected, some ART drugs could not be registered in B&H (due to high price of drug registration and low consumption); therefore we had a smaller amount of drugs on disposition compared to the EU, the price of some drugs was very expensive for a country such as B&H, and we were forced to choose more affordable and available medicines.

The real prevalence of MetS among HIV-positive patients is still controversial due to a large number of observational studies with a wide range of prevalence estimates (from 7 to 52%). It is difficult to determine whether the prevalence of MetS in HIV-infected patients is different or comparable with the prevalence in the general population (14).

Due to the effectiveness of modern HIV/AIDS therapy, lifespan with this disease is prolonged. Physicians are now facing new challenges in treating comorbidities, such as MetS. Even so, the prevalence of MetS in patients with HIV is not the same as in the general population (15).

In one study (9) the prevalence of MetS in the study population was 16% for the International Diabetes Federation (IDF) definition. Prevalence of MetS was significantly higher among patients receiving cART therapy than among HIV therapy-naive patients (18.2% vs 5.1%,  $p = 0.005$ ) (9).

Another study (16) shows that the MetS prevalence in subjects on ART was higher (18.4%) compared to subjects who were not on ART (11.8%). In comparison, our study showed that 19 out of 80 subjects or 23.8% developed MetS after six months of cART.

Earlier research has already demonstrated the relationship between combination ART therapy and dyslipidemia, insulin resistance and cardiovascular disease (CVD), as well as poor adherence of HIV+ subjects on PI inhibitors (17).

A study by Perazzo (18) clearly showed that low CD4 counts ( $< 200$  cells/ml) with OR = 50.7 present a risk for MetS development (18), whereas our study also showed the risk of MetS development with low CD4% (OR = 0.87,  $p = 0.003$ ).

In one study (19) on HIV-infected individuals treated within 6 months of HIV detection compared to two years after seroconversion, the CD4/CD8 ratio



remained low and did not normalize in the group being treated immediately upon detection of HIV infection (19). Contrary to their results, Hoenigli et al. (20) found that CD4/CD8 ratio was lower in individuals with symptomatic acute HIV infection and that it correlated with the duration of acute HIV infection symptoms. Early ART (initiated within 40 days from the estimated date of infection) has shown to be associated with a significant increase in CD4/CD8 ratio (20).

Their data suggests that the CD4/CD8 ratio decreases rapidly during acute HIV infection, but can be significantly increased when ART is commenced, as we have demonstrated in our study where 6 months after ART therapy the CD4/CD8 ratio increased from  $0.29 \pm 0.21$  to  $0.51 \pm 0.35$  ( $p = 0.0001$ ). Similar results were obtained by Han WM et al. (21) on a sample of 800 subjects, where the total reference CD4/CD8 ratio before ART was 0.22 (IQR, 0.12–0.32) and after achieving virological suppression this ratio was 0.42 (IRQ: 0.27–0.56) (21).

The same study showed that HIV-infected subjects with a CD4/CD8 ratio of  $< 0.3$ , or in the range between 0.3 and 0.45, had a significantly higher risk of non-AIDS disease development compared to HIV subjects with a ratio greater than 0.45. Ultimately, our study also showed that the CD4/CD8 ratio was a significant univariate and multivariate predictor (together with triglycerides and cART) of non-AIDS disease and MetS ( $p < 0.05$ ).

Study SHSC (2016) showed that the CD4/CD8 ratio was an important time-dependent prognostic

factor, for the treatment of HIV naive patients and patients treated with cART. Data from this study confirmed the association between HIV/AIDS disease progression and the time needed for normalization of the CD4/CD8 ratio (22).

The limitations of our study were a relatively small sample and retrospective analysis, which is why data on physical activity, nutrition and other possible predisposing factors during the first 6 months of therapy are missing.

## Conclusions

Clinicians should keep in mind the percentage of CD4 and low levels of CD4/CD8 ratio, along with other parameters of metabolic syndrome development (central obesity, high blood pressure, dyslipidemia, and blood sugar), when selecting cART drug regimens to reduce the prevalence of non-AIDS diseases or MetS. The results of this study should be considered as preliminary, while verification of these results requires new prospective epidemiological studies with greater statistical strength and follow-up of a wider range of factors that may have an impact on metabolic syndrome.

## Conflict of interest statement

The authors stated that they have no conflicts of interest regarding the publication of this article.

## References

- HIV monitoring (2018). [Internet] Available at: <https://www.hiv-monitoring.nl/english/patients-and-public/about-hiv/> [accessed on October 12, 2018]
- Abbass AK, Lichtman AH. Congenital and acquired immunodeficiency. In: Basic Immunology. Data Status, 2008: 209–23.
- Masiá M, Padilla S, Barber X, Sanchis M, Terol G, Lidón F, Gutiérrez F. Comparative Impact of Suppressive Antiretroviral Regimens on the CD4/CD8 T-Cell Ratio: A Cohort Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016 and 95(11): e3108.
- Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B (2012) CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012: 925135.
- Seng R, Goujard C, Krastinova E, Mialhes P, Orr S, Molina JM, Saada M, Piroth L, Rouzioux C, Meyer L. Influence of lifelong cumulative HIV viremia on long-term recovery of CD4<sup>+</sup> cell count and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio among patients on combination antiretroviral therapy. *Aids* 2015 Mar 13; 29(5): 595–607.
- Divakar DD, Al Kheraif AA, Ramakrishnaiah R, Khan AA, Sandeepa NC2, Alshahrani OA, Ali Alahmari A. Oral manifestations in human immunodeficiency virus infected pediatric patients receiving and not receiving antiretroviral therapy: a cross sectional study. *Paediatr Croat* 2015; 59: 152–8.
- Forsyth AD, Valdiserri RO. Reaping the prevention benefits of highly active antiretroviral treatment: policy implications of HIV Prevention Trials Network 052. *Curr Opin HIV AIDS*. 2012 and 7(2): 111–6.
- Rajasuriar R, Wright E, Lewin SR. Impact of antiretroviral therapy (ART) timing on chronic immune activation/inflammation and end-organ damage. *Curr Opin HIV AIDS*. 2015 and 10(1): 35–42.
- Calza L, Colangeli V, Magistrelli E, Rossi N, Rosselli Del Turco E, Bussini L, Borderi M, Viale P. Prevalence of metabolic syndrome in HIV-infected patients naive to antiretroviral therapy or receiving a first-line treatment. *HIV clinical trials*. 2017 May 4; 18(3): 110–7.
- Grundy SM. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005 and 112: 2735–52.

11. Cohen Stuart JWT, Hazebergh MD, Hamann D, et al. The dominant source of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell activation in HIV infection is antigenic stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000 and 25: 203–11.
12. Mussini C, Lorenzini P, Cozzi-Lepri A, et al. CD4/CD8 ratio normalisation and non-AIDS-related events in individuals with HIV who achieve viral load suppression with antiretroviral therapy: an observational cohort study. *Lancet HIV* 2015 and 2: e98–e106.
13. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith Jr SC. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation* 2009 Oct 20; 120(16): 1640–5.
14. Mondy K, Overton ET, Grubb J, et al. Metabolic syndrome in HIV-infected patients from an urban, Mid-western US outpatient population. *Clin Infect Dis* 2007 and 44: 726–34.
15. Swami A. Metabolic Syndrome and HIV Infection. *J HIV Retrovirus*, 2016, 2: 1.
16. Nguyen KA, Peer N, Mills EJ, Kengne AP. A meta-analysis of the metabolic syndrome prevalence in the global HIV-infected population. *PLoS one*. 2016 Mar 23 and 11(3): e0150970.
17. Anuurad E, Bremer A, Berglund L. HIV protease inhibitors and obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010 and 17(5): 478–85.
18. Perazzo H, Cardoso SW, Yanavich C, Munteanu M, Morata M, Simplicio P, Cardoso C, Almeida C, Poynard T, Veloso VG, Grinsztejn B. Presence of metabolic syndrome and low CD4 count are independently associated with liver fibrosis in human immunodeficiency virus-infected patients with non-alcoholic fatty liver. *Journal of Hepatology* 2017 Jan 1; 66(1): S158–9.
19. Serrano-Villar S, Sainz T, Lee SA, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, Ferre AL, Hayes TL, Somsouk M, Hsue PY, Van Natta ML. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8<sup>+</sup> T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS pathogens* 2014 May 15; 10(5): e1004078.
20. Hoenigl M, Chaillon A, Little SJ. CD4/CD8 Cell Ratio in Acute HIV Infection and the Impact of Early Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* 2016 and 63(3): 425–6.
21. Han WM, Apornpong T, Kerr SJ, Hiransuthikul A, Gatechompol S, Do T, Ruxrungtham K, Avihingsanon A. CD4/CD8 ratio normalization rates and low ratio as prognostic marker for non-AIDS defining events among long-term virologically suppressed people living with HIV. *AIDS research and therapy*. 2018 Dec; 15(1): 13.
22. Sauter R, Huang R, Ledergerber B, Battegay M, Bernasconi E, Cavassini M, Furrer H, Hoffmann M, Rougemont M, Günthard HF, Held L. CD4/CD8 ratio and CD8 counts predict CD4 response in HIV-1-infected drug naive and in patients on cART. *Medicine* 2016 Oct; 95 (42).

*Received: October 30, 2018*

*Accepted: December 17, 2018*

# Granulysin as a novel factor for the prognosis of the clinical course of chickenpox

R. Baljic<sup>1</sup>, R. Gojak<sup>1</sup>, H. Konjo<sup>2</sup> and M. Hukic<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Clinic for Infectious Diseases, Clinical Center University of Sarajevo, Bosnia-Herzegovina; <sup>2</sup>Clinic for Orthopaedic, Clinical Center University of Sarajevo, Bosnia-Herzegovina and <sup>3</sup>Burch University Sarajevo, Bosnia-Herzegovina

## Original Paper

Importance of the study: There is no similar published study regarding correlation of serum granulysin level and clinical course and outcome of chickenpox. In most countries, vaccination for chickenpox is not available, so lot of immunocompetent adults who acquire chickenpox are in a great risk to develop severe and life-threatening clinical forms of illness. With granulysin, as early prognostic marker of the disease, physicians can predict what clinical form of chickenpox can be expected.

**Cite this article:** Baljic R, Gojak R, Konjo H, Hukic M (2018). Granulysin as a novel factor for the prognosis of the clinical course of chickenpox. *Epidemiology and Infection* 1–4. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000717>

Received: 31 August 2017  
Revised: 7 February 2018  
Accepted: 5 March 2018

### Key words:

Chickenpox; clinical course; granulysin

### Author for correspondence:

Rusmir Baljic, E-mail: [rusmir.baljic@gmail.com](mailto:rusmir.baljic@gmail.com)

## Abstract

Granulysin is a recently discovered cytolytic protein of natural killer (NK) cells and cytotoxic T lymphocytes. Studies of healthy and immunocompromised patients with primary or recurrent varicella-zoster infections demonstrate the importance of virus-specific cellular immunity in controlling viral replication, but also some studies presented granulysin as a molecule that can play a role in chickenpox immunopathogenesis. This study investigated possible correlation between serum granulysin levels and clinical course of chickenpox. A total of 69 patients with chickenpox were included in the study. We measured the levels of granulysin and percentage count for CD4+, CD8+ and NK cells in serum for all patients and healthy controls. For detection and quantification of granulysin in sera, we performed ELISA test and flow cytometry for detection, identification and percentage measurement of T and B lymphocytes. Descriptive methods, analysis of variance and multivariate logistic regression were used for statistical data analysis. We found respective correlation between serum granulysin level and severity of clinical presentation. These findings can be a good input for further studies, since there is no relevant prognostic parameter of chickenpox in everyday clinical practice. Granulysin, as a therapeutic, also deserves to be a point of interests in the future. If we prove its potential to stop dissemination of human herpes viruses, possibilities to use it in some life-threatening forms of viral disease can be very valuable.

## Introduction

Granulysin is a recently discovered cytolytic protein of natural killer (NK) cells and cytotoxic T lymphocytes (CTL) [1]. Normal values of granulysin in the serum of healthy persons are  $3.7 \pm 3.2$  ng/ml. There are also some studies which suggest the role of CD4 + T lymphocytes as secretory molecules of granulysin. Two molecular forms of granulysin, the 15 kDa precursor and 9 kDa mature form, are produced in these cells. The 15 kDa form is constitutively secreted, and its function remains poorly understood. The 9 kDa form is released by receptor-mediated granule exocytosis [2]. Nine kDa granulysin is broadly cytolytic against tumours and microbes, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and parasites. Similar to other cytolytic granule proteins, granulysin is released upon stimulation into the intercellular space between effector and target cells via a granule exocytosis pathway. Exposure to granulysin accelerated death of infected cells as assessed by apoptosis markers [3]. Recent experiments indicate an important role of granulysin in immunity to *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*, so as *Plasmodium falciparum* and *Cryptococcus neoformans* [4].

Chickenpox is a highly contagious viral infection which mainly affects children. Primary varicella-zoster (VZV) infection elicits immunoglobulin G, immunoglobulin M and immunoglobulin A antibodies, which bind to many classes of viral proteins [5].

Studies of healthy and immunocompromised patients with primary or recurrent VZV infections demonstrate the importance of virus-specific cellular immunity for controlling viral replication [6]. CD4 (helper) and CD8 (cytotoxic) T lymphocytes play a critical role in the protection against VZV primary infection and reactivation.

## Methods

### Subjects

This was a prospective study, approved by the Ethics Committee of the Clinical Center University of Sarajevo, with approval nr. 0207–1205. Sixty-nine patients who have been treated in the Clinical Center University of Sarajevo, Bosnia Herzegovina, in the period June 2014–January 2016 with confirmed chickenpox infection were enrolled in the study. Another 12 did not meet inclusion criteria and were rolled-out from the study. All of them were admitted in the outpatient ambulance for a first clinical examination. We took data for sex, age, possible contact with chickenpox, and according to the presented symptoms and signs of disease, patients were divided in two groups: 34 with mild and 35 with moderate, severe or life-

threatening clinical presentation. Patients with mild clinical presentation had all characteristic symptoms and signs of disease but no complications, and required only symptomatic therapy, while acyclovir was prescribed to elderly patients. Patients with moderate or severe clinical presentation had at least one complication, required hospitalisation and a combination of antiviral, antibiotic and symptomatic therapy. Patients with life-threatening clinical presentation had multiple complications, which required multidisciplinary treatment with specialists for other clinical diseases. Thirty healthy volunteers served as a control group. They were employees of the Clinical Center University of Sarajevo, who met inclusive criteria: age, sex, health status. We took peripheral blood samples to detect the levels of granulysin and CD4, CD8 and NK cells from all patients and healthy controls and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Blood samples are taken in first 3 days after beginning of the rash: in 17 patients first day, 25 second day and 27 third day. The testing was performed next week after all blood specimens have been collected (January 2016). Informed consent was obtained from all subjects.

### ELISA for granulysin

For detection and quantification of granulysin in the sera, ELISA test was performed. We used LEGEND MAX™ Human Granulysin ELISA Kit from BioLegend, San Diego, CA, USA. In brief, in 96-well flat-bottomed plates, we added reconstituted dilution of human granulysin, with the highest concentration of 40 ng/ml in the first tube and 20, 10, 5, 2.5, 1.25 and 0.63 ng/ml, respectively. The plate was washed four times with wash buffer. A 50  $\mu\text{l}$  of buffer was added to each well. The plate was sealed and incubated at room temperature for 2 h while shaking at 200 rpm. The content of the plate was discarded into the sink, then washed four times with wash buffer. One hundred microlitres of human granulysin detection antibody solution was added to each well, the plate was sealed and incubated at room temperature for 1 h while shaking. Then, the contents of the plate were discarded into the sink, then again washed four times with the buffer. Avidin-HRP D solution in a quantity of 100  $\mu\text{l}$  was added to each well, plate was sealed and incubated at room temperature for 30 min while shaking. Again, we discarded the contents of the plate into the sink, washed the plate five times with wash buffer and soaked the wells in wash buffer for 30 s to 1 min for each wash. Finally, we added 100  $\mu\text{l}$  of substrate solution F to each well and incubated for 20 min in the dark. The reaction was stopped by adding 100  $\mu\text{l}$  of stop solution to each well. The absorbance was measured at 450 nm within 30 min.

### Flow cytometry detection of CD4, CD8 and NK cells

Whole blood is aseptically collected by venepuncture to a sterile EDTA vacutainers tube in amount of 5 ml. White blood cell counts and differential cell count are obtained from the same specimen. Anticoagulated blood was stored at room temperature and analysed same day. The tubes were vortexed at low speed to reduce aggregation before running them on the flow cytometer. We used BD Multitest™ six-colour direct immunofluorescence TBNK reagent in a BD FACSCanto™ and BD FACSCanto™ II flow cytometer for detection and identification, or the percentage of the absolute number of T and B lymphocytes, NK cells and CD4/CD8 subpopulations.

### Statistical analysis

Results are expressed as minimal, maximal and median value with standard deviation (s.d.). Frequency distribution between the groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA). Frequency distribution between the two groups were compared using the  $\chi^2$  test. Correlations between serum granulysin levels and other variables were analysed with Spearman's rank correlation test. All *P*-values were two-tailed, and the level of significance was set at  $P < 0.05$ . Multivariate logistic regression analysis with a stepwise backward selection included variables showing  $P < 0.05$  in univariate analyses. All statistical analyses were performed using SPSS for windows version 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

### Results

The median age in the group with mild presentation was 24.57 (range 3–54 years, s.d. = 14.14), while in the other group, it was 28.47 (range 5–49 years, s.d. = 10.39). The  $\chi^2$  test found no statistical difference between the groups for age of the patients. In a group with mild presentation, women were dominant (64.7%), while in another group, men were dominant (71%). Except for respiratory symptoms and fever, there was no significant difference in clinical signs and symptoms between the two groups.

In a group of mild presentation, we found no complications of chickenpox. In another group of patients, complications were present in all patients. A number of complications vary, from one to three. Most of the complications were bacterial superinfections of skin and pneumonia, while other complications were presented in smaller number. We had 23 (28%) patients with one, 10 (17%) with two and two (4%) with three complications. Antiviral therapy (acyclovir) was given to 13 patients in a group with mild presentation, while all patients in another group received acyclovir. In a group with mild, severe or life-threatening chickenpox, 28 patients required antibiotic for treatment of secondary infections.

Mean percentage of CD4T-lymphocyte count was 28.20, with a range from 0.00 to 49.60 and an s.d. of 12.70. In the group of outpatients, mean value was 44.06, with a range from 20.30 to 80.00 and an s.d. of 11.48. In the control group, median was 44.26, with a range from 28.00 to 57.60 and an s.d. of 6.69. Using ANOVA test, we found significant differences between the groups of hospitalised patients and outpatients ( $P < 0.0001$ ) as well as hospitalised patients and control group ( $P < 0.0001$ ).

In a group of hospitalised patients, mean percentage of CD8T cells was 38.34, with a range from 16.50 to 84.20 and an s.d. of 15.52. In the group of outpatients, mean value was 30.15, with a range from 9.90 to 56.00 and an s.d. of 9.46. In the control group, mean value was 28.40, with a range from 14.00 to 42.10 and an s.d. of 7.34. We compared these values using ANOVA test and found significant difference between the groups of hospitalised patients and outpatients ( $P = 0.011$ ) as well as hospitalised patients and control group ( $P = 0.02$ ).

In a group of hospitalised patients, mean percentage of CD16/56 cells (NK cells) was 15.27, with a range from 2.40 to 40.00 and an s.d. of 7.90. In the group of outpatients, mean value was 15.78, with a range from 1.40 to 33.10 and an s.d. of 7.24. In the control group, mean value was 15.92, with a range from 4.00 to 39.20 and an s.d. of 7.10. The ANOVA test shown no significant difference between the groups.

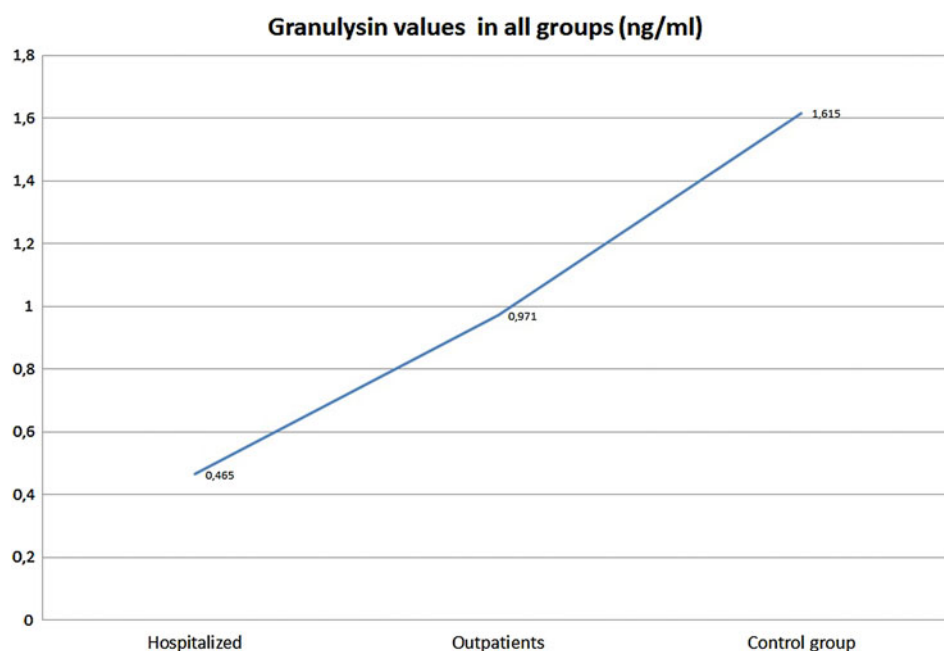


Fig. 1. Levels of granulysin by patients group.

Serum granulysin level in a group with mild presentation was in a range from 0.00 to 5.60 ng/ml with a median value of 0.95 ng/ml and s.d. = 1.12 (Fig. 1).

In a group of patients with moderate, severe and life-threatening presentation, median value of granulysin was 0.95 (range 0.00–1.67 ng/ml; s.d. = 0.52). The median value for a control group was 1.69 ng/ml (range 0.40–6.70 ng/ml, s.d. = 1.56).

Pearson's  $\chi^2$  test found no statistical difference in the levels of serum granulysin for sex between the groups, but difference was found for age ( $P = 0002$ ).

We used multivariate logistic regression analysis to test the impact of serum granulysin to a clinical presentation of chickenpox. Patients with lower levels of granulysin had more severe clinical presentations ( $R^2 = 0.21$ ;  $P = 0.04$ ). The Pearson's correlation analysis found a negative correlation between number of complications and level of serum granulysin ( $R^2 = 0.29$ ;  $P = 0016$ ).

## Discussion

Granulysin has been detected in cytolytic granules of CTL and NK cells aside with pore-forming proteins: perforin and granzymes [7]. The importance of serum granulysin level in the immunopathogenesis of chickenpox was described in an experimental study led by Hata *et al.* [8]. In this study, granulysin was extracted from *Escherichia coli*, and added to a fibroblast culture infected with VZV. Granulysin enters infected cells, causing ionic misbalance, which leads to apoptosis and further stops viral replication. Higher concentration of granulysin dramatically increases the rate of infected cell death. We found significant differences in serum granulysin levels between patients with mild clinical form of disease and others who had moderate, severe or life-threatening forms. A strong negative correlation between the levels of granulysin in serum and presented complication was also confirmed. Serum granulysin can be considered as a potent prognostic biomarker of gastric carcinoma. Saigusa *et al.* [9] found a direct correlation between serum granulysin levels and clinical course and outcome of the disease. Low granulysin level led to a severe clinical form of disease and poor

outcome, and also, they noticed an increased number of liver and peritoneal metastasis in the same patients.

The role of granulysin as a possible biomarker in NK cells neoplasms connected with the Epstein–Barr virus was conducted by Nagasawa *et al.* [10]. Granulysin was found as a strong prognostic marker of malignant proliferation of NK cells. In a recent study by Pitabut *et al.* [11], the importance of granulysin levels has been found in patients with tuberculosis (TBC), so as in patients with TBC/HIV coinfection. Lower levels of granulysin have been found in patients with TBC, while very high levels were found in patients with TBC/HIV coinfection. This was the first study ever performed that investigated possible correlation of granulysin and TBC/HIV coinfection. In an experimental study, granulysin, together with granzyme and perforin, can cause death of intracellular parasites, like *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* [12]. These findings can be a good input for further studies, since there is no relevant prognostic parameter of chickenpox in everyday clinical practice. We still do not know if NK cells and CD8 + lymphocytes are only cells that release granulysin, and the role of CD4 + lymphocytes in situations of acute VZV infections. These findings can also be helpful in other viral infections, especially in herpes viruses. Granulysin, as a therapeutic, also deserves to be a point of interests in the future. If we prove its potential to stop dissemination of human herpes viruses, possibilities to use it in some life-threatening forms of viral disease can be very valuable. Not only for VZV, as we can suppose on the basis of this study, but more importantly in cytomegalovirus infections in transplant patients or fulminant forms of herpes encephalitis.

**Supplementary Material.** The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0950268818000717>

**Acknowledgements.** The authors would like to thank personnel of the Clinic for Infectious Diseases and the Department for Clinical Immunology, Clinical Center University of Sarajevo, for a great support in this work.

**Declaration of interest.** None.

## References

1. **Krensky AM and Clayberger C** (2005) Granulysin: a novel host defense molecule. *American Journal of Transplantation* **5**, 1789–1792.
2. **Hanson DA, et al.** (1999) Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Molecular Immunology* **36**, 413–422.
3. **Okada S, et al.** (1998) Intracellular mediators of granulysin-induced cell death. *The Science* **282**, 121–125.
4. **Stenger S, et al.** (2003) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Journal of Immunology* **171**, 2556–2562.
5. **Arvin AM** (1996) Varicella-zoster virus. *Clinical Microbiology Reviews* **9**, 361–381.
6. **Arvin AM** (2008) Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus: an overview. *The Journal of Infectious Diseases* **197**, 58–60.
7. **Chávez-Galán L, et al.** (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & Molecular Immunology* **6**, 15–25.
8. **Hata A, et al.** (2001) Granulysin blocks replication of varicella-zoster virus and triggers apoptosis of infected cells. *Viral Immunology* **14**, 125–133.
9. **Saigusa S, et al.** (2007) Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **22**, 1322–1327.
10. **Nagasawa M, et al.** (2010) Serum granulysin as a possible biomarker of natural killer cell neoplasms. *British Journal of Haematology* **148**, 812–814.
11. **Pitabut N, et al.** (2013) Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB coinfection. *International Journal of Medical Sciences* **10**, 1003–1014.
12. **Dotiwala F, et al.** (2016) Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nature Medicine* **22**, 210–216.

# The frequency of pulmonary hypertension in patients with juvenile scleroderma

Amra Adrovic<sup>1</sup>, Funda Oztunc<sup>2</sup>, Kenan Barut<sup>1</sup>, Aida Koka<sup>2</sup>, Refet Gojak<sup>3</sup>, Sezgin Sahin<sup>1</sup>, Tuncalp Demir<sup>4</sup>, Ozgur Kasapcopur<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Rheumatology and <sup>2</sup>Department of Pediatric Cardiology, Istanbul University, Cerrahpasa Medical School, Istanbul, Turkey, <sup>3</sup>Clinic for Infectious Diseases, Clinical Centre, University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, <sup>4</sup>Department of Chest Diseases, Istanbul University, Cerrahpasa Medical School, Istanbul, Turkey

## ABSTRACT

Juvenile scleroderma (JS) represents a rarely seen group of connective tissue diseases with multiple organ involvement. Cardiac involvement in JSS is well known and, although rare in children, it may be an important cause of mortality and morbidity. Therefore, an early determination of cardio-vascular and pulmonary involvement is of the most relevance to reduce the mortality in patients with juvenile scleroderma. The aim of the study was to explore the non-invasive methods (Doppler echocardiography, pulmonary function tests), Forced vital capacity (FVC) and Carbon monoxide diffusion capacity (DLCO) in the assessment of the cardiopulmonary involvement in patients with JS. The assessment of pulmonary arterial pressure (PAP) and risk factors for pulmonary arterial hypertension (PAH) were made by the measurement of maximum tricuspid insufficiency (TI), end-diastolic pulmonary insufficiency (PI), ratio of acceleration time (AT) to ejection time (ET) (AT/ET), right atrial pressure (RAP) and contraction of vena cava inferior during inspiration. Thirty-five patients with confirmed JS were included in the study. The mean age of onset of the disease was 9.57 years (median 10 years, range 2-18 years). The mean disease duration and follow-up time was 2 years (median 1 year, range 0.5-8 years) and 3.57 years (median 2 years, range 0.5-14.5 years), respectively. The values of all the analyzed parameters including TI, PI, AT/ET, PAP, FVC and DLCO were found to be within normal ranges in all the patients tested, confirming an uncommonness of cardiopulmonary involvement in patients with juvenile scleroderma.

KEY WORDS: Juvenile systemic sclerosis; juvenile localized scleroderma; pulmonary hypertension

DOI: <http://dx.doi.org/10.17305/bjbms.2015.596>

*Bosn J Basic Med Sci. 2015;15(4):30-35. © 2015 ABMSFBiH*

## INTRODUCTION

Juvenile scleroderma (JS) is a rare connective tissue disease affecting multiple organs [1]. The published data on JS are sparse [2]. Its clinical presentation differs from the adult form, typically manifesting as either juvenile localized scleroderma (JLS) or juvenile systemic sclerosis (JSS). Compared with JSS, JLS is an indolent, self-limiting form of the disease, associated with better prognosis that can occasionally progress into a systemic form. JLS is the most frequent form of scleroderma in childhood [3]. It is estimated that 10% of all patients with scleroderma develop the disease before the age of 8 years, with the mean age of onset at 8.8 years [1,3].

Cardiac involvement in JSS is well known and, although rare in children, it may be an important cause of mortality and

morbidity [4]. Pulmonary arterial hypertension (PAH) represents the most pertinent form of pulmonary involvement. The presence of PAH in scleroderma patient has a devastating impact on survival. Prior to the availability of PAH-specific therapies, the 5-year survival rate was only 10% for scleroderma patients with PAH, compared with 80% for scleroderma patients without PAH [5]. The previous reports showed that the connective tissue disease-associated PAH cohort accounts for up to 30% of all cases of PAH, and the vast majority of these cases reflect scleroderma-associated PAH [6]. Among adults patients with scleroderma, the PAH prevalence is estimated to be 10-15%, whereas in children it was reported to be 7% [2]. The studies of PAH among juvenile scleroderma patients are insufficient and there is a need for further investigations.

PAH is defined by a mean pulmonary arterial pressure (MPAP) of 25 mmHg or greater at rest. The mean pulmonary arterial pressure of 30-40 mmHg produces clinical symptoms; when the MPAP reaches the value of 50-70 mmHg, a clinical worsening and a reduced heart output are observed [7]. Since the clinical symptoms are seen in the advanced disease, it is of

\*Corresponding author: Ozgur Kasapcopur, Department of Pediatric Rheumatology, Cerrahpasa Medical School, Istanbul University, 34303, Istanbul, Turkey, Phone: 90-212-414 30 00 E-mail: [ozgurkasapcopur@hotmail.com](mailto:ozgurkasapcopur@hotmail.com)

crucial importance to determine the cardio-vascular involvement in its early stage, when the patients are still asymptomatic. Although the right-sided heart catheterization (RHC) remains the gold standard for diagnosis of PAH, the Doppler echocardiographic examination (Doppler-echo) is used as a reliable screening tool in patients with scleroderma [8]. Pulmonary function tests (PFT) are helpful in the investigation of PAH. The measurement of Functional vital capacity (FVC) and Carbon monoxide diffusion capacity (DLCO) is useful in determination of the interstitial lung disease, which could lead to the PAH development. The ratio of FVC/DLCO >1.6 is shown to be indicative for PAH [9]. The early diagnosis of cardio-vascular involvement influences the clinical course and prognosis of the disease. The aim of our study was to use the non-invasive methods (echocardiography, pulmonary function tests) to examine the cardiopulmonary involvement in the patients with juvenile scleroderma.

## MATERIALS AND METHODS

A total of 35 patients (31 female, 4 male) with diagnosis of juvenile scleroderma, followed up at Pediatric Rheumatology Department, Cerrahpasa Medical School were included in the study. The diagnosis of scleroderma was established according to 2013 updated classification criteria for systemic sclerosis, proposed by The American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) [9].

Doppler echocardiography was performed at Pediatric Cardiology Department.

Pulmonary function tests were performed at Laboratory for pulmonary function tests.

Criteria for inclusion in the study were: a) Diagnosis of juvenile scleroderma; b) Regular clinical follow-up at Pediatric Rheumatology Department, Cerrahpasa Medical Faculty; c) Performed Doppler echocardiography at Pediatric Cardiology Department; and d) Performed pulmonary function tests at the Laboratory for pulmonary function tests.

Patients with an irregular follow-up and those who were treatment non-compliant were excluded from the study (totally 5 patients: 4 with local scleroderma and one patient with systemic sclerosis).

### Doppler echocardiographic examination

The assessment of pulmonary arterial pressure was made by measurement of maximum tricuspid insufficiency (TI), end-diastolic pulmonary insufficiency (PI), the ratio of acceleration time (AT) to ejection time (ET) (AT/ET), right atrial pressure (RAP) and contraction of vena cava inferior during inspiration [10]. Pulmonary arterial pressure was determined using three different methods: 1- Systolic pulmonary arterial

pressure (SPAP) was estimated by measuring the maximal velocity of tricuspid insufficiency (TI)<sup>2</sup>- Diastolic pulmonary arterial pressure (DPAP) was estimated by measuring the velocity of pulmonary insufficiency at the end of diastole (PI)<sup>3</sup>- Mean pulmonary arterial pressure (MPAP) was determined by measuring the pulmonary insufficiency acceleration time (AT) and the ratio of AT to ejection time (ET).

Systolic pulmonary arterial pressure was calculated by modified Bernoulli equation, in which  $SPAP = 4 \times TRV_{max}^2 + \text{right atrial pressure}$ , where TRV<sub>max</sub> was maximal velocity of tricuspid insufficiency. Right atrial pressure was evaluated by measuring the right atrial volume, the degree of tricuspid regurgitation and contraction of vena cava inferior during inspiration [11,12]. The volume of the right atrium was normal for all the patients, collapse of vena cava inferior during inspiration was more than 50% and none of the patients had a significant tricuspid regurgitation. Therefore, the right atrial pressure was supposed to be normal and was accepted to be 5 mmHg for all the patients. The cutoff value for the maximal velocity of tricuspid insufficiency was a 3 m/sec, while for calculated SPAP it was a 40 mmHg. All the values above the cutoff were considered as pathologic [4,5,11]. The diastolic pulmonary arterial pressure (DPAP) was estimated by measuring the velocity of pulmonary insufficiency at the end of diastole, with a cutoff value of 2m/s [12,13]. Mean pulmonary arterial pressure (MPAP) was determined by assessing the pulmonary insufficiency acceleration time (AT) and the ratio of AT to ejection time (ET); AT/ET < 0.3 was accepted as pathologic [11,13,14]. The same cardiologist performed all the measurements, repeating them for three times. The mean value was used in the statistical analysis.

### Pulmonary function tests

Pulmonary function tests were performed in order to estimate the forced vital capacity and CO diffusion capacity. Results were adjusted to the age, gender, weight, height and hemoglobin levels of the patients. The previous studies showed that values of FVC < 80%, DLCO < 60% and FVC/DLCO > 1.6 imply a risk for PAH [4,10,11,12].

### Statistical analysis

Patients were assigned into two groups: patients with JLS and those with JSS. Since the cardio-vascular involvement is not expected in the JLS patients, they were regarded as a control group. Statistical comparison was made between those two groups of patients. In the same time, all measurements were statistically analyzed according to the pathological values being established by the American Association of Pediatric Cardiology [13] and to the data from literature. Categorical variables were assessed by  $\chi^2$  test and Fisher's exact test. For



the evaluation of the echocardiographic findings and pulmonary function tests results, we used a Mann-Whitney test. Reported p value was shown in 3 decimals. If the fourth decimal was found to be  $< 5$ , the  $p$  value is considered to be  $< 0.001$ . The  $p < 0.05$  was considered significant. Statistical analyses were performed using SPSS software version 15.0 (Statistical Package for Social Sciences, IBM Corporation, USA).

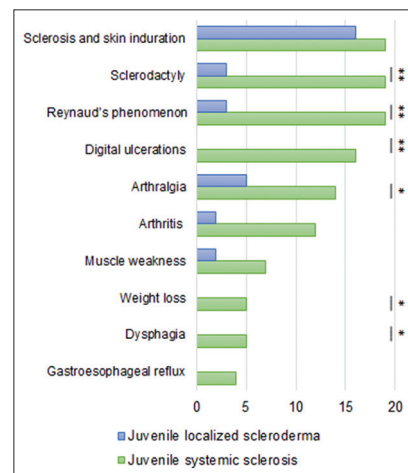
## RESULTS

The study was conducted between January 2013 and January 2014. A total of 35 patients with scleroderma (31 female, 4 male) were included in the study. 46% of the patients were diagnosed with a localized form of scleroderma, while 54% of patients had a systemic sclerosis. One patient was followed up with a diagnosis of mixed connective tissue disease, due to the symptoms of dermatomyositis concomitant with those of systemic sclerosis. This patient was included in systemic sclerosis patients group.

The mean age of onset of the disease was 9.57 years (median 10 years, range 2-18 years). The mean disease duration and follow-up time was 2 years (median 1 year, range 0.5-8 years) and 3.57 years (median 2 years, range 0.5-14.5 years), respectively. The patients' demographic characteristics and their clinical characteristics are summarized in the Table 1. There were no statistically significant differences between the two observed groups of patients in regard to demographic characteristics ( $p > 0.05$ ). In contrary, laboratory investigations showed that there was a significant difference regarding serological tests between patients with JSS and those with JLS (ANA:  $p = 0.001$ , Anti Scl-70:  $p = 0.049$ , respectively). Analysis of the clinical features of the patients showed that there was also a significant difference in terms of the skin and musculoskeletal involvement (Table 1) (Figure 1).

Results of the echocardiographic measurements and laboratory function tests are shown in the Table 2. The mean values of the pulmonary insufficiency at the end of diastole (PI) were  $1.05 \pm 0.24$  m/sec and  $1.00 \pm 0.27$  m/sec for patients with systemic sclerosis and those diagnosed with local scleroderma, respectively. The mean value of PI was statistically different from its upper referent value (2 m/sec) in the both groups of

patients ( $p < 0.001$ ). However, there was no significant difference in PI values between the two groups of patients ( $p = 0.64$ ). The mean values of the maximal velocity of tricuspid insufficiency (TI) were  $2.14 \pm 0.21$  m/sec and  $2.07 \pm 0.45$  m/sec for the patients with systemic sclerosis and those with local scleroderma, respectively. The mean value of TI was significantly different from its upper referent value (3 m/sec) in the both groups ( $p < 0.001$ ), while there was no significant difference for TI between the two groups of patients ( $p = 0.70$ ). Systolic pulmonary arterial pressure was calculated by modified Bernoulli equation using the measurement of maximal velocity of tricuspid regurgitation. As it was mentioned previously, the systolic pulmonary arterial pressure above 40 mmHg was considered pathologic and indicative for diagnosis of PAH. The calculated MPAP was normal in both groups. Additionally, there was no significant difference for the value of MPAP between the two patients groups ( $p = 0.78$ ). The mean values of the ratio of



**FIGURE 1.** Clinical features in patients with JS. Skin, vascular and musculoskeletal involvement were the most common findings. Gastrointestinal symptoms were not present among the patients with localized scleroderma. None of the patients had cardiologic involvement. Statistical significance: \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$

**TABLE 2.** Results of echocardiographic measurements and pulmonary function tests

Measurements	Juvenile systemic sclerosis (N=19)	Juvenile localized scleroderma (N=16)	$p$
Echocardiographic measurements			
PI (m/sec)	1.05	1.0	0.64
TI (m/sec)	2.14	2.08	0.70
AT/ET	0.46	0.44	0.79
MPAP (mmHg)	23.55±3.66	23.02±6.8	0.78
Pulmonary function tests (%)			
FVC	96.9	102.1	0.17
DLCO	84.89	94.47	0.16

MPAP: Mean pulmonary arterial pressure, calculated by modified Bernoulli equation; PI: End diastolic pulmonary insufficiency velocity; TI: Maximal velocity of tricuspid insufficiency; AT/ET: Ratio of pulmonary insufficiency acceleration time (AT) to ejection time (ET); FVC: Forced vital capacity; DLCO: Carbone monoxide diffusion capacity

**TABLE 1.** General demographic characteristics of patients

Demographic characteristics	Juvenile systemic sclerosis (N=19)	Juvenile localized scleroderma (N=16)	$p$
Mean age (years)	14.53±3.302	13.31±2.774	0.253
Mean age at onset (years)	8.84±3.891	7.94±3.605	0.899
Mean age at diagnosis (years)	10.61±3.089	9.06±3.487	0.481
Female gender, N (%)	18 (94.7)	13 (81.3)	0.312
Family history of autoimmune disease, N (%)	4 (21.1)	4 (25.0)	1.00

pulmonary insufficiency AT to ET (AT/ET) were found to be  $0.46 \pm 0.05$  and  $0.44 \pm 0.05$  for the patients with systemic sclerosis and those with local scleroderma, respectively. The both values were significantly different from the lower referent value of the AT/ET ratio ( $p < 0.001$ ). Those echocardiographic measurement results indicate the absence of PAH in both groups of studied patients.

The mean values of FVC were  $96.94 \pm 16.67\%$  and  $102.12 \pm 12.82\%$  for patients with systemic sclerosis and those with local scleroderma, respectively. The results were significantly different from the lower referent value (70%) ( $p < 0.001$ ). The difference in FVC value for patients with local scleroderma and those with systemic sclerosis was not statistically significant ( $p = 0.17$ ).

Mean DLCO was  $84.89 \pm 21.57\%$  and  $94.46 \pm 10.23\%$  for JSS and JLS patients, respectively. Result for both groups of patients was significantly different from its pathologic value ( $p < 0.001$ ). However, DLCO was not statistically different between two groups of patients ( $p = 0.16$ ).

## DISCUSSION

In this study, that represents the largest single-center collection of data on patients with juvenile scleroderma, we examined the cardio-vascular involvement by echocardiographic measurements and pulmonary function tests.

In order to determine systolic pulmonary arterial pressure, we measured a maximal velocity of tricuspid insufficiency in patients with systemic sclerosis and those with the local disease. Results were found to be normal and significantly different from the pathologic values. There was no significant difference in the maximal velocity of tricuspid insufficiency between patients with JSS and those with JLS. Additionally, echocardiographic examination was used to assess the diastolic and mean pulmonary arterial pressure. The values for both measurements were found to be normal in both groups of patients, differing significantly from the pathological value. In the other words, none of the patients had an elevated pulmonary arterial pressure. In addition, the comparison of the two patient groups showed no difference in diastolic and mean pulmonary arterial pressure between patients with systemic sclerosis and those with local scleroderma.

Although detailed and repeated measurements were performed for all the patients, pulmonary atrial pressure was found to be within normal ranges. The previous reports showed that the connective tissue disease-associated PAH cohort accounts for up to 30% of all cases of PAH, and the vast majority of these cases reflect scleroderma-associated PAH [6]. Among adults patients with scleroderma, the PAH prevalence is estimated to be 10-15%, whereas in children it was reported to be 7% [2,15]. The main demographic and

clinical features of the disease found in our study are similar to those reported by Martini G et al. in children with systemic sclerosis. The mentioned study reports a pulmonary hypertension in 7% of a total of 153 SS patients from 55 different rheumatologic centers, in the period of January 2002- June 2003. The mean duration of their patients' follow up was 3.9 years, similarly to our results (3.5 years). Additionally, the mean time between the first signs of the disease and the diagnosis was reported as being 1.9 years; in our study the mean disease duration at diagnosis was found to be 2 years (median 1 year; range 0.5-8 years) [2]. However, studies on pulmonary hypertension in juvenile scleroderma patients are lacking [16-19].

Pulmonary fibrosis, the lung involvement of the disease, contributes the development of the PAH in patients with systemic scleroderma. We examined the presence of pulmonary fibrosis by providing the lung functional tests [20-23]. Pulmonary function test revealed a normal value of FVC and DLCO for all of the studied patients. The measured values were significantly different from those defined as pathological. The comparison of FVC and DLCO between JSS and JLS patients showed no differences between those two groups. Namely, our patients had neither clinical nor the functional signs of pulmonary fibrosis. In the medical literature, pulmonary function test is described as an essential tool for PAH screening in patients with scleroderma. A declining DLCO and elevated FVC% / DLCO% ratio are very useful as predictors of the presence of the PAH or its advanced development [10]. A study performed by Borowiec et al. among patients with juvenile scleroderma showed decreased FVC in 60% of patients with JSS [4].

There are several possible reasons explaining the absence of PAH findings in our patients. The majority of patients were diagnosed shortly after the beginning of the symptoms (mean time to diagnosis was found to be 2 years). The early diagnoses lead to an early treatment possibly influencing the progression of the disease. Martini et al. showed that a short time between disease onset and the diagnosis is a protective factor in patients with juvenile scleroderma [16]. Additionally, all the studied patients were taking the regular treatment with regular annual follow-up. Patients with irregular follow-up and those who had been non-compliant were excluded from the study. Early diagnosis, a regular follow up and a proper therapy are thought to be important in reduction of cardio-vascular complications of the disease. Normal results of the cardio-vascular assessment for all of the studied patients as well as their significant difference from the proposed pathological values imply that the treatment was appropriate and important in prevention of disease complications.

At the time we performed the study, the mean age of patients was  $14.5 \pm 3.3$  years and  $13.3 \pm 2.7$  years for systemic

sclerosis and local scleroderma group, respectively. The mean follow up was 2 years for both groups of patients. The age of the patients also possibly influences the development of the PAH. Although we could not find the exact data about the time of PAH development in patients with juvenile scleroderma in the literature, the risk possibly increases with the progression of the disease. A multicenter study, provided by Martini *et al.* showed a mortality rate of 11.9%, with a cardiac failure as the most important cause of mortality. The death occurred after a mean 4 years from diagnosis, with median 2.8 years and a range from 13 days to 18.1 years. [2]. In our study, duration of disease was considered to be relatively short for the PAH development. The long-standing follow-up of patients would give more information about the progression of the disease and its possible complications. There was no fatal outcome in our study. This finding could be possibly explained by the absence of the major mortality risk factor (cardio-vascular involvement).

The advantages of our study are repeated and detailed echocardiographic examinations and pulmonary tests for all of patients. However, one of the limitations of our study is the small number of patients. Furthermore, our study is a cross-sectional investigation. A further multicenter, prospective studies would give a better insight into the development of PAH at juvenile scleroderma.

In conclusion, PAH is an uncommon finding among patients with juvenile scleroderma. Early diagnosis, regular follow-up and proper therapy are thought to be important factors in reducing the cardio-vascular complications of the disease. In addition, this study points out the importance of annual cardio-vascular screening for patients with juvenile sclerosis.

## CONCLUSIONS

Although quite rare in juvenile scleroderma, cardio-vascular and pulmonary involvement is the most important factor for the prognosis of the disease. Early diagnosis, regular follow-up and appropriate treatment are important factors in reducing the cardiovascular and pulmonary complications of the disease.

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests.

## REFERENCES

- [1] Foeldvari I. Update on juvenile systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2015;17(3):17-18. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11926-014-0491-y>.
- [2] Martini G, Foeldvari I, Russo R, Cuttica R, Eberhard A, Ravelli A, *et al.* Systemic Sclerosis in Childhood. Clinical and Immunologic Features of 153 Patients in an International Database. *Arthritis & Rheumatism* 2006;54(12):3971-3978. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/art.22207>.
- [3] Zulian F, Cuffaro G, Spretto F. Scleroderma in children: an update. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25(5):643-650. Doi: <http://dx.doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283641f61>.
- [4] Borowiec A, Dabrowski R, Wozniak J, Jasek S, Chwyczko T, Kowalik I, *et al.* Cardiovascular assessment of asymptomatic patients with juvenile-onset localized and systemic scleroderma: 10 years prospective observation. *Scand J Rheumatol* 2012;41(1):33-38. Doi: <http://dx.doi.org/10.3109/03009742.2011.609489>.
- [5] Fischer A, Bull TM, Steen VD. Practical Approach to Screening for Scleroderma-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Arthritis Care & Research* 2012;64(3):303-310. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/acr.20693>.
- [6] Coghlan JG, Handler C. Connective tissue associated pulmonary arterial hypertension. *Lupus* 2006;15(3):138-142. Doi: <http://dx.doi.org/10.1191/0961203306lu2280rr>.
- [7] Bossone E, D'Andrea A, D'Alto M, Citro R, Argiento P, Ferrara F, *et al.* Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from diagnosis to prognosis. *J Am Soc Echocardiogr* 2013;26(1):1-14. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2012.10.009>.
- [8] Mukerjee D, St George D, Coleiro B, Knight C, Denton CP, Davar J, *et al.* Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis* 2003;62(11):1088-1093. Doi: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.62.11.1088>.
- [9] Van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, *et al.* 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65(11):2737-2747. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/art.38098>.
- [10] Fischer A, Bull TM, Steen VD. Practical Approach to Screening for Scleroderma-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Arthritis Care Res* 2012;64(3):303-310. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/acr.20693>.
- [11] Mukerjee D, St George D, Knight C, Davar J, Wells AU, Du Bois RM. Echocardiography and pulmonary function as screening tests for pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2004;43(4):461-466. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/keh067>.
- [12] Shah AA, Chung SE, Wigley FM, Wise RA, Hummers LK. Changed in estimated right ventricular systolic pressure predict mortality and pulmonary hypertension in a cohort of scleroderma patients. *Ann Rheum Dis* 2013;72(7):1136-1140. Doi: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201861>.
- [13] Armstrong WF, Ryan T. Feigenbaum's Echocardiography, seventh ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2003.
- [14] Litwin SE. Noninvasive assessment of pulmonary artery pressures. Moving beyond tricuspid regurgitation velocities. *Circ Cardiovasc Imaging* 2010;3(2):132-133. Doi: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.110.945121>.
- [15] Sweiss NJ, Hushaw L, Thenappan T, Sawaqed R, Machado RF, Patel AR, *et al.* Diagnosis and management of pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep* 2010;12(1):8-18. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11926-009-0078-1>.
- [16] Martini G, Vittadello F, Kasapçopur O, Magni MS, Corona F, Duarte-Salazar C, *et al.* Factors affecting survival in juvenile systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(2):119-122. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/ken388>.
- [17] Misra R, Singh G, Aggarwal P, Aggarwal A. Juvenile onset systemic sclerosis: a single center experience of 23 cases from Asia. *Clin Rheumatol* 2007;26(8):1259-1262. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-006-0483-z>.
- [18] Valerio CJ, Schreiber BE, Handler CE, Denton CP, Coghlan JG. Borderline mean pulmonary artery pressure in systemic sclerosis patients: trans-pulmonary gradient predicts risk of developing pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* 2013;65(4):1074-1084. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/art.37838>.

- [19] Quartier P, Bonnet D, Fournet JC, Bodemer C, Acar P, Ouachée-Chardin M, et al. Severe cardiac involvement in children with systemic sclerosis and myositis. *J Rheumatol* 2002;29(8):1767-1773.
- [20] Foeldvari I. New developments in juvenile systemic and localized scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am* 2013;39(4):905-920. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rdc.2013.05.003>.
- [21] Fraise A, Jais X, Schleich JM, di Filippo S, Maragnes P, Beghetti M, et al. Characteristics and prospective 2-year-follow-up of children with pulmonary arterial hypertension in France. *Arch Cardiovasc Dis* 2010;103(2):66-74. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acvd.2009.12.001>.
- [22] Langleben D, Orfanos SE, Givinzano M, Hirsch A, Baron M, Senécal JL, et al. Pulmonary capillary endothelial metabolic dysfunction: Severity in pulmonary arterial hypertension related to connective tissue disease versus idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum* 2008;58(4):1156-1164. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/art.23405>.
- [23] Le Pavec J, Humbert M, Mouthon L, Hasooun PM. Systemic sclerosis associated pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(12):1285-1293. Doi: <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200909-1331PP>.

# A neurophysiological study of large- and small-diameter nerve fibers in the hands of hemodialysis patients

Miro Denislic<sup>1</sup> · Merita Tiric-Campara<sup>2</sup> · Halima Resić<sup>3</sup> · Jasem Y. Al-Hashel<sup>4</sup> · Rok Zorec<sup>5</sup> · Refet Gojak<sup>6</sup> · Jan Ravnik<sup>7</sup>

Received: 18 June 2015 / Accepted: 18 September 2015  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

## Abstract

**Purpose** Polyneuropathy in patients with advanced clinical kidney disease is a very disabling condition. The aim of this study was to evaluate neurophysiological abnormalities of large- and small-diameter nerve fibers in the hands of hemodialysis patients.

**Methods** A total of 38 hemodialysis patients and 38 healthy control subjects underwent a conventional electrophysiological examination. The function of small nerve fibers was assessed using cutaneous silent period (CSP) measurement.

**Results** Slower median nerve motor conduction velocities were recorded in patients with fistula ( $p < 0.0001$ ) and without fistula ( $p < 0.001$ ). Sensory median and ulnar nerve conduction velocities were slower in both patient groups compared with the control group ( $p = 0.001$ ). Median sensory nerve action potential amplitudes were lower in patients with fistulas ( $p = 0.009$ ) and without fistulas ( $p = 0.005$ ) compared

with the control group. Significantly prolonged F-wave latencies of the median ( $p = 0.002$ ) and ulnar nerves ( $p = 0.023$ ) in patients with fistulas hands were observed. In 12/38 (32 %) patients, the onset latencies of CSPs were significantly delayed ( $p = 0.001$ ). There was an inverse correlation of  $\beta 2$ -microglobulin and decreased conduction velocities of the median nerves, while Kt/V was associated with improved sensory nerve conduction velocity of the median nerve. An inverse correlation between motor velocity of both nerves and hemodialysis duration was observed in the patient groups.

**Conclusions** The measurement of CSPs provides a useful method for assessing small nerve fibers. The role of A-delta fibers is often overlooked.

**Keywords** Small nerve fibers · Cutaneous silent period · Hemodialysis · Uremic polyneuropathy · AV- arteriovenous fistula · Carpal tunnel syndrome

✉ Miro Denislic  
miro.denislic@gmail.com

Merita Tiric-Campara  
merita.tiric@gmail.com

Halima Resić  
halimaresic@hotmail.com

Jasem Y. Al-Hashel  
jasemkumsa@hotmail.com

Rok Zorec  
rok.zorec@gmail.com

Refet Gojak  
refetmd@gmail.com

Jan Ravnik  
jan295@gmail.com

<sup>1</sup> Medical Faculty, University of Ljubljana, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>2</sup> Department of Neurology, Clinical Centre of Sarajevo University, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

<sup>3</sup> Clinic for Haemodialysis, Clinical Centre of Sarajevo University, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

<sup>4</sup> Department of Neurology, Ibn Sina Hospital, Kuwait City, Kuwait

<sup>5</sup> Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Ljubljana, Slovenia

<sup>6</sup> Department of Infectology, Clinical Centre of Sarajevo University, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

<sup>7</sup> Faculty of Mathematics and Physics, Ljubljana, Slovenia

## Introduction

Polyneuropathy commonly occurs in patients with chronic kidney disease (CKD) as a consequence of diabetes, hypertension, and glomerulonephritis, or a multi-system concomitant disorder. It is well known that the prevalence of uremic polyneuropathy (UP) in patients with CKD is high and varies between 60 and 100 % [1–4]. UP is one of the most common neurological disorders associated with CKD. Despite adequate dialysis and transplant programs, UP remains a major disabling feature in the life of uremic patients. Additionally, in CKD, mononeuropathies and ischemic monomelic neuropathy related to arteriovenous (AV) fistulas are often described [1, 3]. Glomerular filtration rates of <12 ml/min and increased creatinine levels are associated with increased rates of UP [4, 5].

The symptoms of UP are slowly progressive, symmetrical, and begin distally in the feet and then slowly spread up the legs [1–3]. Usually, patients develop sensory symptoms such as numbness, paresthesias, discomfort, pricking, and cramps in the legs. A minority of patients complain of burning feet, pain, and hyperalgesia. Restless legs are often reported, and autonomic abnormalities are mainly subclinical [6]. Neuropathological studies in patients with UP have demonstrated predominant axonal involvement with secondary segmental demyelination [7, 8]. These studies are supported by neurophysiological examinations [9–11]. Routine neurophysiological nerve conduction studies (NCS) and needle examinations evaluate large-diameter myelinated fibers only and are insufficient to detect a dysfunction of small-diameter nerve fibers. Numbness and paresthesia associated with UP mostly indicates impairment of large-diameter fibers, whereas pain, hyperalgesia, and dysesthesia reflect dysfunction of small-diameter nerve fibers.

The cutaneous silent period (CSP) enables a simple assessment of small nerve fiber function. A noxious cutaneous stimulus on the finger tips excites thin myelinated A-delta nerve fibers and causes a transient suppression of voluntary muscle activity. High-intensity electrical fingertip stimulation activates in addition to large-diameter fibers also small-diameter fibers, evoking complex excitatory and inhibitory responses which may partially overlap in a given muscle. The suppression of muscle activity is considered a spinal inhibitory reflex [12–14]. CSP is a complementary method to conventional NCS and is very useful in the study of small-diameter nerve fiber function. However, quantitative sensory testing of small and unmyelinated nerve fibers is not widely performed in neurophysiological units [10, 15–17].

The aim of the current study was to investigate standard motor and sensory neurophysiological parameters, reflecting the function of large-diameter nerve fibers, in the hands

of hemodialysis patients, and to compare the degree of dysfunction in the hands of patients with and without fistulas. The secondary aim of this study was to evaluate the function of small-diameter nerve fibers, and to investigate the association between electrophysiological parameters and hemodialysis adequacy.

## Materials and methods

A total of 38 randomly selected patients with CKD treated three times weekly with hemodialysis at the University Hemodialysis Department in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, were studied. The control group comprised 38 gender- and aged-matched healthy subjects. All patients enrolled in this study were on maintenance hemodialysis. The mean age of hemodialysis patients was  $56.6 \pm 10.9$  years, and of control subjects  $52.2 \pm 10$  years. The sex distribution was similar in both groups; 21 males, 17 females in the patient group versus 23 males, 15 females in the control group. The mean duration of hemodialysis treatment was  $7.9 \pm 8.0$  years. The most common etiology of CKD was chronic glomerulonephritis in 17 patients, long-lasting uncontrolled hypertension in eight, analgesic drug-induced nephropathy in five, polycystic disease in two, and reflux renal affection in two patients, while in four patients the origin was unidentified. We excluded patients with diseases that might promote the development of polyneuropathy, such as diabetes, vitamin B12 deficiency, sarcoidosis, hypothyroidism, alcoholism and amyloidosis, and patients on drugs that might contribute to peripheral nerve affection, systemic inflammatory and malignant diseases, and psychiatric disorders. Written informed consent was obtained from patients and healthy control subjects. The study was given approval by the local ethics committee at the Sarajevo Medical Center (29-TK-2748/11).

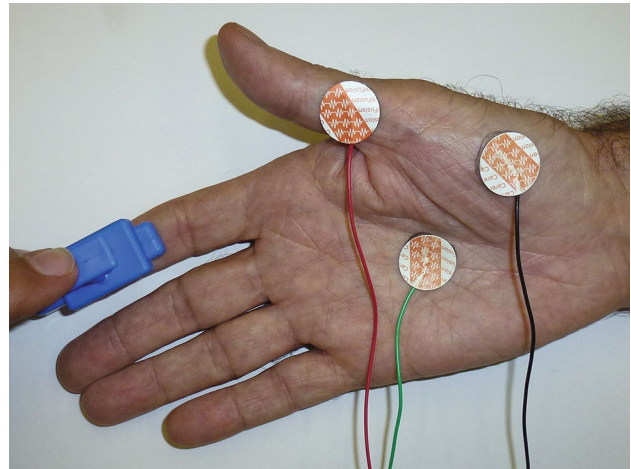
Routine blood biochemical investigations, with special focus on renal insufficiency, were carried out including serum potassium, sodium, magnesium, calcium, urea, creatinine, parathormone, and Kt/V. The adequacy of hemodialysis was estimated using the urea kinetics index ( $Kt/V_{\text{urea}}$ ), which is a function of dialyzer urea clearance, treatment time, and urea distribution volume.  $\beta$ 2-Microglobulin was estimated to evaluate kidney function.

NCS was performed at the Neurophysiological Department of the Department of Neurology, Clinical Centre, Sarajevo. Using surface electrodes (CareFusion, Middleton, WI, USA), the motor parameters of the peripheral nerves including distal motor latency (DML), compound muscle action potential (CMAP) amplitude, median and ulnar nerve motor conduction velocity (MCV), and a late motor response F-wave (minimal latency after 20 supramaximal stimuli), were recorded. To detect median nerve CMAP, the

active recording electrode was placed on the thenar eminence (abductor pollicis brevis muscle), and the reference electrode was placed over the muscle tendon. Distal stimulation was applied at the wrist 8 cm from the active electrode and proximal to the antecubital fossa. For ulnar nerve CMAP detection, the recording electrode was placed over the hypothenar eminence (abductor digiti minimi muscle), and the reference electrode was placed over the muscle tendon. Distal stimulation was applied at the same distance as for the median nerve, and proximally 3 cm below and 7 cm above the elbow. Sensory nerve conduction velocity (SCV) and the amplitude of median and ulnar sensory nerve action potentials (SNAPs) were also calculated. SNAPs were detected by antidromic nerve stimulation over the skin of the lateral (median nerve) and medial part (ulnar nerve) of the ring finger using superficial electrodes and a standard stimulating bipolar electrode. The distance between stimulating and recording electrodes was 14 cm. Neurophysiological parameters were recorded on the hand with and without AV fistula. Neurophysiological examination always commenced with the hand without fistula. Skin temperature was maintained at  $\geq 29$  °C. Standard electrophysiological machine settings were used [18].

CSP was elicited by electrical square pulse stimulation using standard bipolar electrodes (0.5 ms duration, 80–100 mA intensity, 250 ms sweeps, 30 and 10,000 Hz filters) at the palmar distal tip of digit II, stimulating median sensory fibers. An intensity of 15–25 times sensory threshold was delivered at the intermediate and distal phalanges of the index finger simultaneously with near-maximum activated abductor pollicis brevis muscle. Recording electrodes were placed in the same position as for median nerve motor conduction measurement (Fig. 1). To calculate CSP parameters, at least four individual responses were superimposed. CSP onset latency was recorded at the beginning of voluntary muscle activity suppression, and CSP end latency was recorded at the start of new muscle activity. The difference between the two latencies indicates duration of CSP. CSP latencies and duration were calculated for both hands for patients, and on the dominant hand only for control subjects [12–14].

NCS and CSP measurement were conducted using a Medelec Synergy system (Oxford Instruments, High Wycombe, UK). Symptoms of muscle weakness (including bulbar and limb muscle weakness), sensory disturbances, positive (numbness, prickling, burning pain) and negative symptoms (difficulty identifying objects in mouth and hands, and unsteadiness in walking), and autonomic symptoms were assessed using the Neurological Symptom Score (NSS) developed by Dyck. The maximum score achieved was 17 points (T-NSS, [19]). Polyneuropathy was scored as stages 0, no neuropathy; 1, asymptomatic (with  $\geq 2$  abnormalities on NCS and T-NSS = 0); 2, symptomatic



**Fig. 1** Measurement of cutaneous silent period

polyneuropathy (T-NSS  $\geq 2$  with normal NCS or T-NSS  $\geq 1$  and abnormal NCS); 3, disabling polyneuropathy (T-NSS  $\geq 2$  with normal NCS or T-NSS  $\geq 1$  with abnormal NCS, and neuropathic symptoms are disabling) [19].

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for Windows (Version 19.0, SPSS Inc., Chicago, Ill, USA), and Microsoft Excel (Version 11, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Parametric results are expressed as mean values with standard deviation for each group. To compare the CSP onset latency of patients with control group latency, an independent Student's *t* test was performed. Normal distribution was analyzed using the Shapiro–Wilk test. Asymmetric parameters were analyzed using the Mann–Whitney test. Analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the difference between neurophysiological motor and sensory parameters and the CSP of patients' hands, with and without fistula, compared with the control group. Where significant differences in the overall ANOVA were found, a Bonferroni post hoc test was also used to adjust for multiple comparisons.

Spearman's rho correlation coefficient was used to assess two different variables where one variable had a normal distribution and the other a statistically significant non-normal distribution. Accordingly, both variables were considered to have non-normal distributions to avoid statistical error. Pearson correlation was used to analyze the relationship between hemodialysis duration and CSP onset latencies of patients' hands with and without fistula. Correlations between neurophysiological parameters and biochemical measurements were also calculated.

Regression analysis was performed to assess the relationship between CSP onset and various parameters (motor

**Table 1** Median and ulnar nerve motor conduction parameters in hemodialysis patients and control group (mean  $\pm$  SD)

	Median nerve				Ulnar nerve			
	DML (ms)	CMAP amplitude (mV)	MCV (m/s)	F-wave (ms)	DML (ms)	CMAP amplitude (mV)	MCV (m/s)	F-wave (ms)
Patients AV	3.9 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 2.5	51.4 $\pm$ 7.6	30.8 $\pm$ 4.3	3.3 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 1.9	56.4 $\pm$ 7.2	29.8 $\pm$ 3.1
Patients non-AV	3.8 $\pm$ 0.6	8.0 $\pm$ 2.5	52.8 $\pm$ 5.0	28.7 $\pm$ 4.1	3.1 $\pm$ 0.3	8.5 $\pm$ 1.8	55.7 $\pm$ 10.9	28.4 $\pm$ 4.9
Healthy	3.9 $\pm$ 0.3	10.0 $\pm$ 2.1	58.2 $\pm$ 5.3	27.5 $\pm$ 3.9	3.2 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 1.6	60.0 $\pm$ 4.8	27.6 $\pm$ 1.7
ANOVA	NS	$p = 0.001$	$p = 0.001$	$p = 0.002$	NS	NS	NS	$p = 0.023$

DML distal motor latency, CMAP compound muscle action potential, MCV motor conduction velocity, AV arteriovenous fistula, NS nonsignificant

and sensory neurophysiological findings and hemodialysis duration). A  $p$  value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

## Results

Mean median nerve motor conduction parameter values in hemodialysis patients' hands, with and without fistulas, and the control group are shown in Table 1. There were no differences in DMLs among groups. Mean median nerve CMAP amplitudes in the control group were significantly higher compared with the hemodialysis patient group with AV fistulas ( $p < 0.0001$ ) and without fistulas ( $p < 0.001$ ). In addition, mean median nerve MCVs (fistulas  $p < 0.0001$ , without fistulas  $p < 0.001$ ) were slower compared with the control group. Minimal median nerve F-wave latencies in patients' hands with AV fistulas were significantly longer ( $p = 0.002$ ) compared with the control group, but there was no significant difference between patients' hands without fistulas and the control group.

For the ulnar nerves (Table 1), no statistical differences were observed for mean DMLs, CMAP amplitudes, and MCVs in the forearm and across the elbow between patient groups and the control group. Minimal F-wave latencies were significantly longer when stimulating the ulnar nerve in patients' hands with fistulas ( $p = 0.020$ ) compared with control subjects, whereas F-wave latencies of patients' hands without fistulas were not significantly different from the control group.

Median and ulnar nerve SCVs and SNAP amplitudes in patient and control groups are shown in Table 2. The mean median nerve SNAP amplitudes were significantly lower in both patient groups compared with the control group (fistulas  $p = 0.009$ , without fistulas  $p = 0.005$ ). There was a significant difference in median nerve SCVs between all three groups ( $p = 0.001$ ; control vs. AV  $p < 0.0001$ ; AV vs. non-AV  $p = 0.033$ ; and control vs. non-AV  $p = 0.003$ ). There was no difference in mean ulnar nerve SNAP amplitudes between the groups. Ulnar nerve SCVs were

**Table 2** Sensory nerve conduction parameters in hemodialysis patients and control group (mean  $\pm$  SD)

	Median nerve		Ulnar nerve	
	Amp ( $\mu$ V)	SCV (m/s)	Amp ( $\mu$ V)	SCV (m/s)
Patients AV	11.9 $\pm$ 8.0	41.5 $\pm$ 6.7	12.8 $\pm$ 7.2	43.9 $\pm$ 6.2
Patients non-AV	11.6 $\pm$ 7.2	45.3 $\pm$ 7.3	12.8 $\pm$ 7.7	46.7 $\pm$ 8.0
Healthy	17.3 $\pm$ 7.0	50.2 $\pm$ 3.6	16.9 $\pm$ 9.0	52.7 $\pm$ 3.5
ANOVA	$p = 0.002$	$p = 0.001$	NS	$p = 0.001$

Amp amplitude, SCV sensory conduction velocity, AV arteriovenous fistula, NS nonsignificant

markedly slower in the patient group compared with the control group ( $p = 0.001$ ), and between the control group and patients with and without fistulas (healthy vs. AV, and healthy vs. non-AV  $p < 0.0001$ ).

Subclinical median nerve entrapment at the wrist was neurophysiologically detected in 8/38 (21 %) of patients' hands with fistulas, and in 6/38 (16 %) without fistulas. One patient had very severe carpal tunnel syndrome (CTS), and median nerve examination revealed marked bilateral electrophysiological abnormalities. To avoid possible severe median nerve motor and sensory fiber impairment interfering with CSP parameter measurement, this patient was excluded from the study. Other patients experienced a mild median nerve involvement.

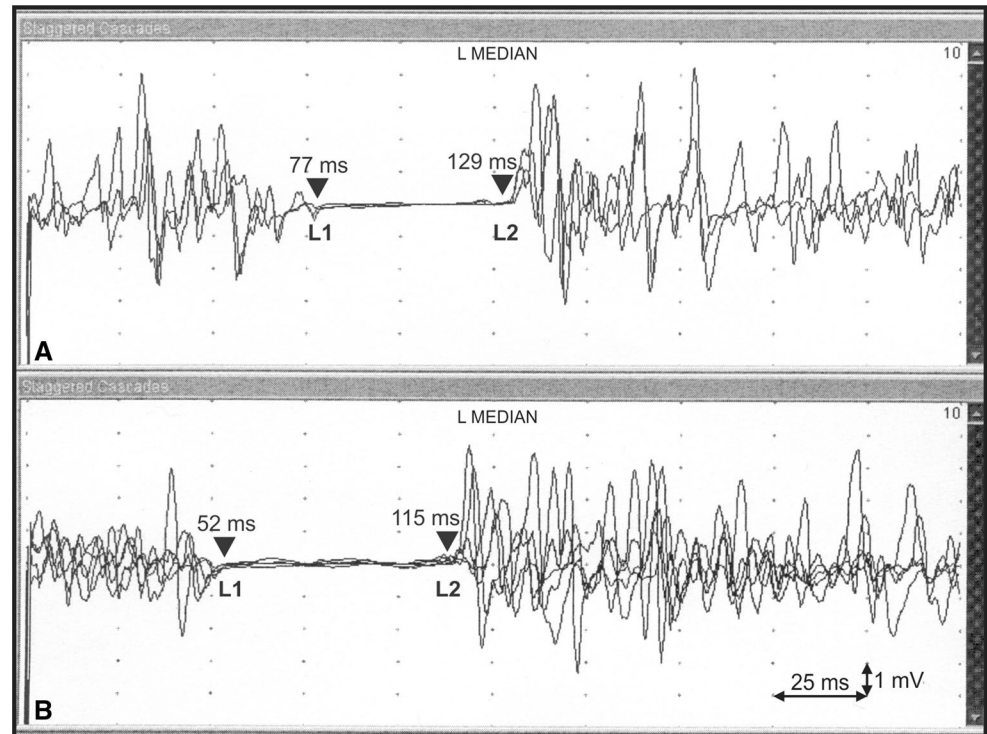
The mean CSP onset latency in hemodialysis patients was significantly longer compared with the control group (control group confidence interval, 51.2–64.1 ms; healthy vs. AV and healthy versus non-AV,  $p < 0.0001$ ). The same relationship was observed for CSP end latencies. Measurement of CSP duration, muscle activity suppression, did not reveal any differences between the groups (Table 3). No significant difference in CSP onset latency between the fistula and non-fistula patient groups was observed. Prolonged CSP onset latency was observed in 12/38 (32 %) hemodialysis patients equally distributed in both groups. CSP onset and end latencies, and the duration of muscle activity suppression in a control subject and a hemodialysis patient are



**Table 3** Cutaneous silent period onset latencies and duration (mean  $\pm$  SD)

	CSP onset latency (ms)	CSP end latency (ms)	CSP duration (ms)
Patients AV	81.1 $\pm$ 21.0	138.0 $\pm$ 25.2	58.9 $\pm$ 20.3
Patients non-AV	84.0 $\pm$ 14.7	144.2 $\pm$ 28.7	60.1 $\pm$ 19.1
Healthy	57.6 $\pm$ 18.7	119.9 $\pm$ 13.9	62.3 $\pm$ 21.4
ANOVA	$p = 0.0001$	$p = 0.0001$	NS

CSP onset latency, cutaneous silent period onset latencies, AV arteriovenous fistula, NS nonsignificant

**Fig. 2** Cutaneous silent period in a haemodialysis patient (a) and healthy control subject (b)

shown in Fig. 2. Marked prolongation of CSP onset latency is shown for the hemodialysis patient.

Regression analysis showed that a higher level of  $\beta$ 2-microglobulin was associated with slowing of median nerve MCV ( $p = 0.036$ ) and SCV ( $p = 0.003$ ) in hemodialysis patients (Figs. 3, 4), whereas Kt/V was not associated with median nerve MCV. In contrast, median nerve SCV increased with higher levels of Kt/V ( $p = 0.012$ , Fig. 5). Ulnar nerve MCVs and SCVs were not associated with the level of  $\beta$ 2-microglobulin and Kt/V. Similarly,  $\beta$ 2-microglobulin and Kt/V levels were not associated with F-wave latencies.

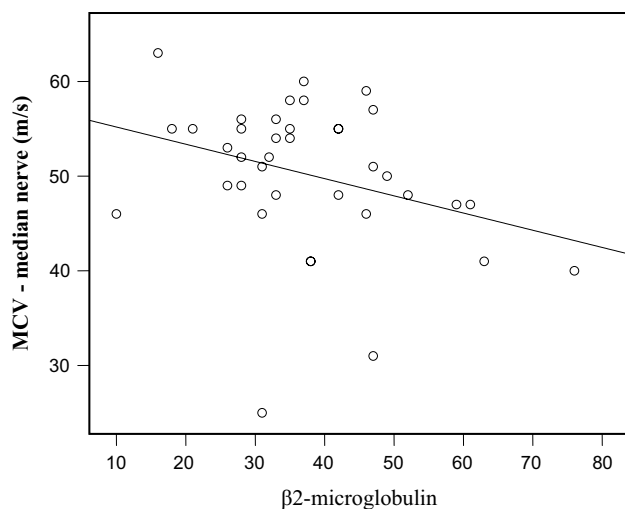
An inverse correlation between median and ulnar nerve MCVs and hemodialysis duration was observed ( $\rho = -0.28$ ,  $p = 0.007$ ). With the regression model, no association of  $\beta$ 2-microglobulin, creatinine, and Kt/V with CSP onset latency was observed. No correlation between parathormone, motor and sensory neurophysiological parameters, CSP onset latency, and duration of silent period was found.

Neurological examination of hemodialysis patients revealed signs of asymptomatic polyneuropathy (stage 1) in 14/38 (37 %) patients, symptomatic neuropathy (stage 2) in 13/38 (34 %), and disabling neuropathy (stage 3) in 4/38 (11 %) patients. In stage 1, no clinical symptoms were noted; in stage 2 T-NSS was not more than two points; and in stage 3 a maximum 4 points were scored.

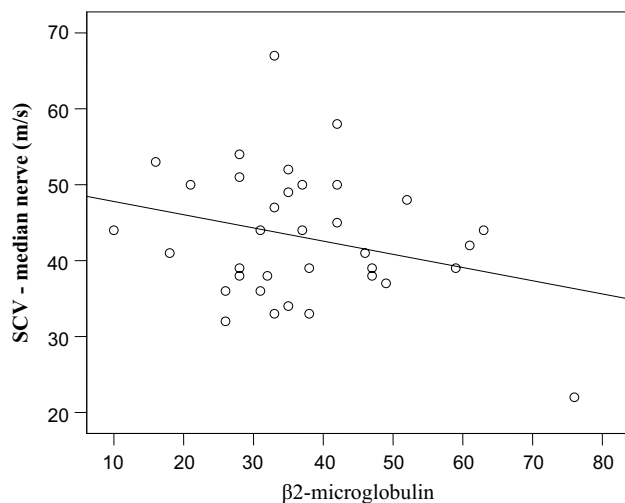
## Discussion

UP is an underestimated clinical feature in dialysis patients and represents a huge problem in terms of their quality of life [20].

Most patients on maintenance hemodialysis develop clinical and neurophysiological signs of polyneuropathy. Despite advances in dialysis procedures, the prevalence of UP in CKD patients is still high [11, 20, 21]. Most electrophysiological studies focus on evaluating large, fast-conducting, lower limb nerve fibers, which are more often

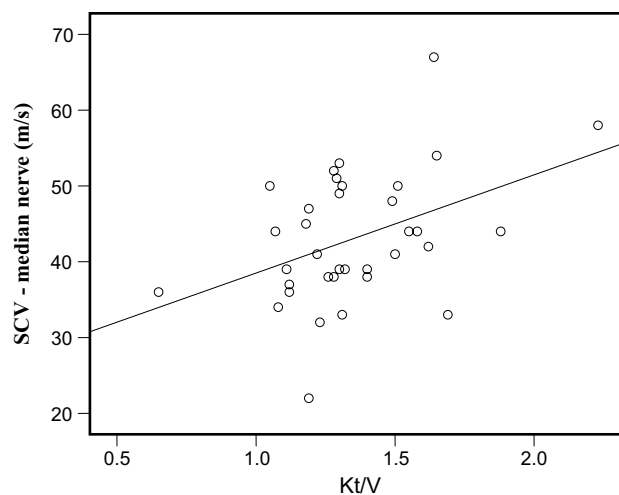


**Fig. 3** Slowing MCVs of the median nerves in haemodialysis patients related to  $\beta 2$ -microglobulin



**Fig. 4** Slowing SCVs of median nerves in haemodialysis patients related to  $\beta 2$ -microglobulin

affected compared with upper limb nerve fibers. In this study, sensorimotor polyneuropathy was established in 82 % of patients. Patients mainly presented with stage 1 and 2 polyneuropathy, and only a small percentage (11 %) suffered from disabling neuropathy. In patients with stage 3 disabling neuropathy, we observed involvement of large- and small-diameter nerve fibers. Few patients suffered from burning feet, pain, hyperalgesia, and dysesthesia, indicating involvement of small nerve fibers. This finding supports the rare occurrence of small-diameter nerve fiber neuropathy. Many studies have shown that axonal degeneration followed by segmental demyelination is the primary pathological process in UP [9, 10, 22]. Additionally, a case



**Fig. 5** Influence of Kt/V on median nerve SCVs

of accelerated uremic neuropathy with excellent improvement after dialysis was reported [23]. Moreover, peripheral neuropathy has been described in pre-dialysis patients with CKD [24].

CTS, with prevalence rates ranging from 6 to 31 %, has been described as the most common mononeuropathy [11, 25–28]. In this study, subclinical median nerve entrapment was discovered in 21 % of patients' hands with fistulas and 16 % of patients' hands without fistulas. There was no significant difference in the occurrence of subclinical median nerve entrapment between hands with and without fistulas. Contradictory findings regarding the origin of CTS and the role of amyloidosis, AV fistulas, tumoral calcinosis,  $\beta 2$ -microglobulin, or "theft" of blood from the distal limbs, have been reported [3, 26, 27, 29, 30]. We postulate that in many cases median NCS changes in hemodialysis patients are associated with an underlying polyneuropathy, and are not due to entrapment damage.

Our findings indicate axonal nerve fiber lesions, and greater susceptibility of median compared with ulnar nerve fibers. There were no statistical differences between patients with and without fistulas.

A significant delay of the late response, median and ulnar nerve mean minimal F-waves was observed in hemodialysis patients with fistulas. Specifically, in the hands of hemodialysis patients with fistulas, F-wave latency was the most sensitive parameter suggesting involvement of large, median, and ulnar nerve fibers. It is important to note that the minimal F-wave reflects the function of the entire motor axon pathway, whereas other nerve conduction parameters provide information about restricted segments of nerve fiber pathways [11]. In patients with fistulas in the hands, the location of fistulas may induce a "theft" of blood from the distal limbs, and influence fiber impulse volley through

large nerve fibers of both nerves in the hands [3, 26, 27, 29, 30]. The median nerve, owing to its anatomical position, provides greater nerve fascicular susceptibility to the location of the fistula compared with the ulnar nerve. The ischemic role may explain reported nerve dysfunction [3]. Indeed, Laaksonen et al. [10] reported a higher percentage of median nerve damage compared with ulnar nerve damage, which is in agreement with our results.

When assessing the relationship between motor and sensory parameters in patients with and without fistulas, the most important factor was prolongation of mean median and ulnar nerve F-wave latencies observed in the patient group with fistulas.

There was an inverse correlation between level of  $\beta$ 2-microglobulin and median nerve MCV and SCV in hemodialysis patients, whereas higher Kt/V was associated with improved median nerve SCV. Patients with higher Kt/V level had fewer abnormal electrophysiological parameters. An association between F-wave latencies and Kt/V has been previously described [11]. In contrast,  $\beta$ 2-microglobulin and Kt/V levels had no impact on ulnar nerve NCS. Additionally, there was an inverse correlation between median and ulnar nerve MCVs and the duration of hemodialysis. Obviously, the duration of CKD influences the level of nerve fiber damage.

The evaluation of CSP is a useful method for detecting mainly the function of A-delta fibers. CSP latency reflects conduction through A-delta afferents, efferent motor axons, and synaptic delay, and is compatible with an inhibitory spinal reflex [31]. We found a significant delay in the onset CSP latency in 32 % of hemodialysis patients. CSP was detected in all patients, demonstrating preserved nerve continuity. Changes in CSP latency were similar in patients with and without fistulas. We used stimulation of digit II, because muscle activity suppression is more pronounced in the abductor pollicis brevis than in the first dorsal interosseous muscle, and CSP onset latency is shorter compared with stimulating digit V [32–34]. One study found a significant decrease in mixed silent period duration for median nerve stimulation at the wrist in short-term hemodialysis patients, but this difference disappeared with prolonged dialysis duration. No correlation was found between silent period alterations and peripheral nerve involvement, and the authors suggested a relationship between silent period changes and brisk deep tendon reflexes [35]. This study supports the normal CSP duration observed in our patients who underwent longer dialysis duration compared with study above. In contrast, a recent study of 20 patients reported persistent shortening of CSP duration, indicating thin fiber uremic neuropathy [36]. When measuring CSP, it is very important to precisely control skin temperature, because lower temperatures may influence CSP onset

latency. Muscle suppression occurs as a result of differing fiber size activity in the afferent rather than the efferent arm, supporting the role of A-delta fibers as the main afferent input [37]. The last study, including patients with demyelinating and axonal polyneuropathies, reflects the crucial role of axons of small-diameter A-delta nerve fibers in CSP duration. CSP duration depends on the amount of activated fibers, and most likely increases proportionally with the number of activated A-delta fibers. Although CSP duration is strongly related to the function of afferent pathways, it is also necessary to take into account efferent activity. In addition, increasing motor neuron firing in axonal polyneuropathy may influence CSP parameters producing shorter CSP duration. CSP onset latency delay is considered a problem with conduction properties of A-delta nerve fibers [38]. The finding of prolonged CSP duration in axonal and demyelinating polyneuropathies is supported by previous nerve biopsy studies, which showed loss of both large- and small-diameter nerve fibers in patients with diabetic polyneuropathy [39]. We believe that normal CSP duration in our patient group is attributable to less axonal loss compared with previous studies. A recent research article investigated the effect of anesthetic sciatic nerve block on the CSP of foot muscles. The first result reported was CSP onset latency delay. The cutaneo-muscular reflex subsequently disappeared after the onset of muscle paralysis. Using local anesthetic facilitates the investigation of different types of nerve fibers [40]. The presence of large nerve fiber function indicates enough excitable spinal motor neurons are present to produce normal CSP duration. DMLs, MCVs, F-wave latencies, and SCVs have no influence on small nerve fiber function. However, small nerve fiber abnormalities occur independently from other electrophysiological parameters. No correlations between CSP latency, creatinine levels, Kt/V,  $\beta$ 2-microglobulin, and parathormone were noted. Indeed, some authors have presumed that small nerve fiber uremic neuropathy is a separate entity and rarely develops [3, 10]. In the study by Laaksonen et al., cold detection thresholds on the lower limbs were abnormal in 60 % of patients. It is known that cold sensation is mediated by thin myelinated A-delta nerve fibers, and the authors suggested that thin myelinated A-delta nerve fibers are more affected than unmyelinated fibers in UP. The authors did not find significant CSP parameter alterations between patients with and without pain, excluding C-nerve fiber involvement [38]. The advantage of CSP is that it is simple and can be conducted in most laboratories. However, measurement of CSP is not superior to conventional electrophysiological nerve examination for evaluating neuropathy, but it is a useful method for detecting the function of small nerve fibers, whose role is often underestimated.

## Conclusion

Polyneuropathy in hemodialysis patients is a common and disabling feature. Standard neurophysiological examination includes the function of large nerve fibers, while the function of small nerve fibers is often underestimated. The measurement of CSP offers a simple and noninvasive method to rule out dysfunction of small A-delta nerve fibers and to detect subclinical polyneuropathy.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- Baumgaertel MW, Kraemer M, Berlit P (2014) Neurologic complications of acute and chronic renal disease. *Handb Clin Neurol* 119:383–393
- Said G (2013) Uremic neuropathy. *Handb Clin Neurol* 115:607–612
- Krishnan AV, Kierman MC (2007) Uremic neuropathy: clinical features and new pathophysiological insight. *Muscle Nerve* 35:273–290
- Lacerda G, Krummel T, Hirsch E (2010) Neurologic presentations of renal diseases. *Neurol Clin* 28:45–59
- Thomas PK (1978) Screening for peripheral neuropathy in patients treated by chronic haemodialysis. *Muscle Nerve* 1:396–399
- Brouns R, De Deyn PP (2004) Neurological complications in renal failure: a review. *Clin Neurol Neurosurg* 107:1–16
- Savazzi GM, Migone L, Cambi V (1980) The influence of glomerular filtration rate on uremic polyneuropathy. *Clin Nephrol* 13:64–72
- Said G, Boudier L, Selva J, Zingraff J, Druke T (1983) Different patterns of uremic polyneuropathy: clinico-pathologic study. *Neurology* 33:567–574
- Angus-Lepan H, Burke T (1992) The function of large and small nerve fibres in renal failure. *Muscle Nerve* 15:288–294
- Laaksonen S, Metsarinne K, Voipio-Pulkki LM, Falck B (2002) Neurophysiological parameters and symptoms in chronic renal failure. *Muscle Nerve* 25:884–890
- Hojs-Fabjan T, Hojs R (2006) Polyneuropathy in haemodialysis patients: the most sensitive electrophysiological parameters and dialysis adequacy. *Wien Klin Wochenschr* 118(suppl 2):29–34
- Inghilleri M, Cruccu G, Argenta M, Polidori L, Manfredi M (1997) Silent period in upper limb muscles after noxious cutaneous stimulation in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 105:109–115
- Leis AA, Kofler M, Ross M (1992) The silent period in pure sensory neuronopathy. *Muscle Nerve* 15:1345–1348
- Serrao M, Parisi L, Pierelli F, Rossi P (2001) Cutaneous afferents mediating the cutaneous silent period in the upper limbs: evidence for a role of low-threshold sensory fibres. *Clin Neurophysiol* 112:2007–2014
- Denislic M, Meh D (1997) Die quantitative Bestimmung der Funktion der dünnen Nervenfasern. *Nervenarzt* 68:509–514
- Santiago S, Ferrer T, Espinosa ML (2000) Neurophysiological studies of thin myelinated (A delta) and unmyelinated (C) fibres: application to peripheral neuropathies. *Neurophysiol Clin* 30:27–42
- Novak P, Burger H, Marincek C, Meh D (2004) Influence of foot pain on walking ability of diabetic patients. *J Rehabil Med* 36:249–252
- Lee HJ, De Lisa JA (eds) (2005) *Manual of nerve conduction study and surface anatomy for needle electromyography*, 4th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 25–55
- Dyck PJ (1988) Detection, characterization and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. *Muscle Nerve* 11:21–32
- Mambelli E, Barrella M, Facchini MG, Mancini E, Sicuso C, Bainotti S, Formica M, Santoro A (2012) The prevalence of peripheral neuropathy in haemodialysis patients. *Clin Nephrol* 77:468–475
- Krishnan AV, Phoon RK, Pussell BA, Charlesworth JA, Bostock H, Kierman MC (2005) Altered motor nerve excitability in end-stage kidney disease. *Brain* 128:2164–2174
- Dyck PJ, Johnson WJ, Lambert EH, O'Brien PC (1971) Segmental demyelination secondary to axonal degeneration in uremic polyneuropathy. *Mayo Clin Proc* 46:400–431
- Deger SM, Reis KA, Guz G, Bali M, Erten Y (2011) A case of an accelerated uremic neuropathy. *Ren Fail* 33:371–372
- Aggarwal HK, Sood S, Jain D, Kaverappa V, Yadav S (2013) Evaluation of spectrum of peripheral neuropathy in pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Ren Fail* 35:1323–1329
- Al-Hayk K (2007) Neuromuscular complications in uremics: a review. *Neurologist* 13:188–196
- Bicknell JM, Lim AC, Raroque HG Jr, Tzamaloukas AH (1991) Carpal tunnel syndrome, subclinical median mononeuropathy, and peripheral polyneuropathy: common early complications of chronic peripheral dialysis and haemodialysis. *Arch Phys Med Rehabil* 72:378–381
- Sivri A, Çeliker R, Sungur C, Kutsal YG (1994) Carpal tunnel syndrome: a major complication in haemodialysis patients. *Scand J Rheumatol* 23:287–290
- Weiber H, Linell F (1987) Tumoral calcinosis causing acute carpal tunnel syndrome. Case report. *Scand J Plast Reconstr Surg* 21:229–230
- Gousheh J, Iranpour A (2005) Association between carpal tunnel syndrome and arteriovenous fistula in haemodialysis patients. *Plast Reconstr Surg* 116:508–513
- Kwon HK, Pyun SB, Cho WY, Boo CS (2011) Carpal tunnel syndrome and peripheral polyneuropathy in patients with end-stage kidney disease. *J Korean Med Sci* 26:1227–1230
- Svilpauskaitė J, Truffert A, Vaiciene N, Magistris MR (2006) Electrophysiology of small peripheral nerve fibres in man. A study using the cutaneous silent period. *Medicina (Kaunas)* 42:300–313
- Kofler M, Fröhlich K, Saltuari L (2003) Preserved cutaneous silent periods in severe entrapment neuropathies. *Muscle Nerve* 28:711–714
- Kofler M (2003) Functional organization of exteroceptive inhibition following nociceptive electrical fingertip stimulation in humans. *Clin Neurophysiol* 114:973–980
- Leis AA, Stokic DS, Fuhr P, Kofler M, Kronenberg MF, Wisel J et al (2000) Nociceptive fingertip stimulation inhibits motor-neuron pools in the human upper limb. *Neurology* 55:1305–1309
- Resende LAL, Caramori JCT, Kimaid PAT, Martin LC, Barretti P (2002) The silent period in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 42:275–279
- Kayacan SM, İřak B, Kayacan D, Mũftũođlu M, Karadađ A (2011) The importance of cutaneous silent period in uremic polyneuropathy. *Nobel Med* 7:89–94

37. Kofler M, Valls-Solé J, Vasko P, Boček V, Štetkárová I (2014) Influence of limb temperature on cutaneous silent periods. *Clin Neurophysiol* 125:1826–1833
38. Lopergolo D, Isak B, Gabriele M et al (2015) Cutaneous silent period recordings in demyelinating and axonal polyneuropathies. *Clin Neurophysiol* 126:1780–1789
39. Dyck PJ, Lais A, Karnes LJ, O'Brian P, Rizza R (1986) Fibre loss is primary and multifocal in sural nerves in diabetic polyneuropathy. *Ann Neurol* 50:425–439
40. Mota IA, Fernandes JB, Cardoso MN, Sala-Blanch X, Kofler M, Valls-Solé J (2015) Temporal profile of the effects of regional anesthesia on the cutaneous reflexes of foot muscles. *Exp Brain Res* 233:2587–2596

# Morphological aspects of myocardial bridges

Almira Lujinović<sup>1\*</sup>, Amela Kulenović<sup>1</sup>, Eldan Kapur<sup>1</sup>, Refet Gojak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Sarajevo, Čekaluša 90, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. <sup>2</sup>Clinic of Infectious Diseases, Clinical Centre, University of Sarajevo, Bolnička 25, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

## ABSTRACT

Although some myocardial bridges can be asymptomatic, their presence often causes coronary disease either through direct compression of the “tunnel” segment or through stimulation and accelerated development of atherosclerosis in the segment proximally to the myocardial bridge. The studied material contained 30 human hearts received from the Department of Anatomy. The hearts were preserved 3 to 5 days in 10% formalin solution. Thereafter, the fatty tissue was removed and arterial blood vessels prepared by careful dissection with special reference to the presence of the myocardial bridges. Length and thickness of the bridges were measured by the precise electronic caliper. The angle between the myocardial bridge fibre axis and other axis of the crossed blood vessel was measured by a goniometer. The presence of the bridges was confirmed in 53.33% of the researched material, most frequently (43.33%) above the anterior interventricular branch. The mean length of the bridges was  $14.64 \pm 9.03$  mm and the mean thickness was  $1.23 \pm 1.32$  mm. Myocardial bridge fibres pass over the descending blood vessel at the angle of 10-90 degrees. The results obtained on a limited sample suggest that the muscular index of myocardial bridge is the highest for bridges located on RIA, but that the difference is not significant in relation to bridges located on other branches. The results obtained suggest that bridges located on other branches, not only those on RIA, could have a great contractive power and, consequently, a great compressive force, which would be exerted on the wall of a crossed blood vessel. © 2013 Association of Basic Medical Sciences of FB&H. All rights reserved

KEY WORDS: human heart, myocardial bridges, morphological aspects

## INTRODUCTION

Myocardial bridges represent an anomaly of coronary artery flow in which the branches flowing subepicardially descend into the myocardium more shallow or deeper, and after a shorter or longer intramyocardial flow, it reappears in the subepicardial tissue. Bundles of myocardial fibres, which in the form of small bridges, pass over the corresponding part of the coronary artery (“tunnel” segment), are marked as the myocardial bridge [1]. It was Reymann who first detected myocardial bridges, as early as in 1737 [2]. Porstmann and Iwig [3] were the first who, in 1960, detected the narrowing of the lumen ramus interventricularis anterior on coronary angiograms and presumed that it was caused by the contraction of myocardial bridge fibres and consequent compression on the “tunnel” segment wall. Data on frequency of myocardial bridges differ a lot and, probably, depend on the method used for their detection. Autopsies ascertained the great frequency of MB, i.e. 34.5%,

52%, 56% and 60% [4-7]. The similar results on the frequency of the MB showed also the more modern method, CT of coronary angiography [8-10], which enables visualization of myocardial bridges and monitoring of their morphological aspects. Angiographic frequency of myocardial bridges is much lower and it ranges from 0.8%, 4.5% to 12% [11-13]. The presence of myocardial bridges can be asymptomatic and some scientists considered them as a benign anomaly with a good long-term prognosis [11]. Yet, in many cases myocardial bridges are connected with heart rhythm disorder [14-16], angina pectoris [17-19], myocardial infarction [20-22] and sudden cardiac death [23, 24], so that their impact on incidence of coronary insufficiency is indisputable. Clinical manifestation of coronary disease, in patients with the myocardial bridge, can appear in two ways: by contraction of myocardial bridge fibres and direct compression of the “tunnel” segment [25-27] or by stimulation and accelerated development of atherosclerosis in the segment proximally to the myocardial bridge [28-30]. The first mechanism leads mainly to coronary insufficiency in young people, particularly in those exposed to the psychophysical exertion, while consequences of the latter mechanism appear most frequently in elderly persons [31]. Incidence and intensity of the coronary disease, in both mechanisms, depends primarily on the length [20-23], localization [31, 32] and thickness of bridges [32-34],

\* Corresponding author: Almira Lujinović,  
Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Sarajevo, Čekaluša 90, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina  
Phone: +38733212998; Fax: +38733205431  
E-mail: allmirah@yahoo.com

Submitted: 15 March 2012 / Accepted: 9 September 2013

what induced us to this research with the aim to detect the frequency of myocardial bridges above certain branches of coronary arteries, to ascertain length and thickness of bridges and if there existed their interrelation. We also wanted to find out if there existed the difference in the value of the myocardial bridge muscle index (MI) between bridges located above the anterior interventricular branch (RIA) and bridges situated above other branches. Our objective was also to detect the angle at which the myocardial bridge fibres pass over the “tunnel” segment of the crossed blood vessel.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

The research was carried out on 30 human hearts (of persons between 20 and 57 years of age) received from the Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Sarajevo. All the persons whose hearts were used in the research suffered a violent death and we are not aware if there were any coronary diseases stated in their history.

### Procedures

The hearts were preserved 3 to 5 days in 10% formalin solution. Thereafter, fatty tissue was removed and arterial blood vessels prepared by careful dissection with special reference to the presence of the myocardial bridges. If bridges were detected, their length and thickness were measured by the precise electronic caliper (Black & Decker, 0.00-155.00 mm, Landscheid), while the angle between the myocardial bridge fibre axis and other axis of the crossed blood vessel was measured by a goniometer. The muscle index of the myocardial bridge (MI) was calculated as the product of length and thickness expressed in millimetres.

### Statistical analysis

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) was used for statistical data processing. Mean, standard deviation, minimal and maximal values, as well as median were calculated for the length, thickness and MI. Pearson’s correlation coefficient was used for detection of interrelation between length and thickness of the bridges, while Mann Wintney test was used, because of uneven statistic data distribution, for research of the difference in the value of MI between the group of myocardial bridges located above the anterior interventricular branch (RIA) and the group of myocardial bridges located above other branches.

## RESULTS

The presence of myocardial bridges was confirmed in 16 hearts (53.33%) out of 30 hearts dissected. In 9 hearts there



**FIGURE 1.** Myocardial bridge above RIA (RIA-Anterior interventricular branch)

was detected one bridge in each heart, in 6 hearts two myocardial bridges in each (each of 4 hearts had one bridge above two different branches, while 2 hearts had two bridges each above the same branch). One heart had three bridges located above two branches, so that total number of bridges was 24. Myocardial bridges were found most frequently above the RIA (4.33%); 15 bridges were located above this branch (Figure 1), i.e. 62.5% out of total 24 detected bridges. Frequency of myocardial bridges above other branches (Figure 2) was much lower (Table 1).

**TABLE 1.** The Distribution of the MIC values according to the methods.

Blood vessel	% hearts with MB out of 30 hearts in total	% (N) MB out of 24 MB in total
RIA	43.33	62.50 (15)
Rip	3.33	4.17 (1)
Rmd	3.33	4.17 (1)
Rms	6.67	8.33 (2)
(Rdd)	16.67	20.83 (5)
Total	/	100 (24)

MB-Myocardial bridge; N-Number; RIA-Anterior interventricular branch; Rip-Posterior interventricular branch; Rmd-Right marginal branch; Rms-Left marginal branch; Rdd (var.) -Right diagonal branch

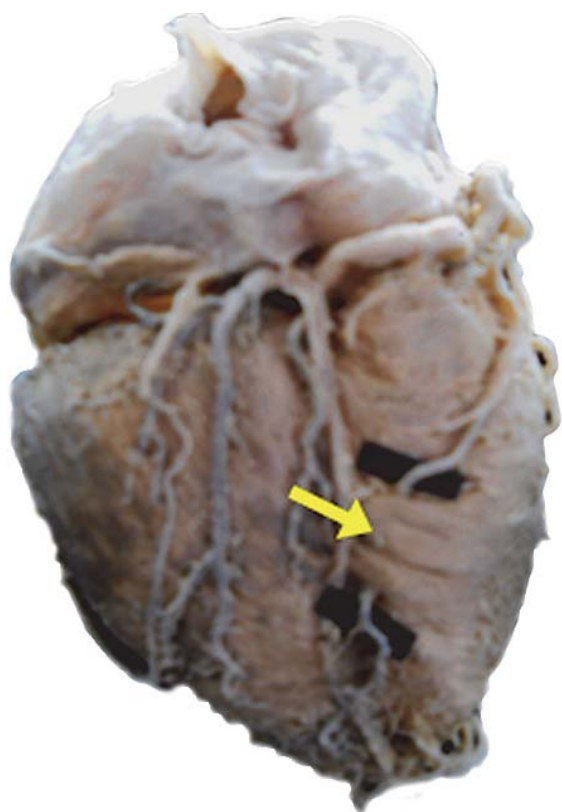


FIGURE 2. Myocardial bridge above Rdd (Rdd) - Right diagonal branch

TABLE 2. Morphological aspects of myocardial bridges

N=24	Length (mm)	Thickness (mm)	MI
Mean	14.64	1.23	23.07
Std.deviation	9.03	1.32	30.30
Minimum	3.44	0.33	1.17
Maximum	39.10	5.68	110.48
Median	13.67	0.51	6.93

N-number of myocardial bridges; MI-Muscle index of the myocardial bridge (length x thickness)

The average (mean) length of myocardial bridges amounted to 14.64±9.03 mm, while the average (mean) thickness was 1.23±1.32 mm. Value of myocardial bridge muscle index (MI) ranged from minimum 1.17mm to maximum 110.48mm and amounted to 23.07±30.30 (Table 2). Length and thickness of bridges stand in the correlation which is medium strong and positive  $r=0.438$ ,  $p=0.032$ . With the growth of the bridge

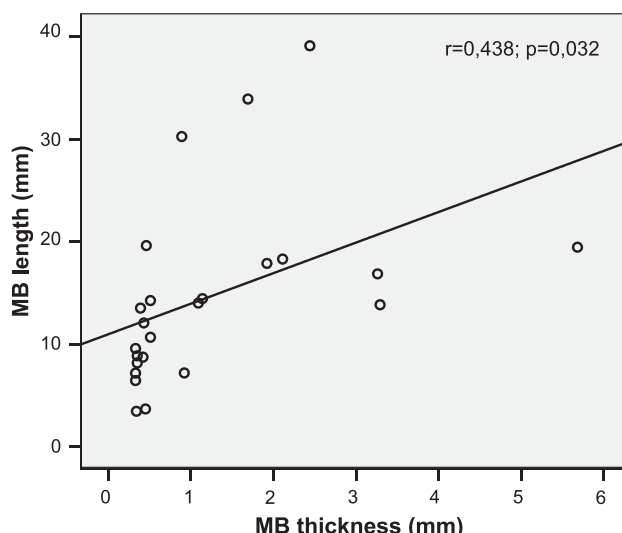


FIGURE 3. Correlation of thickness and length of myocardial bridges. MB-Myocardial bridges

length “grows” its thickness as well (Figure 3). The greatest mean length had the myocardial bridges located above Rms and it amounted to  $M=24.93\pm7.52$  mm, ranging from minimum 19.61 mm to maximum 30.25mm. The average length of bridges located above the RIA was  $M=14.78\pm10.20$  mm (ranging from minimum 3.44 mm to maximum 39.1 mm) and the two longest bridges 39.10 mm long, 33.91 mm respectively, were located above that branch. The greatest average thickness had the bridges located above the RIA and it amounted to  $M=1.36\pm1.51$  mm with the broad range from minimum 0.33 mm to maximum 5.68 mm that encompassed the thickest bridge and one from the two thinnest ones. Muscle index of the myocardial bridge (MI) also had the highest average value (mean) in bridges located above the anterior interventricular branch RIA. Although the value of the myocardial bridge muscle index (MI) was distinctly the greatest in myocardial bridges located above the anterior interventricular branch (RIA), Mann-Whitny test did not show any significant difference in the value of that index between the group of bridges located above the RIA and the group of bridges located on another branches (Table 3). In most cases 54,17% (13/24) myocardial bridge fibres passed over the descending blood vessel at the angle of 90 degrees (Table 4).

TABLE 3. Difference of the mean values (median) of the MI between bridges located above the RIA and those located on other branches

	N	Mean	Std. Deviation	Mini	Maxi	25 <sup>th</sup>	50 <sup>th</sup> (Median)	75 <sup>th</sup>	Mann-Whitny U	P	
MI	RIA	15	27.58	36.15	1.17	110.48	2.15	7.260	54.93	64.00	0.83
	Other branches	9	15.53	15.83	3.16	45.50	4.43	6.60	30.61		

N-Number of observations; MI-Muscle index of the myocardial bridge



**TABLE 4.** The number of myocardial bridges which pass over the certain blood vessel at the quoted angle

Blood vessel	90°	85°	80°	65°	60°	10°
RIA	9	1	2	2	1	-
Rip	1	-	-	-	-	-
(Rdd)	3	-	-	-	2	-
Rms	-	-	-	-	-	2
Rmd	-	-	-	-	-	1

RIA-Anterior interventricular branch; Rip-Posterior interventricular branch; Rmd-Right marginal branch; Rms-Left marginal branch; Rdd (var.)-Right diagonal branch

## DISCUSSION

The first description of a myocardial bridge originates as early as 1737 [2]. Special interest in myocardial bridges appeared in 20th century, when besides morphologists, also numerous clinicians began to study that phenomenon indicating to their impact on coronary hemodynamics. Although there are numerous data on the presence and frequency of myocardial bridges, they are rather heterogeneous and probably conditioned by the method used for detection of bridges. Researchers who studied the bridges using dissection method report about their high frequency ranging from 30-60% [5-7] what was also confirmed by CT coronary angiography [8-10]. Our findings on myocardial bridges in 53.33% studied cases are in accordance with the results of the quoted authors and confirm rather frequent presence of myocardial bridges above coronary arteries of human hearts. Angiographic frequency of myocardial bridges above coronary arteries is much lower and ranges from 0.8-12% [11-13]. Namely, the myocardial bridges on coronary angiograms are to be detected indirectly, on the basis of the systolic reduction of lumen, i.e. the milky effect, so that many of them remain unnoticed – depending, first of all, on their morphological aspects but also on the presence and intensity of the fixed proximal stenosis, myocardium contractility state, the presence of ascending aorta obstruction [1, 30, 31]. Yet, all results, regardless of the method used, indicate that RIA is the branch above which the myocardial bridges are mostly localized. This is also confirmed by our results which show that 15 of the total 24 detected bridges (i.e. 62.5% out of the total quantity) are located just above that branch. In five hearts, i.e. in 16.67% of the studied material, we detected the presence of the myocardial bridge above the right coronary artery branch flowing along the anterior or diaphragmal wall of the right ventricle. Because this variable branch of the right coronary artery was passing diagonally over the front or the back wall of the right ventricle we named it right diagonal branch (Rdd) like it was called by some other authors [5]. We also detected the presence of two myocardial bridges in

each of six hearts: in four hearts above different branches and in two hearts above the same branch, and that above the RIA. One heart had three myocardial bridges located above two branches. Kosinski [36] and Ferreira [37] were those who indicated the presence of double and triple bridges. The length of the myocardial bridges amounted to 14.64 mm in average, ranging broadly from 3.44 mm to 39.10 mm, what was in accordance with results reported by Polaček and Kosinski [7,36], who also detected bridges shorter than 5 mm, but significantly differed from the results received by Loukas [4] who reported that the shortest bridge was 12 mm long. We detected very thin myocardial bridges (0.33 mm) but also the ones 5.68 mm thick. As the length stands in positive correlation with the thickness, our confirmed opinion is that the longer bridges are, at the same time, the thicker [28, 31, 32, 38]. The greatest average thickness (median) had the bridges located above the RIA (1.36 mm), and the two longest bridges were also located above that branch, so that it was to be expected that they had the greatest MI. Yet, the discrepancy of the average value (median) of MI, which reflects the contractile force of the myocardial bridge [31,38] between the group of bridges located above the RIA and the group of bridges above other branches is not statistically significant. This fact supports the earlier reports that also myocardial bridges above other branches can cause serious reduction of the lumen and disorder of the hemodynamics leading to serious clinical manifestations of the coronary insufficiency [38-42]. We must underline once again that our results are obtained on a limited human sample and that we did not have the data on a possible history of coronary disease in relation to the persons whose hearts were used in our research, so that the research into the clinically important morphological characteristics of myocardial bridges should continue. Bridge fibres passed most frequently over the crossed blood vessel at the angle of 90 degrees, while a very small angle (10 degrees) was present between the axis of the myocardial fibres and other axis of the crossed blood vessel in bridges located above Rms and Rmd. These findings are in accordance with findings reported by Kosinski [38] and Baptist [43]. Ferreira [37] reports that in the deep type of bridges the RIA is located deeper in the sulcus interventricularis anterior and then it flows toward the right ventricle where it is covered, i.e. surrounded, by bundles of the apical trabecula directed crosswise, aslant and spirally in respect to the descending blood vessel. The author thinks that such a flow and relation of the bridge muscle bundles with the tunnel segment is the main cause of a strong compression and reduction of both systolic and diastolic flow [37]. Besides, the impact of the myocardial bridge on the blood flow depends also on the very structure of the bridge, namely the presence of the connective and fatty tissue [1,30], as well

as on the distance of bridge fibres from the adventitia of the crossed blood vessel; all this points towards the need to analyse the myocardial bridges on the ultrasonic level what will probably be the subject of our further research.

## CONCLUSION

The results obtained on a limited sample suggest that the muscular index of myocardial bridge is the highest for bridges located on RIA, but that the difference is not significant in relation to bridges located on other branches. The results obtained suggest that bridges located on other branches, not only those on RIA, could have a great contractive power and, consequently, a great compressive force, which would be exerted on the wall of a crossed blood vessel.

## DECLARATION OF INTEREST

There is no conflict of interest to declare.

## REFERENCES

- [1] Angelini P, Trivellato M, Donis J, Leachman RD. Myocardial bridges: a review. *Prog Cardiovasc Dis.* 1983;26(1):75-88.
- [2] Reyman HC. *Dissertatio de vasis cordis propriis.* Haller, Bibl Anat. 1737; 2: 366
- [3] Porstmann W, Iwig J. Intramural coronary vessels in the angiogram. *Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed.* 1960;92:129-133.
- [4] Loukas M, Curry B, Bowers M, Louis RG Jr, Bartczak A, Kiedrowski M. et al. The relationship of myocardial bridges to coronary artery dominance in the adult human heart. *J Anat.* 2006;209(1):43-50.
- [5] Hadžiselimović H. *Krvni sudovi srca.* Jugoslovenska medicinska naklada, Zagreb, 1981.
- [6] Vaishaly KB, Vasanti A. The Study of Myocardial Bridges. *J. Anat. Soc. India.* 2008; 57(1):14-21.
- [7] Polaček P, Kralovec H. Relation of myocardial bridges and loops on the coronary arteries to coronary occlusions. *Am Heart J.* 1961; 61: 44-52.
- [8] Zeina AR, Odeh M, Blinder J, Rosenschein U, Barmeir E. Myocardial bridge: evaluation on MDCT. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;188(4):1069-1073.
- [9] Wang MH, Sun AJ, Qian JY, Ling QZ, Zeng MS, Ge L. et al. Myocardial bridging detection by non-invasive multislice spiral computed tomography: comparison with intravascular ultrasound. *Chin Med J (Engl).* 2008;121(1):17-21.
- [10] Konen E, Goitein O, Sternik L, Eshet Y, Shemesh J, Di Segni E. The prevalence and anatomical patterns of intramuscular coronary arteries: a coronary computed tomography angiographic study. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(5):587-593.
- [11] Juilliere Y, Berder V, Suty-Selton C, Buffet P, Danchin N, Cherrier F. Isolated myocardial bridges with angiographic milking of the left anterior descending coronary artery: a long-term follow-up study. *Am Heart J.* 1995; 129(4): 663-665.
- [12] Rossi L, Dander B, Nidasio GP, Arbustini E, Paris B, Vassanelli C. et al. Myocardial bridges and ischemic heart disease. *Eur Heart J.* 1980;1(4):239-245.
- [13] Kramer JR, Kitazume H, Proudfit WL, Sones FM. Clinical significance of isolated coronary bridges: benign and frequent condition involving the left anterior descending artery. *Am Heart J.* 1982; 103(2): 283-288.
- [14] den Dulk K, Brugada P, Braat S, Hedde B, Wellens HJ. Myocardial bridging as a cause of paroxysmal atrioventricular block. *J Am Coll Cardiol.* 1983;1(3):965-969.
- [15] Endo M, Lee YW, Hayashi H, Wada J. Angiographic evidence of myocardial squeezing accompanying tachyarrhythmia as a possible cause of myocardial infarction. *Chest.* 1978;73(3):431-433.
- [16] Faruqui AM, Maloy WC, Felner JM, Schlant RC, Logan WD, Symbas P. Symptomatic myocardial bridging of coronary artery. *Am J Cardiol.* 1978;41(7):1305-1310.
- [17] Kalaria VG, Koradia N, Breall JA. Myocardial bridge: a clinical review. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2002;57(4):552-556.
- [18] Yukio I, Yoko K, Ehiichi K, Toshiharu I. Coronary events caused by myocardial bridge. *Ann Vasc Dis* 2009; 2(2): 79-94.
- [19] Tsujita K, Maehara A, Mintz G.S., Doi H, Kubo T, Castellanos C. et al. Impact of myocardial bridge on clinical outcome after coronary stent placement. *Am J Cardiol* 2009; 103(10): 1344-1348.
- [20] Pradeep GN, Peter N, Lakshmi V, Mullasari A. Myocardial infarction to myocardial bridging. *Indian Heart J.* 2002; 54:711-712.
- [21] Yano K, Yoshino H, Taniuchi M, Kachi E, Shimizu H, Watanuki A. et al. Myocardial bridging of the left anterior descending coronary artery in acute inferior wall myocardial infarction. *Clin Cardiol.* 2001; 24(3): 202-208.
- [22] Zeina AR, Shefer A, Sharif D, Rosenschein U, Barmeir E. Acute myocardial infarction in a young woman with normal coronary arteries and myocardial bridging. *Br J Radiol* 2008; 81(965):e141-144.
- [23] Maron BJ, Shirani J, Poliac L.C, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO. Sudden death in young competitive athletes: Clinical, demographic, and pathological profiles. *JAMA* 1996; 276(3):199-204.
- [24] Futterman LG, Myerburg R. Sudden death in athletes: an update. *Sports Med.* 1998; 26(5):335-350.
- [25] Ge J, Erbel R, Rupprecht HJ, Koch L, Kearney P, Gorge G. et al. Comparison of intravascular ultrasound and angiography in the assessment of myocardial bridging. *Circulation.* 1994; 89(4):1725-1732.
- [26] Klues HG, Schwarz ER, vom Dahl J, Reffelmann T, Reul H, Potthast K, et al. Disturbed intracoronary hemodynamics in myocardial bridging: Early normalization by intracoronary stent placement. *Circulation* 1997; 96(9): 2905-2913.
- [27] Schwarz ER, Klues HG, vom Dahl J, Klein I, Krebs W, Hanrath P. Functional characteristics of myocardial bridging. A combined angiographic and intracoronary Doppler flow study. *Eur Heart J* 1997;18(3):434-442.
- [28] Ishii T, Hosoda Y, Osaka T, Imai T, Shimada H, Takami A. et al. The significance of myocardial bridge upon atherosclerosis in the left anterior descending coronary artery. *J Pathol.* 1986; 148(4): 279-291.
- [29] Masuda T, Ishikawa Y, Akasaka Y, Itoh K, Kiguchi H, Ishii T. The effect of myocardial bridging of the coronary artery on vasoactive agents and atherosclerosis localization. *J Pathol.* 2001; 193(3): 408-414.
- [30] Möhlenkamp S, Hort W, Ge J, Erbel R. Update on myocardial bridging. *Circulation* 2002; 106(20): 2616-2622.
- [31] Ishikawa Y, Kawawa Y, Kohda E, Shimada K, Ishii T. Significance of the Anatomical Properties of a Myocardial Bridge in Coronary Heart Disease. *Circ J* 2011; 75(7): 1559-1566.
- [32] Ishikawa Y, Akasaka Y, Ito K, Akishima Y, Kimura M, Kiguchi H. et al. Significance of anatomical properties of myocardial bridge on atherosclerosis evolution in the left anterior descending coronary artery. *Atherosclerosis* 2006; 186(2): 380-389.
- [33] Morales A, Romanelli R, Tate LG, Boucek RJ, de Marchena E. Intramural LAD: significance of depth of the muscular tunnel. *Hum Pathol* 1993; 24(7): 693-701
- [34] Elmali M, Soyulu K, Gulel O, Bayrak IK, Koprulu D, Diren HB. et al. Correlation between depth of myocardial bridging and coronary angiography findings. *Acta Radiol* 2008;49(8): 883-888.
- [35] Acuña LE, Aristeguieta LM, Tellez SB. Morphological description and clinical implications of myocardial bridges: an anatomical study in Colombians. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 92(4):256-262.
- [36] Kosiński A, Grzybiak M. Myocardial bridges in the human heart: morphological aspects. *Folia Morphol (Warsz).* 2001;60(1):65-68.

- [37] Ferreira AG Jr, Trotter SE, König B Jr, Décourt LV, Fox K, Olsen EG. Myocardial bridges: morphological and functional aspects. *Br Heart J* 1991;66(5):364-367.
- [38] Takamura K, Fujimoto S, Nanjo S, Nakanishi R, Hisatake S, Namiki A. et al. Anatomical characteristics of myocardial bridge in patients with myocardial infarction by multi-detector computed tomography. *Circ J*. 2011;75(3):642-648.
- [39] Okmen E, Oguz E, Erdinler I, Sanli A, Cam N. Left circumflex coronary artery bridging. *Jpn Heart J* 2002; 43(4): 423-427.
- [40] Woldow AB, Goldstein S, Yazdanfar S. Angiographic evidence of right coronary bridging. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 1994;32(4): 351-353.
- [41] Arjomand H, AlSalman J, Azain J, Amin D. Myocardial bridging of left circumflex coronary artery associated with acute myocardial infarction. *J Invasive Cardiol.* 2000;12(8):431-434.
- [42] Garg S, Brodison A, Chauhan A. Occlusive systolic bridging of circumflex artery. *Catheter Cardiovasc Interv* 2000; 51(4): 477-478.
- [43] Baptista CA, DiDio LJ. The relationship between the directions of myocardial bridges and of the branches of the coronary arteries in the human heart. *Surg Radiol Anat.* 1992;14(2):137-140.

DOI: 10.5455/medarh.2012.66.s30-s32

Med Arh. 2012 Jun; 66(3, suppl 1): 30-32

Received: April 15th 2012

Accepted: May 22nd 2012

CONFLICT OF INTEREST: NONE DECLARED

ORIGINAL PAPER

# Importance of Quick Test for Screening of Former Drug Users

Refet Gojak<sup>1</sup>, Merdina Ferhatovic<sup>1</sup>, Nermina Bajramovic<sup>1</sup>, Amir Hadzic<sup>1</sup>, Belma Gazibera<sup>1</sup>, Dragic Bankovic<sup>2</sup>Clinic for Infectious Diseases, Clinical Center of University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina<sup>1</sup>Institute of Mathematics and Informatics, Faculty of Science, University of Kragujevac, Serbia<sup>2</sup>

**Introduction:** Most frequent mode of transmission of HCV today is with intravenous drug use. Former intravenous (IV) drug users present population group more exposed to HCV infection. Longer period of substance abuse, common syringe, more sexual partners (drug users) represent independent, statistically significant risk factors in this population. Diagnosis of HCV infection is based on history, epidemiological data, and clinical presentation, blood tests, histopathological and virology investigation. Hepagnost C is fast immunochromatography test for qualitative detection of HCV antibodies in blood, serum or plasma. Sensitivity of this test compared to EIA is >99% and relative specificity 98,6%. **Material and methods:** At Clinic for Infectious diseases (Hepatology Department) voluntary testing with Hepagnost C test was done for 22 former drug users. Results of this cross-sectional study are processed with SPSS program for Windows. **Results:** Most of the subjects were male (95,5%), average age of  $33 \pm 3,5$  years with average length of drug usage of 10 (7-12,5) years. All positive (9/22) were tested with EIA test and HCV infection was confirmed (9/9), therefore positive predictive value for Hepagnost C is 100%. We investigated relative risk (RR) with IV drug usage. Higher risk for infection (1,7 times) was among IV. drug users. Odds ratio was 2,4 (chance for HCV in iv. drug users group is 2,4 times higher). Common syringes increase relative risk for 4,5 times, and Odds ratio for infection 9 times. **Conclusions:** Hepagnost C test of high sensitivity and specificity showed 100% prediction. It is simple, inexpensive and comfortable test with results within 15 minutes. Demographic characteristics of tested persons as well as statistical results do not deviate significantly from results in available literature. **Key words:** Hepagnost C, drug users, HCV, IVDU.

Corresponding author: Refet Gojak, MD. Clinic for Infectious Diseases, Clinical Center of University of Sarajevo, Bosnia Herzegovina. Phone: +387 33 298 112. E-mail: [refetmd@gmail.com](mailto:refetmd@gmail.com).

## 1. INTRODUCTION

Hepatitis C is a viral infection of the liver caused by hepatitis C virus (HCV). HCV infection is asymptomatic in most patients, and it is difficult to recognize, and acute hepatitis C occurs mainly in the anicteric form (1). Source of HCV infection is always a man with acute or chronic HCV infection. HCV is most

frequently transmitted by intravenous (iv.) drug use, use of blood and blood products and organ transplants (2). Ways of transferring to a large extent are determined by the risk groups exposed to HCV infection. Longer intravenous addiction, common syringes in prisons, was independent statistically significant factors in a group of 405 iv. drug

users (3). HCV prevalence varies within different countries, regions and among different population groups within the region. It is considered that there are 40 000 infected patients in Bosnia and Herzegovina. Hepatitis C exists is diagnosed and treated (4). There is a high risk of disease among users of intravenous drugs because they use a common syringe and the needle as well. Also drug addicts who take drugs by sniffing powder can transmit the virus through shared straws, if the mucosa is damaged and stained with blood that contains a large number of HCV-RNA copies (4). It is believed that for every registered addict, another seven unregistered addicts exists. This phenomenon occurs among other because of vulnerability of population of drug addicts and fear of stigmatization environment (6). A good model for approach to treatment and rehabilitation of people with addiction problems are therapeutic communities. There the clients take distinctive roles and adhere to clear rules designed to encourage the transition process of their recovery (7). The task of the therapeutic community is to maintain motivation that is a prerequisite for successful treatment (8). The diagnosis of HCV infection is based on history, epidemiological surveys, clinical, haematological, biochemical, histopathological and virological findings (3). One of the reliable rapid tests is immunochromatography test for detec-

		Fre- quency	Per- cent
Sex	male	21	95.5
	female	1	4.5
Employed	no	13	59.1
	yes	9	40.9
Promiscuity	no	19	86.4
	yes	3	13.6
Method of drug application	IVDU	18	81.8
	otherwise	4	18.2
Common equipment (syringes, needles)	no	8	36.4
	yes	14	63.6
Hepagnot C-test	no	13	59.1
	yes	9	40.9

Table 1. Demographic characteristics of patients

tion qualitative antibodies to HCV in blood, serum or plasma. The test area of the membrane is covered with recombinant HCV antigen. Sensitivity of this test compared to the EIA is > 99% and relative specificity of 98.6% (5).

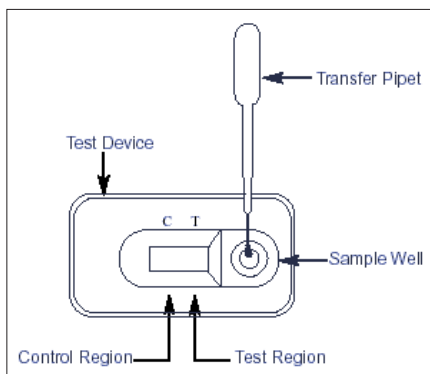


Figure 1. Use of test plates

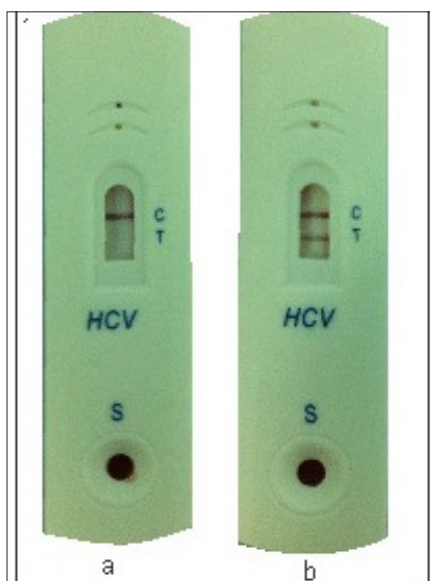


Figure 2. HepaGnost C test results (a=negative; b=positive)

## 2. MATERIAL AND METHODS

At the Clinic for Infectious Diseases, Clinical Center of Sarajevo University we tested 22 subjects. Subjects were volunteers from one of the therapeutic communities in the Canton of Sarajevo. All are former longtime drug abusers. In addition to basic history/epidemiological data, testing with HepaGnost C Rapid Test (Laboratory Equipment Manufacturer, Zagreb, HR) was performed. The procedure implies that 1-2 drops of blood, serum or plasma is instilled in circular hole. For the analysis of whole blood 1 drop of buffer should be added and wait for 10-15 minutes (Figure 1).

## 3. RESULTS

Results are presented by tables and diagrams. A negative test result: only the presence of control (C) lines is noted Figure 2 (a). A positive test result: the presence of control (C) and test (T) line is noted, Figure 2(b). Invalid test result: control (C) line is missing.

Males constituted the majority (95.5%) of the sample. Employment in this community is less than half (40.9%). Three patients (13.6%) cited promiscuity as a risk factor, of which one was HCV positive. The number of iv users is predominant (81.8%) and 63.6% of them used a common syringes. HepaGnost C rapid test was positive in 40.9% of respondents. In all positive samples, we performed the EIA test, and it was positive (9/9), therefore the positive predictive value of test is 100% EIA tests.

Our sample showed that differences in average age of length of addiction among HCV positive and HCV negative are not statistically significant  $p=0,168$ .

Prevalence of HCV infection in group of iv. users 8/18 (44%), while in the other route of administration is 1/4 (25%).

HCV infection	During drug use				test	
	Mean	S.D.	Min.	Max.	t test	p
No	9,1	3,76	3,00	16,00	1,47	0,168
Yes	11,3	3,1	7,00	17,00		

Table 2. Impact of duration of drug use on HCV infection

HCV infection		Method of drug application		Total
		IVDU	otherwise	
HCV infection	Yes	8	1	13
	No	10	3	9
Total		18	4	22

Table 3. Crosstab of HCV infection and route of narcotic administration

HCV infection		Common equipment (syringes, needles)		Total
		yes	no	
HCV infection	Yes	8	1	9
	No	6	7	13
Total		14	8	22

Table 4. Crosstab of HCV infection and common utensils (syringes, needles)

Relative risk for disease is quotient of probability that examinee from group of exposed (iv. users) has disease and probability that examinee from group of unexposed (other route of administration) has disease,  $RR=1,76$ . Relative risk indicates higher possibility of disease depending on exposure (metod of application). Odds ratio for disease represents quotient of two chances: chance to have disease in exposed group and chance to have disease

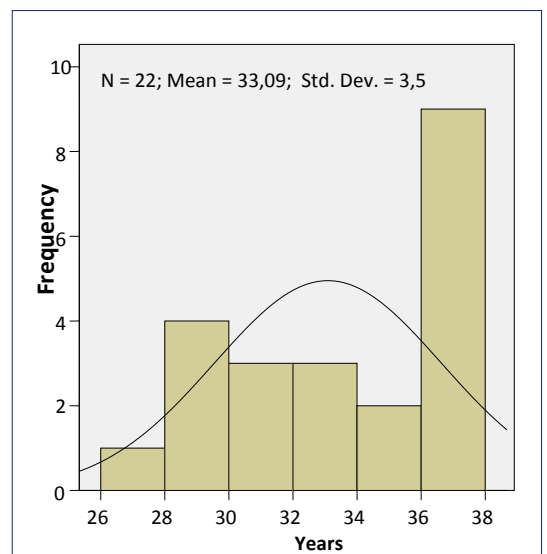


Diagram 1. Age structure of examinees,  $M=33,09 \pm 3,5$  years. Largest number of examinees was between 36 and 38 years.

in unexposed group OR=2,4.

By using common utensils for drug application OR=4,07, a RR (Relative risk)= 9,3.

#### 4. DISCUSSION

According to the UNICEF survey (UNICEF Bosnia and Herzegovina, 2007), among drug users in 2007 conducted in Sarajevo, Banja Luka and Zenica (n=780), about 95% of injecting drug users injected heroin in the previous month (9), in our sample 82% of the examinees were iv. users. Most were in group between 25-34 years (9) whereas in our study, the average age was  $33 \pm 3.5$  years. Males accounted for 90% of the tested sample (9) in our sample is 95.5%. Approximately 80% of the examinees were unemployed (9), while this percentage in our sample was 60%. A third of injecting drug users said that they shared syringes and utensils with other intravenous drug users (9), while in our sample 14/22 (68%) examinees shared utensils. In study Chang et al. (10) conducted with 899 patients, prevalence of anti-HCV positive was 67.2% among intravenous drug users (IVDU), in our study prevalence is 44%. In the same study among non-intravenous drug users (non-IVDU), these authors found the prevalence of HCV 14.7%, in our study prevalence is 25%. In Bosnia and Herzegovina prevalence of HCV in this subgroup is between 35 and 40% (1, 4).

Our study showed no statistically

significant difference ( $p=0.168$ ) in the length of drug dependency among HCV positive and HCV-negative drug abusers, which is in agreement with results of Chang et al. (10).

There is a high risk of disease among IVDU, because often the same syringes and needles are shared (4). Among IVDU, the sharing of needles, syringes and/or other accessories associated with the narcotics appear to pose the greatest risk of HCV infection, which gives the odds ratio (OR) of 4.84 (95% CI 1.88 to 12.43 ) (11). OR for HCV in group of iv. drug users in our study were 2.4 while the same increased to 4.07 in iv. drug users who use shared equipment (syringes, needles). HepaGnostC rapid test showed a high accuracy in comparison with EIA tests (5). In our study positive predictive value (PPV) was 9/9 (100%).

#### 5. CONCLUSION

Due to high rates of HCV infection among drug addicts, the investigation of risky behaviour should be routine in such a group. HepaGnost C test is a reliable, simple, cheap and comfortable, with a result within 15 minutes. Testing (with survey) can be performed on remote locations, with very little cost.

#### REFERENCES

1. Krkić-Dautović S. Virusni hepatitis. In: Krkić-Dautović S, editor. Infektologija. Sarajevo-Tuzla; Medicinski fakultet Sarajevo, Asocijacija infektologa u BIH. 2011: 291-313.

2. Nikolić P. Epidemiologija HCV infekcije. In: Delić D, Nikolić P, Božić M, editors. Virusni hepatitis. Beograd; Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1998: 153-161.
3. Stark K, Scherier E. Prevalence of Determinants of Anti HCV Seropositivity and of HCV Genotype among Intravenous Drug Users in Berlin, Scand J Infect Dis. 1995; 27: 331-337.
4. Hronični virusni hepatitis-perzistencija virusa, prevalenca i prenošenje. In: Zora Vukobrat-Bijedić, editor. Virusni hepatitis dijagnostika, terapija i komplikacije. Sarajevo; TKD Šahinpašić, 2008: 7-22.
5. Pharmamaac.org [homepage on the Internet]. Sarajevo. Pharma Maac d.o.o. [Copyright 2007 Pharmamac; cited 2011 Jun 8]. Available from: <http://www.pharmamaac.com/HepaGnost-C.282.0.html>
6. Dedajić N. Socijalni rad sa ovisnicima o drogi. Tuzla, Offset, 2010.
7. Gary F, Nancy R. Encyclopedia of substance abuse prevention, treatment, and recovery. Oaks, California; Sage Publications, 2009.
8. De Leon G, Sacks S, Staines G, McKendrick K. Modified therapeutic community for homeless mentally ill chemical abusers: Treatment outcomes. American Journal of Drug and Alcohol Abuse. 2000; 26 (3): 461-480.
9. Šarić H. Socijalni rad sa ovisnicima, Tuzla, 2010.
10. Chang CJ, Lin CH, Lee CT, Chang SJ, Ko YC, Liu HW. Hepatitis C virus infection among short-term intravenous drug users in southern Taiwan. 1999; 15(7): 597-601.
11. Hansurabhanon T, Jiraphongsa C, Tun-sakun P, Sukbunsung R, Bunyamanee B, Kuirat P. et al. Infection with hepatitis C virus among intravenous-drug users: prevalence, genotypes and risk-factor-associated behaviour patterns in Thailand. Ann Trop Med Parasitol. 2002; 96(6): 615-625.