

UNIVERZITET U NOVOM SADU

Medicinski fakultet

Doktorske studije



**MULTIVOKSELSKA MAGNETNO-REZONANTNA  
SPEKTROSKOPIJA MOZGA KOD HIV+ PACIJENATA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori: prof. dr Duško Kozić

Kandidat: dr Jasmina Boban

prof. dr. Vesna Turkulov

Novi Sad, 2016. godine.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jasmina Boban
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr.sc.med. Duško Kozić, redovni profesor Dr.sc.med. Vesna Turkulov, redovni profesor
Naslov rada: NR	Multivokselna magnetno-rezonantna spektroskopija mozga kod HIV+ pacijenata
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija

Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(8 poglavlja/ 141 stranica/ 21 slika/ 25 grafikona / 193 reference/ 1 prilog)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Radiologija Infektivne bolesti
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	magnetno-rezonantna spektroskopija; HIV; demencijski kompleks kod AIDS-a; neurodegenerativne bolesti; antiretroviralna terapija
UDK	616.83-003.8-073.75 616.988:578.828]:616.8
Čuva se: ČU	U Biblioteci Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	

<p>Izvod:</p> <p>IZ</p>	<p>UVOD: Neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV infekcijom (HIV associated neurocognitive disorder- HAND) javlja se u oko polovine pacijenata sa HIV-om. HAND obuhvata spektar neuroloških poremećaja koji variraju od asimptomatskog neurokognitivnog poremećaja(ANI), preko blagog kognitivnog oštećenja, koje se naziva blagi kognitivni poremećaj (MND) do demencije udružene sa HIV-om (HAD). U evaluaciji i dijagnostici ovog poremećaja koriste se razne laboratorijske, kliničke i metode imidžinga, među kojima magnetno-rezonantni imidžing (MRI) zauzima posebno mesto u pogledu dijagnostike strukturnih poremećaja. Međutim, za dijagnostiku suptilnih supcelularnih neurobiohemijskih poremećaja neophodno je korišćenje magnetno-rezonantne spektroskopije (MRS). Klasično shvatanje promena u neurobiohemijskom profilu kod pacijenata sa HIV infekcijom uključuje: sniženje NAA (neuronskog markera) kao odraz neurodegeneracije, povišenje Cho (markera razgradnje membrana) kao odraz inflamacije/apoptoze, povišenje mI (markera proliferacije mikroglije) kao odraz inflamacije i povišenje Glx+Gln (markera glutaminične ravnoteže) kao odraz ekscitotoksičnosti. Do sada u literaturi nije opisano korišćenje multivokselne MRS mozga na HIV+ pacijentima.</p> <p>CILJEVI: Ciljevi studije su bili: utvrditi da li postoje promene u odnosima koncentracija metabolita u mozgu dobijenih metodom multivokselne MRS u neurološki asimptomatskih HIV+ pacijenata u poređenju sa zdravim kontrolnim ispitanicima, zatim da li postoje razlike između pacijenata na kombinovanoj antiretroviralnoj terapiji (cART) i pacijenata bez cART; utvrditi da li postoji i kakva je povezanost odnosa metabolita dobijenih MRS sa imunološkim parametrima HIV+ pacijenata i nivoom nadir CD4+ T-limfocita; i konačno, utvrditi da li postoji i kakva je povezanost dobijenih odnosa metabolita sa parametrima penetracije antiretroviralne terapije u centralni nervni sistem.</p> <p>ISPITANICI I METODE: U studiju je uključeno ukupno 114 ispitanika (32 HIV+ pacijenta na cART, prosečne starosti 41.97 godina (25-61); 28 HIV+ pacijenata bez cART, prosečne starosti 35.21 godina (24-52); 50 kontrolnih, zdravih subjekata prosečne starosti 36.56.godina (19-53)). Svi ispitanici su potpisali informisani pristanak za učešće u studiji. Ispitivanje je odobreno od strane Etičke komisije Instituta za onkologiju Vojvodine,</p>
-------------------------	---

kao i Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Kriterijum za uključenje pacijenata u studiju je bio prisustvo HIV infekcije. Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije su bili: prisustvo aktivne oportunističke infekcije, prisustvo aktivnog neurološkog oboljenja, podatak o aktivnoj zloupotrebi narkotika, koinfekcija virusom hepatitisa B i C, prisustvo lezija bele ili sive mase i kontraindikacije za snimanje na aparatu za magnetnu rezonancu. 4 ispitanika su isključena iz ispitivanja. Svim ispitanicima urađeni su skrining neurokognitivni testovi, kao i rutinska laboratorijska ispitivanja (broj CD4+, CD3+ i CD8+ limfocita). Nakon toga, svim ispitanicima urađen je konvencionalni MRI praćen multivokselnom MRS supratentorijalne suprakalozalne bele mase. Ispitivano je ukupno 12 vokseli (6 u sivoj i 6 u beloj masi), odnosno preko 7900 spektara. Određeni su pikovi karakterističnih metabolita. Na metodi dugog eha analizirana su tri glavna pika: NAA na 2.0ppm, Cho na 3.2ppm i tCr na 3.ppm, izražena preko odnosa koncentracija NAA/Cr i Cho/Cr. Na metodi kratkog eha analizirani su signali NAA, Cho, Cr te mI na 3.5ppm i Glx+Gln na 2.2-2.4ppm. Ovi signali su izraženi kroz odnose koncentracija NAA/Cr, Cho/Cr, mI/Cr i (Glx+Gln)/Cr. Za statističku obradu podataka korišćen je IBM SPSS ver. 21.0.

Deskriptivna statistika je uključila određivanje srednje vrednosti, minimuma, maksimuma i standardne devijacije. Razlike između posmatranih grupa ispitanika za sve kontinuirane varijable ispitivane su jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa naknadnim (post-hoc) testovima za koje je korišćena metoda po Tukey-ju. Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti, standardne devijacije, najviše i najniže izmerene vrednosti (maksimum i minimum), i za svaki ispitivani parametar pridružena je vrednost F i p. Veza između kontinuiranih varijabli je ispitivana pomoću koeficijenta Pirsonove linearne korelacije, uz prethodnu proveru zadovoljavanja uslova o homogenosti varijansi, normalnosti raspodele i linearnosti. Vrednosti  $p < 0.05$  su uzimane kao statistički značajne.

**REZULTATI:** Pokazano je da su HIV+ pacijenti na cART značajno stariji od druge dve grupe ispitanika. Nije pokazana značajna razlika u stepenu obrazovanja među grupama. Pokazano je da godine života statistički značajno utiču samo na koncentracije NAA/Cr, dok na odnose drugih metabolita ne utiču značajno. Utvrđeno je statistički značajno sniženje ( $p < 0.05$ ) koncentracija NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri grupe ispitanika na svim posmatranim vokselima. Naknadnim analizama utvrđena je statistički

značajna razlika na 10/12 voksela između HIV+ pacijenata sa cART i zdravih, kao i između HIV+ pacijenata bez terapije i zdravih, dok su se koncentracije NAA/Cr značajno razlikovale između HIV+ pacijenata sa i bez cART samo na jednom vokselu (duboka frontalna bela masa levo). Utvrđena je statistički značajna razlika u smislu sniženja Cho/Cr odnosa dobijenih metodom dugog eha u 5/12 voksela, sa pojedinačnim vokselima koji su prikazivali razlike između grupa. Na metodi kratkog eha utvrđeno je značajno sniženje odnosa koncentracija NAA/Cr kod HIV+ pacijenata samo na tri voksela, pri čemu nisu prikazane značajne razlike između dve grupe pacijenata sa HIV infekcijom (sa i bez cART). Rezultati odnosa koncentracija Cho/Cr između tri grupe pacijenata dobijeni metodom kratkog eha slični su rezultatima dobijenim na metodi dugog eha (statistički značajna razlika dobijena je na 5/12 voksela). Što se tiče odnosa koncentracija ml/Cr, uočeno je značajno povišenje ovog odnosa kod HIV+ pacijenata u odnosu na zdrave na 6/12 voksela. Prikazano je statistički značajno povišenje ovog markera kod pacijenata bez cART u odnosu na pacijente sa cART samo u regiji levog dorzalnog anteriornog cinguluma. Statistički značajno povišenje (Glx+Gln)/Cr odnosa je prikazano u regiji zadnjeg cinguluma desno kod pacijenata na terapiji u odnosu na pacijente bez terapije, dok na drugim vokselima nije prikazana značajna razlika. Vokseli 4, 7 i 10 su dali najviše informacija (supkortikalna bela masa frontalno levo, dorzalni prednji cingulum levo te parijetalni supkorteks leve cerebralne hemisfere), sa prikazanim značajnim razlikama u bar 4 odnosa metabolita. Prikazana je značajna pozitivna korelacija nadir CD4 + broja limfocita sa koncentracijama NAA/Cr, a negativna sa odnosima Cho/Cr i ml/Cr, što čini nadir CD4+ najboljim serološkim prediktorom neurodegenerativnog oštećenja. Pokazana je pozitivna korelacija indeksa penetracije lekova u monocite (ME) sa odnosima NAA/Cr i negativna korelacija indeksa penetracije lekova u centralni nervni sistem (CPE) sa Cho/Cr i ml/Cr. Došli smo do zaključka da je ME indeks bolji marker neurodegenerativnog odgovora a CPE indeks bolji u monitoringu kontrole inflamacije.

**ZAKLJUČAK:** Smatra se da HIV virus uzrokuje pre rano starenje mozga što je prvenstveno posledica direktnog oštećenja nervnih ć elija samim virusom (preko viralnih proteina, indukovanih citokina i hemokina). Pokazali smo da su neuronski gubitak i neurodegeneracija proces koji zahvata celokupan volumen mozga, dok su procesi

	<p>inflamacije i proliferacije mikroglije svedeni na tačno određene regione, pretežno sive mase. Visoka senzitivnost multivokselske <sup>1</sup>H-MRS sa korišćenjem senzitivnih površinskih kalemova omogućava mapiranje metabolita sa prostornom rezolucijom. MRS može dati ključni uvid u promene koncentracija metabolita mozga tokom razvoja infekcije od akutne i primarne do hronične. Vrlo brzo nakon serokonverzije, dolazi do detektabilnih promena u metabolitima mozga u smislu neuronskog oštećenja i inflamacije. U našem istraživanju su po prvi put analizirani rezultati protonske multivokselske MRS bele i sive mase velikog mozga u suprakalozalnom regionu. Utvrđeno je da postoje difuzne, ali ipak visoko regionalno-zavisne promene u odnosima neurometabolita kod pacijenata koji dobijaju antiretroviralnu terapiju i kod pacijenata koji je ne dobijaju, u poređenju sa zdravim kontrolnim ispitanicima (odgovarajućim po polu i starosti). Dodatne studije sa posmatranjem apsolutnih koncentracija neurometabolita, kao i longitudinalne studije u koje su uključeni HIV+ pacijenti u različitim fazama bolesti, su neophodne za dalje i bolje razumevanje neuropatogeneze HAND-a. MRS se pokazala uspešnom u detekciji efikasnosti određenih terapijskih opcija. Dva postojeća indeksa za procenu efikasnosti antiretroviralne terapije (CPE, ME) odvojeno pogađaju dva puta neuropatogeneze kognitivnog poremećaja, sa različitim uspehom u sveobuhvatnoj proceni efekta i efikasnosti terapije. U budućnosti je potrebna njihova pojedinačna modulacija ili kreiranje jedinstvenog indeksa, koji bi obuhvatio i efikasnost prolaza leka kroz hematoencefalnu barijeru i dejstvo na latentni rezervoar HIV-a u ćelijama monocitno-makrofagne loze.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata:  DP	12.07.2016.
Datum odbrane:  DO	

<p>Članovi komisije:</p> <p>(ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status)</p> <p>KO</p>	<p>predsednik:</p> <p>član:</p> <p>član:</p>
---	--



# University of Novi Sad

## Faculty

### Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Jasmina Boban
Mentor: MN	Dusko Kozic, M.D., Ph.D. Professor Vesna Turkulov, M.D., Ph.D., Professor
Title: TI	Multivoxel magnetic resonance spectroscopy of the brain in HIV+ patients
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication:	Vojvodina

LP	
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21 000 Novi Sad

Physical description: PD	(number of chapters 8/ pages 141/ figures 21/ graphs 25/ citations 193/ supplement 1)
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Radiology Infectious diseases
Subject, Key words SKW	Magnetic Resonance Spectroscopy; HIV; AIDS Dementia Complex; Neurodegenerative Diseases; Antiretroviral Therapy
UC	616.83-003.8-073.75 616.988:578.828]:616.8
Holding data: HD	Library of Medical Faculty, University of Novi Sad
Note:	

N	
<p>Abstract:</p> <p>AB</p>	<p><b>INTRODUCTION:</b>  HIV associated neurocognitive disorder- HAND appears in about half of the HIV+ patients. HAND represents a spectrum of neurological disorders varying from asymptomatic neurocognitive impairment (ANI), over mild neurocognitive disorder (MND) to HIV associated dementia (HAD). For evaluation and diagnostics of this disorder, many laboratory, clinical and imaging methods are used, first of all magnetic resonance imaging (MRI). Nevertheless, for detecting subtle subcellular neurobiochemical disorders, the use of magnetic resonance spectroscopy (MRS) is necessary. Classical pattern of neurobiochemical changes in HIV infection consist of: decrease in NAA (neuronal marker) depicting neurodegeneration, increase in Cho (metabolism on membrane marker) depicting inflammation/ apoptosis, increase in mI (marker of microglial proliferation) depicting inflammation and increase in Glx+Gln (glutaminergic balance marker) depicting the effect of excytotoxicity. To the best of our knowledge, this is the first study using multivoxel MRS of the brain in HIV+ patients.</p> <p><b>AIMS:</b> The aims of this study were: to show whether there are differences in metabolites' ratios on multivoxel MRS in neurologically asymptomatic HIV+ patients compared to control subjects; whether there are differences in metabolites' ratios between patients on combined antiretroviral therapy (cART) and therapy-naive ones; whether there are correlations between matebolites' ratios and immunological parameters in HIV+ patients as well as with nadir CD4+ count; whether there are correlations between metabolites' ratios with parameters of drugs' penetration in central nervous system (CNS).</p> <p><b>SUBJECTS AND METHODS:</b> Overall of 114 subjects were enrolled in the study (32 HIV+ paients on cART, average age 41.97 years (25-61); 28 HIV+ patients off cART, average age 35.21 years (24-52); 50 control subjects, average age 36.56 years (19-53)). All the subjects signed the informed consent. The study was ethically approved by Ethical committee of Vojvodina Oncology Institute and Ethical committee of Faculty of Medicine, University of Novi Sad. Inclusion criteria for HIV+ subjects were: the presence of HIV infection. Exclusion criteria included: active opportunistic infection, active neurological illness, usage of drugs of abuse, hepatitis B or C coinfection, presence of both white or grey matter</p>

lesions, and contraindications that apply for magnetic resonance (MR) examination. 4 subjects were excluded from the study due to the presence of white matter lesions (3 HIV+ and one control subject). Each patient performed International HIV Dementia Scale (IHDS), a screening test for evaluation of global cognitive status in HIV-infected patients. Baseline study laboratory variables were assessed (CD4+ T-lymphocyte count and plasma HIV RNA, nadir CD4+ counts and CD4+ T-cell counts at the moment of MR scan. Conventional MRI scan was followed by multivoxel MRS with both long and short echo. We analyzed 12 voxels (6 in grey and 6 in white matter) with overall of over 7900 spectra. Finally, we analyzed following dominant signals: on the long echo tCr (creatine plus phosphocreatine) at 3.0 ppm, NAA (N-acetyl-aspartate) at 2.0 ppm and Cho (choline containing compounds) at 3.2ppm (ratios of NAA/Cr and Cho/Cr were assessed); on the short echo tCr, NAA, Cho, (Glx+Gln) at 2.2-2.4ppm and mI (myoinositol) at 3.5ppm (ratios of NAA/Cr, Cho/Cr, (Glx+Gln)/Cr and mI/Cr were assessed. All statistical calculations were performed using IBM SPSS software (version 21.0, Chicago, IL, USA). Descriptive statistics included determination of mean values, minimum, maximum and standard deviation. Among-group differences (HIV infected subjects versus healthy controls) in acquired metabolite ratios were evaluated using ANOVA with post hoc Tukey test to determine the differences between separate groups. Due to a known impact of age and education on the NAA concentrations, differences in NAA/Cr ratios among groups were tested using ANCOVA, with age as a covariate variable. Testing relationships between continuous variables was performed using Pearson linear correlation. Statistical significance was set at value  $p < 0.05$ .

**RESULTS:** We showed that HIV+ patients on therapy were significantly older than the other two groups of patients. There was no significant difference in the level of education. We confirmed that the age significantly affects the level of NAA/Cr only. There was significant decrease ( $p < 0.05$ ) in NAA/Cr level on long echo MRS among three groups on all the observed voxels. Post hoc analysis showed that there was significant difference in 10/12 voxels between HIV+ patients on cART and healthy controls and between HIV+ patients off cART and controls, while NAA/Cr differed significantly between HIV+ patients on and off cART in only one voxel (deep frontal white matter on the left). There was decrease in Cho/Cr levels on long echo MRS in 5/12 voxels among three groups. On short echo

MRS, we showed decrease in NAA/Cr level in 3/12 voxels, while there were no differences between two groups of HIV+ patients. Results of short echo MRS in the means of Cho/Cr resembled long echo MRS. There was significant increase in mI/Cr level in HIV+ patients in 6/12 voxels compared to healthy controls, while there was difference in only one voxel between HIV+ patients on and off therapy (dorsal part of anterior cingulate on the left). Significant increase in (Glx+Gln)/Cr level was present between HIV+ patients on and off therapy in the region of right posterior cingulate. Voxels 4, 7 and 10 were the most informative ones (subcortical frontal white matter on the left, dorsal part of left anterior cingulate and right posterior cingulate), showing significant differences in 4 metabolites' ratios. We showed positive correlation between nadir CD4+ count and NAA/Cr and negative correlation between nadir CD4+ count and Cho/Cr, and nadir CD4+ count and mI/Cr, which made nadir CD4+ count the best serological predictor of neurodegeneration. Positive correlation was showed between monocyte efficacy (ME) index and NAA/Cr, while negative correlation was present between CNS penetration efficacy (CPE), Cho/Cr and mI/Cr. We concluded that ME better depicted neurodegenerative process while CPE was better in monitoring of inflammation.

**CONCLUSIONS:** HIV causes premature ageing of the brain, in the means of cognition, attention, working memory and executive function. These effects are due to direct affection of neurons by virus per se (viral proteins, induced cytokines and chemokynes). We showed tha neuronal loss and neurodegeneration affect the whole volume of the brain while inflammation and glial proliferation affect restricted areas predominantly in grey matter. High sensitivity of multivoxel MRS with use of sensitive surface coils enables metabolite mapping with high spatial resolution. MRS can give essential data on metabolites' changes during the evolution of the infection from acute, over primary to chronic. Early after seroconversion, metabolites' changes can be detected (neuronal dysfunction and inflammation).To the best of our knowledge, this is the first study using multivoxel MRS of the brain in HIV infection in human population, analyzing data from supracallosal grey and white matter. We showed the presence of diffuse but regionally highly specific changes in metabolites' ratios in patients on cART and off cART, compared to age and gender matched healthy controls. Additional studies with absolute concentrations of metabolites, as well as longitudinal studies with HIV+ patients in different

	<p>stages of the disease, are necessary for better understanding of neuropathogenesis of HAND. We showed that MRS can be useful tool in evaluation of therapy regimens efficacy. Two available indices for evaluation of cART efficacy target two separate pathways of cognitive disorder pathogenesis, with different reliability in evaluation of effect and efficacy of applied therapy. In the future, their modulation or creation of new index is needed, in order to include drug delivery through the blood-brain barrier as well as the effect on latent reservoir of HIV in monocyte/macrophage cells.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>12.07.2016.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: member: member:</p>

*...sve je moguće, sve je na dohvat ruke, samo se čovjek ne smije predati. Teško je dok se ne odlučiš, tada sve prepreke izgledaju neprelazne i sve teškoće nesavladive. Ali kad se otkineš od sebe neodlučnog, kad pobijediš svoju malodušnost, otvore se pred tobom neslućeni putevi, i svijet više nije skučen ni pun prijatnji.*

*M. Selimović*

Najveću zahvalnost za podršku u izvođenju studije i izradi rada dugujem svom mentoru, učitelju i prijatelju, prof. dr Dušku Koziću, koji je znao da na pravi način pruži podršku i potporu u kritičnim momentima, kao i svojoj mentorki prof. dr Vesni Turkulov, koja me je uvela u zanimljivi svet HIV infekcije i tokom rada na disertaciji bodrila i podržavala svim srcem.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Snežani Brkić, za koju je „hvala” premala reč, koja je prepoznala u meni hrabrost i odlučnost da se uhvatim u koštac sa veoma zahtevnom tematikom i nizom problema, na koje sam tokom izrade disertacije nailazila.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Robertu Semnicu, učitelju i prijatelju, za savete i korekcije i dr. sc. Jeleni Ostojić, koja je osmislila protokol snimanja pacijenata, kao i prof. dr Katarini Koprivšek, na korisnim korekcijama i uputstvima.

Hvala dr Dajani Lendak, na podršci i vremenu koje mi je posvetila tokom finalizacije rada.

Zahvaljujem se tehničarima Aleksandru Todoroviću i Bojanu Grujičiću na tehničkoj podršci tokom snimanja pacijenata.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, majci i baki, koje su me sve vreme podržavale, kritikovale i volele.

Hvala Nikoli, što je onaj komadić neba koji je nedostajao doneo u moj svet.

Doktorsku disertaciju posvećujem svom najboljem prijatelju, koji više nije pored mene, svom deki, koji bi danas bio najponosniji čovek na svetu.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV infekcijom (HAND).....	1
1.2. Neuropatogeneza HAND-a.....	4
1.2.1. HIV virus u centralnom nervnom sistemu.....	4
1.2.2. Invazija CNS-a: narušavanje hematoencefalne barijere.....	6
1.3. Mehanizam oštećenja neurona.....	9
1.3.1 Aktivacija makrofaga i mikroglije.....	11
1.3.2. Uloga astrocita u generisanju neuronskog oštećenja.....	12
1.4. Neuroprotektivni faktori.....	13
1.5. Genetski faktori domaćina i virusa koji utiču na nivo neuronskog oštećenja.....	13
1. 6. Dijagnostika HAND-a.....	14
1.7. Neuroimidžing HAND-a.....	16
1.7.1. Magnetno-rezonantna spektroskopija (MRS).....	16
1.7.1.1. Tipični spektar fantoma na <sup>1</sup> H MRS.....	23
1.7.2 Ostale metode neuroimidžinga u HAND-u.....	26
1.8. Skrining i terapijske mogućnosti za HAND.....	28
<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	33
<b>3. HIPOTEZE</b> .....	34
<b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....	35
4.1. Učesnici u studiji.....	35
4.2. Neuropsihološko testiranje.....	36



4.3. Laboratorijski testovi.....	36
4.4. Neuroimidžing.....	36
4.5. Statistička obrada podataka.....	40
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>41</b>
5.1. Godine života.....	42
5.2. Stepen obrazovanja.....	43
5.3. Korelacija odnosa metabolita sa godinama života i stepenom obrazovanja.....	43
5.4. Rezultati multivokselske MR spektroskopije sa korišćenjem dugog eha.....	48
5.4.1. NAA/Cr.....	48
5.4.2. Cho/Cr.....	60
5.5. Rezultati multivokselske MR spektroskopije sa korišćenjem kratkog eha.....	68
5.5.1. NAA/Cr.....	68
5.5.2. Cho/Cr.....	74
5.5.3. mI/Cr.....	80
5.5.4. (Glx+Gln)/Cr.....	84
5.6. Značajnosti razlika u posmatranim odnosima metabolita prema lokalizacijama.....	86
5.7. Korelacija imunoloških parametara i odnosa metabolita na posmatranim lokalizacijama.....	88
5.8. Korelacija odnosa metabolita sa parametrima efikasnosti antiretroviralne terapije u centralnom nervnom sistemu.....	96
<b>6. DISKUSIJA.....</b>	<b>99</b>
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>121</b>
<b>8. REFERENCE.....</b>	<b>123</b>

## **Prilog I LISTA SKRAĆENICA**

## 1. UVOD

### 1.1. Neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV infekcijom (HAND)

Neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV-infekcijom (*HIV associated neurocognitive disorder- HAND*) javlja se u oko polovine pacijenata sa HIV-om [1]. HAND obuhvata spektar neuroloških poremećaja koji variraju od asimptomatskog neurokognitivnog poremećaja (*asymptomatic neurocognitive impairment- ANI*), preko blagog kognitivnog oštećenja, koje se naziva blagi kognitivni poremećaj (*mild neurocognitive disorder -MND*) do demencije udružene sa HIV-om (*HIV associated dementia - HAD*) (Tabela 1) [2]. Najveću prevalenciju među njima ima ANI, potom MND, a svakako najnižu HAD. Iako su incidenca i prevalenca HAD-a redukovane u eri kombinovane antiretroviralne terapije (cART), prevalenca HAND-a se zapravo povećava širom sveta. Produženi životni vek pacijenata na terapiji rezultuje akumulacijom neuroloških oštećenja, posledično hroničnoj izloženosti nervnog sistema HIV virusu i virusnim proteinima koji indukuju imunološku aktivaciju i posledično hroničnu inflamaciju [3]. Uspešnost cART-a u kontroli virusa i sniženju viremije u perifernoj krvi nije nužno praćen redukcijom aktivacije imunološkog sistema u mozgu [4].

Primarni uzrok HAND-a je infekcija CNS-a virusom HIV-a [5]. Ako nije lečena, postoji visok nivo replikacije HIV-a u makrofagima i mikroglijiji u mozgu. Obzirom da neuroni ne poseduju receptore za HIV, najverovatnije nisu primarno inficirani, ali postoji niz različitih imunopatoloških mehanizama koji strukturno oštećuju ove ćelije i dovode do kasnijeg neurokognitivnog oštećenja. Što se tiče virusne replikacije i virusnih kvazispicijesa, CNS je parcijalno nezavistan od perifernog kompartmana što može dovesti do „virusnog bega” sa direktnim kliničkim posledicama [6, 7]. U skorijim studijama na autopsijama su se kod pacijenata sa uznapredovalom HIV infekcijom uočile karakteristike koje se pronalaze u demenciji po tipu Alchajmerove bolesti [8].

**Tabela 1.** Klasifikacija HAND-a prema Frascati kriterijumima [2]. Kognitivni funkcionalni domeni su: verbalni/jezički, pažnja/ radna memorija, apstraktno mišljenje/ egzekutivne funkcije, memorija (učenje, prisećanje), brzina procesuiranja informacija, senzorno-perceptualni, motorne veštine.

<p><b><i>Asimptomatski neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV infekcijom (ANI)</i></b></p>	<p>Postoji objektivno oštećenje u dva ili više kognitivnih domena sa padom <math>\geq 1</math> standardne devijacije (SD) ispod proseka za datu životnu dob. Oštećenje ne ugrožava snalaženje u svakodnevnim aktivnostima.</p>
<p><b><i>Blagi neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV infekcijom (MND)</i></b></p>	<p>Rezultati neuropsiholoških testova kao u ANI.</p> <p>Najmanje blag poremećaj u obavljanju svakodnevnih aktivnosti (bar jedno od sledećeg):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Anamnestički podaci o smanjenju mentalnih funkcija, neefikasnost u poslu, održavanju domaćinstva ili socijalnom funkcionisanju</li> <li>b) heteroanamnestičko prijavljivanje da pacijent ima barem blagu redukciju mentalne oštine sa rezultujućom neefikasnošću u poslu, održavanju domaćinstva ili socijalnom funkcionisanju</li> </ul>
<p><b><i>Demencija udružena sa HIV infekcijom (HAD)</i></b></p>	<p>Izražen stečeni poremećaj kognitivnih funkcija. Objektivno oštećenje više oblasti kognitivnog funkcionisanja sa padom <math>\geq 2SD</math> ispod proseka za datu životnu dob. Izražen poremećaj svakodnevnog funkcionisanja (posao, kuća, socijalne aktivnosti)</p>

HAND prema klasičnom shvatanju predstavlja tip supkortikalne demencije. Sa uvođenjem cART, znaci kortikalne zahvaćenosti i poremećaja memorije su postali izraženiji, dok su motorne smetnje postale manje značajne [1]. Neurokognitivni poremećaj se razvija tokom nedelja i meseci, dok akutno nastali neurološki simptomi ukazuju na drugu podležuću patologiju. Temperatura, umor, efekat lekova za smirenje, slabija fizička kondicija i depresija major mogu uticati na lošija kognitivna postignuća (slika pseudodemencije).

**Tabela 2.** Težina HAND-a prema Memorial Sloan Kettering skali (MSK skala).

<b>Stadijum 0</b>	(normalan) normalna mentalna i motorna funkcija
<b>Stadijum 0.5</b>	(supklinički) bez oštećenja u radu ili kapacitetu za obavljanje aktivnosti svakodnevnog života (ASŽ); normalan hod; usporavanje pokreta očiju i ekstremiteta može biti prisutno
<b>Stadijum 1</b>	(blag) sposoban da obavi sve osim najzahtevnijih ASŽ ali sa nedvosmislenim znacima ili simptomima funkcionalnog, intelektualnog ili motornog oštećenja; hod bez pomoći
<b>Stadijum 2</b>	(umeren) sposoban da obavi bazične aktivnosti brige o sebi, nesposoban da radi ili obavlja zahtevnije ASŽ; hod uz pomoć štapa
<b>Stadijum 3</b>	(težak) veliko oštećenje intelektualnih sposobnosti (ne može da prati vesti ni događaje, ne prati kompleksnu konverzaciju, značajno psihomotorno usporavanje); motorna invalidnost (hod nemoguć bez pomoći, manuelno usporavanje i trapavost)
<b>Stadijum 4</b>	(terminalni) skoro nekomunikativan. Intelektualno i socijalno razumevanje na rudimentarnom nivou; skoro ili potpuno nem; paraparetičan ili paraplegičan sa fekalnom i urinarnom inkontinencijom

Kognitivni simptomi na koje se pacijenti žale ne moraju biti u skladu sa aktuelnim razvojem poremećaja. Pacijenti kod kojih neuropsihološki testovi zapravo pokazuju neurokognitivni

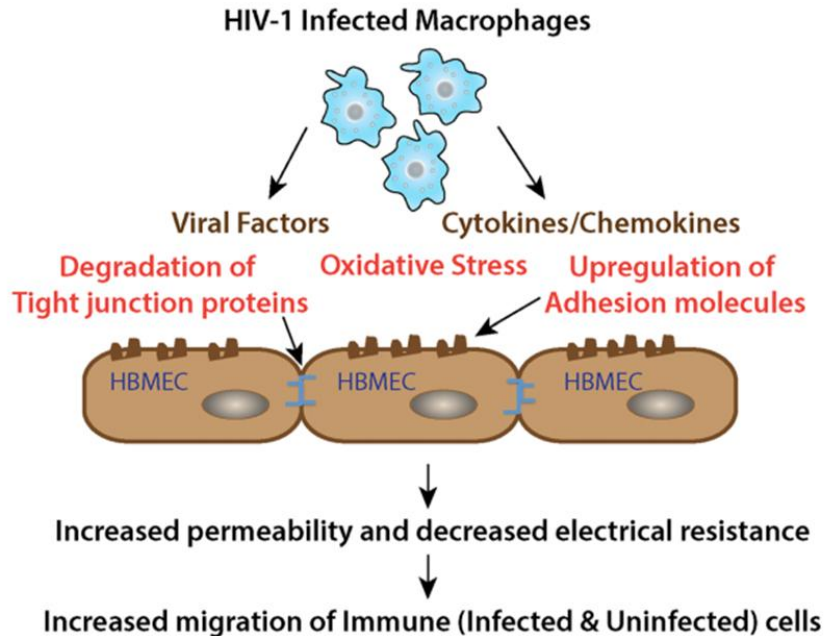
poremećaj obično nemaju dobru procenu smetnji, te je ovde od velikog značaja heteroanamneza. Tipične smetnje su usporen tok misli, zaboravnost, teškoće koncentracije, nedostatak energije, blagi simptomi depresije i emocionalno otupljivanje. Što se kliničkog nalaza tiče, ukočenost vrata, fokalni ili lateralizirajući neurološki znaci (hemipareza, afazija), te fokalni ili generalizovani epileptički napadi nisu karakteristični za HAND. Psihoteički simptomi bez kognitivnog ili motornog oštećenja takođe ne sugerišu ovu dijagnozu. Nelateralizirajući i veoma suptilni znaci piramidnog, ekstrapiramidnog, okulomotornog i autonomnog sistema mogu biti prisutni u odmaklim fazama bolesti. Težina HAND-a se može funkcionalno proceniti na osnovu Memorial Sloan Kettering skale [9].

## **1.2.Neuropatogeneza HAND-a**

### **1.2.1. HIV virus u centralnom nervnom sistemu**

Infiltracija moždanog tkiva monocitima predstavlja početni korak neuroinvazije. Makrofagi porekla monocita (*monocyte-derived makrophages*, MDM) su jedna od tri glavne grupe ćelija koje su inficirane virusom HIV-a, pored CD4+ T-limfocita i dendritičnih ćelija. Jednom kada se HIV-inficirani makrofagi nasele u centralnom nervnom sistemu, oni sekretuju hemokine, koji uspostavljaju hemotaktični gradijent preko hematoencefalne barijere (HEB) i privlače sve više monocita iz perifernog kompartmana u CNS [10]. Ovaj priliv HIV-inficiranih monocita dovodi do infekcije drugih monocitnih ćelija koje su već prisutne u CNS-u, perivaskularnih makrofaga i mikroglije, što rezultuje daljim oštećenjem HEB-a i ubrzava ulazak HIV-inficiranih i neinficiranih monocitnih ćelija u mozak (Slika 1). Neuronu se ne mogu inficirati HIV-om niti se mogu replikovati, ali ispoljavaju ćelijske receptore (CCR5, CXCR4, NMDAR), koji ih čine osetljivim na virusne proteine (Tat, glikoprotein gp120), inflamatorne citokine (faktor tumorske nekroze TNF $\alpha$ , interleukin IL1 $\beta$ ) i male proteine koje sekretuju ćelije imunog sistema u mozgu (azotni oksid, arahidonska kiselina). Ključni događaju koji doprinose razvoju HAND-a su:

1. apoptoza neurona,
2. disregulacija potpornih ćelija i
3. gubitak dendritskog vretena.



**Slika 1.** *Invazija HEB. HIV-inficirane ćelije imunog sistema oslobađaju toksične virusne produkte i inflamatorne citokine, koji dovode do degradacije juncionih proteina, oksidativnog stresa i ushodne regulacije adhezivnih molekula. Ovo rezultuje povećanom permeabilnošću HEB i migracijom ćelija imunog sistema kroz HEB. HIV infiltruje HEB koristeći HIV-inficirane monocitne ćelije radi penetracije u moždano tkivo.*

Proces HIV infekcije počinje vezivanjem HIV virusa za CD4 receptor na površini ćelije mete (T-limfocita), pomoću proteina virusnog omotača glikoproteina gp120. Ovo vezivanje indukuje konformacionu promenu u gp120 koja otkriva CCR5 ili CXCR4 koreceptorsko mesto. Kada se gp120 veže za koreceptor, otkriva se peptid fuzije u virusnom proteinu gp41, koji se ubacuje u ćelijsku membranu i pokreće spajanje virusne i ćelijske membrane [11]. Na osnovu koreceptorske prednosti, izdvajaju se dva izolata HIV virusa: R5 ili X4 virus, u zavisnosti od toga da li posmatrani izolat koristi CCR5 ili CXCR4 koreceptor. Samo su R5 virusi transmisivni i predstavljaju tip virusa koji se otkriva u ranoj infekciji. Međutim, kako bolest napreduje, predominantni tropizam se premešta na CXCR4 koreceptor u oko polovine slučajeva, što je povezano sa bržom replikacijom virusa i bržim padom broja CD4<sup>+</sup> T-ćelija.

HIV virus inficira i monocitne ćelije/ makrofage. Infekcija monocita/ makrofaga nastaje pre svega monocito/makrofago-tropnim (M) virusima, vezivanjem preko CCR5 koreceptora, ali se

viđa i infekcija T-troponim virusima kroz CXCR4 koreceptor. Iako su dendritske ćelije takođe inificirane HIV-om, one ne podržavaju masovnu replikaciju HIV-a. Ipak, one igraju ključnu ulogu u sistemskom širenju HIV virusa zbog svog strateškog položaja u limfnim čvorovima [12]. HIV infekcija dovodi do progresivnog pada broja CD4+ T-limfocita, usled gubitka inficiranih ali i neinficiranih CD4+ ćelija („*bystander killing*“, ubijanje posmatrača). Ne uočava se sistemski gubitak monocitnih ćelija, ni inficiranih ni neinficiranih. M virusi na sebi nose gp120 glikoprotein. Makrofagi se karakterišu pupljenjem viriona i stvaranjem internih multivezikularnih telašaca, vakuola unutar ćelija, što omogućava HIV-u da se „sakrije“ unutar inficiranih makrofaga, što ih čini jednim od glavnih latentnih rezervoara HIV-a.

Predominantni put ekspozicije CNS-a virusu HIV-a je kroz monocitne/makrofagne ćelije periferne krvi, koje su inficirane virusom i migriraju kroz hematoencefalnu barijeru. Monociti periferne krvi su podeljeni na klasične mirujuće monocite koji nose samo CD14 receptor (CD14++CD16-), intermedijerne koji imaju visoke nivoe CD14 i razvijaju CD16 pozitivnost /CD14++CD16+) te neklasične aktivirane monocite koji pokazuju visoke nivoe CD16 i niske CD14 receptora (CD14+CD16++). Podgrupa CD16++, iako zauzima samo oko 5-10% populacije cirkulišućih monocita, je najbrojnija u mozgu pacijenata sa HIV encefalopatijom. CD16++ monociti su podložniji HIV infekciji i podržavaju visoke stope virusne replikacije. Uz to, inficirani CD16++ monociti efikasnije migriraju kroz HEB kao odgovor na hemokinski gradijent. Dok se CD4+ T-limfociti smatraju odgovornim za transport HIV-a do CNS-a, najveći deo HIV-a izolovanog iz CNS-a je iz makrofago-tropne linije [13-15].

### **1.2.2. Invazija CNS-a: narušavanje hematoencefalne barijere**

Hematoencefalna barijera (HEB) je lokalizovana na svim mestima interakcije moždanog tkiva i krvnih sudova, a sastoji se od astrocita i humanih moždanih mikrovaskularnih ćelija endotela (*human brain microvascular endothelial cells* - HBMEC). Periciti oblažu abluminalnu stranu endotela i povećavaju selektivnost barijere [16]. Gustina pericita u mozgu je mnogo veća od one koja se uočava u drugim organima, te se tako formira dodatna barijera. HEB održava homeostazu interne strukture mozga i predstavlja važnu fiziološku i imunološku branu između CNS-a i periferne cirkulacije [17]. HIV prolazi HEB rano nakon infekcije, koristeći HIV-inficirane

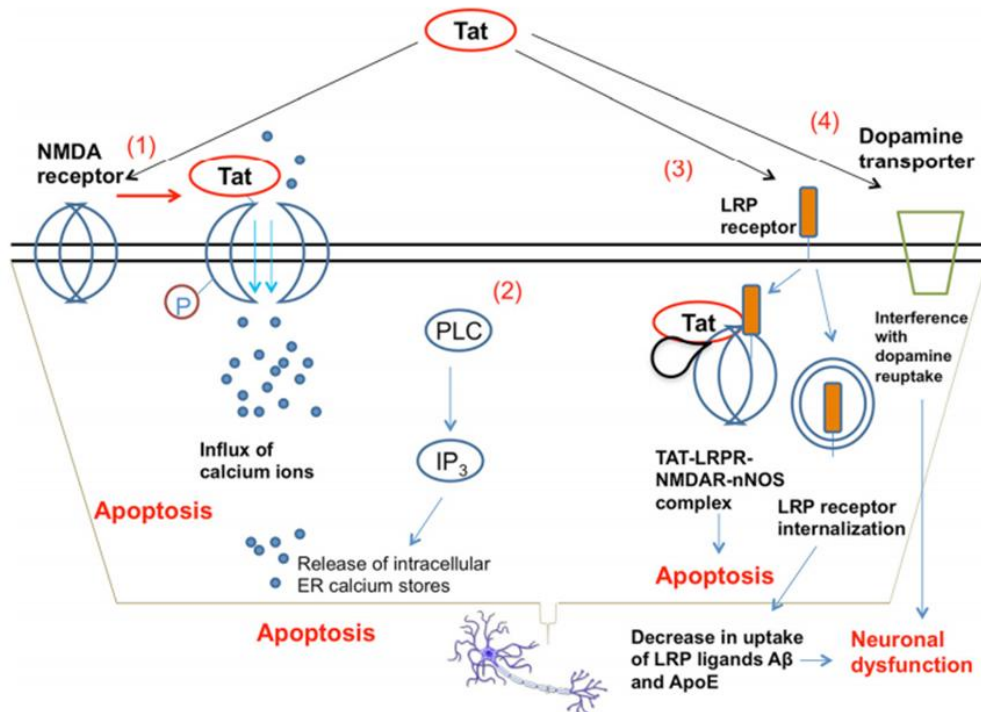
monocitne ćelije i periferne CD4+ limfocite kao „Trojanskog konja” da bi ušao u mozak. Mali broj monocita rutinski ulazi u CNS kao deo imunološkog monitoringa, da bi dopunio populaciju rezidentnih makrofaga [18, 19]. Infekcija HIV-om povećava adherentnost monocita za endotelne ćelije i povećava stopu migracije kroz HEB. HIV-inficirani makrofagi u blizini HEB sekretuju inflamatorne citokine i virusne produkte koji oštećuju HBMEC, indukuju ćelijski oksidativni stres i proizvode hemokine kao što je CCL2, koji olakšavaju dolazak novih imunih ćelija u blizinu barijere. Interakcija sekretovanih citokina, virusnih produkata i HBMEC aktivira endotelne ćelije i povećava površinsku ekspresiju adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama, koja zauzvrat ubrzava migraciju inficiranih makrofaga kroz HEB [20, 21].

Virusni proteini Tat i glikoprotein gp120 direktno oštećuju HEB. Tat je nestrukturani viralni protein koji sekretuju inficirane ćelije [22, 23]. Tat mRNA, Tat protein i antitela na Tat su detektabilni u CNS-u HIV inficiranih pacijenata [24, 25]. Endotelne ćelije mozga, kada su izložene Tat proteinu, menjaju ekspresiju i distribuciju proteina veze (kludina i okcludina) [26]. Izloženost HBMEC ćelija Tat proteinu ushodno reguliše matriks metalopeptidazu 9 (MMP9), koja zauzvrat povećava permeabilnost endotelnih ćelija mozga degradacijom okcludina. *In vitro* dvokomorni modeli sa HBMEC i astrocitima su takođe pokazali da Tat protein uzrokuje produkciju azotnog oksida u endotelnim ćelijama mozga i sekreciju CCL2, ključnog hemokina odgovornog za migraciju ćelija imunog sistema (Slika 2) [27-29].

Iako endotelne ćelije u mozgu, koje oblažu HEB, nisu zapravo inficirane, nekoliko *in vivo* i *in vitro* studija je pokazalo da glikoprotein gp120 uzrokuje funkcionalno oštećenje HEB [30, 31]. Kanmonj je pokazao, koristeći dvokomorni model hematoencefalne barijere, da ekspozicija HBMEC rekombinantnom gp120 iz HIV-a dovodi do aktivacije proinflamatornih i interferon-indukovanih gena, povećane adhezije leukocita, sniženja transendotelnog električnog otpora i povećane migracije monocita kroz barijeru. Otklanjanje gp120 je rezultovalo kompletnom restitucijom transendotelnog električnog otpora i značajnim poboljšanjem permeabilnosti [32, 33]. Izlaganje HBMEC ćelija glikoproteinu gp120 *in vitro* je pokazalo povećanu ekspresiju adhezivnih molekula (ICAM i VCAM), oštećenje barijere i posledično povećanje monocitne migracije kroz jedan sloj endotelnih ćelija. Postoji dozno-zavisno povećanje citotoksičnosti HBMEC ćelija kada su izloženi rekombinantnom gp120. HBMEC citotoksičnost, koja je

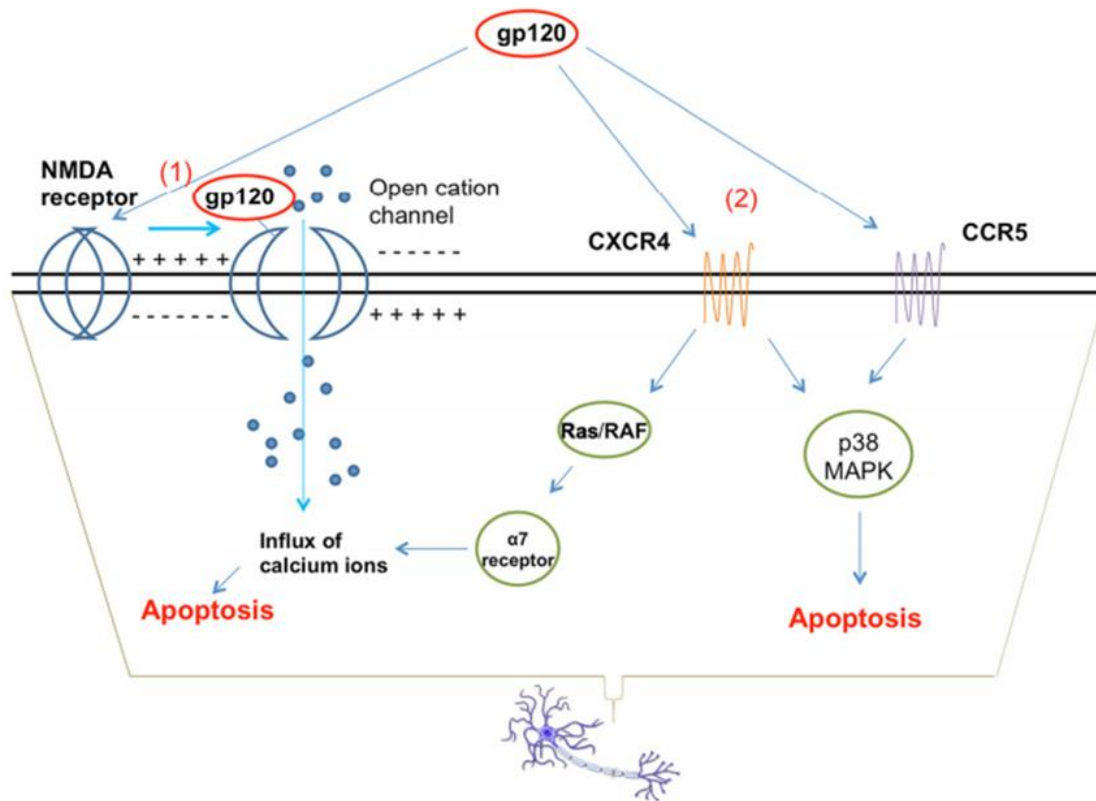


posredovana glikoproteinom gp120, uključuje p38 mitogen aktiviranu protein-kinazu (MAPK) (Slika 3) [34, 35].



**Slika 2.** *Mehanizmi neurotoksičnosti Tat proteina: 1) Tat se vezuje za NMDAR i pokreće fosforilaciju intracelularne NMDAR subjedinice, što uzrokuje toksično nagomilavanje kalcijumskih jona. 2) u neuronima, Tat indukuje oslobađanje intracelularnih depoa kalcijuma iz endoplazmatskog retinakuluma. 3) Tat se može vezati za LRP receptore i indukovati ćelijsku apoptozu (preko neuronalne azotne oksidaze). 4) Tat interferira sa dopaminskim receptorom, ometajući na taj način transmisiju signala.*

Tako su i gp120 i Tat proteini uključeni u narušavanje hematoencefalne barijere. Definisane preciznih uloga drugih faktora virusa i domaćina koji direktno oštećuju HEB kao i identifikacija pouzdanih biomarkera oštećenja HEB je ključna u daljem razumevanju mehanizama koji čine patološki supstrat u HAND-u. Takvo znanje bi ubrzalo razvoj inovativnih terapijskih strategija, specifično ciljanih na prevenciju oštećenja HEB i redukciju invazije CNS-a inficiranim makrofazima.



**Slika 3.** Mehanizmi neurotoksičnosti gp120: 1) gp120 se može vezati za NMDAR i dovesti do povećanog/ toksičnog influksa kalcijumskih jona. 2) gp120 se može direktno vezati za CCR5 ili CXCR4, aktivirajući kaskadu koja dovodi do apoptoze neurona. Vezivanje gp120 za CXCR4 takođe ushodno reguliše ekspresiju nikotinskog receptora  $\alpha 7$ , koji doprinosi smrti neurona povećanjem permeabilnosti membrane za jone kalcijuma.

### 1.3. Mehanizam oštećenja neurona

Iako neuroni ne mogu biti inficirani virusom HIV-a, neuronsko oštećenje je ključni faktor u razvoju HAND-a [36]. Neuroni su osetljivi na direktno oštećenje putem nekoliko virusnih proteina. Ova senzitivnost je pretežno posredovana prisustvom sledećih ćelijskih receptora na neuronima: N-metil-D-aspartat receptora (NMDAR), lipoproteinskog receptorskog proteina niske gustine (LRP), hemokinskih receptora CCR5 i CXCR4, kao i transportera dopamina. NMDAR predstavlja receptor za glutamat. Glutamat je najzastupljeniji neurotransmiter u mozgu, odgovoran za propagaciju ekscitatornih signala vezivanjem za NMDAR i otvaranjem katjonskih

kanala u ćelijskoj membrani, što omogućava ulazak natrijuma i kalcijuma a izlazak kalijumskih jona iz ćelije [37]. LRP je receptor koji je involviran u promet holesterola u ćelijama, sa ulogom i u transmisiji signala i u inhibiciji apoptoze neurona [38]. Dopaminski receptori i transporteri su slabije zastupljeni od NMDAR-a, ali se u značajnoj količini nalaze u zonama mozga koje pokazuju afinitet za infekciju HIV-om (strijatam i supstancija nigra, uključene u egzekutivne funkcije i sistem nagrade). U pacijenata sa kognitivnim deficitom uočavaju se sniženi nivoi dopaminskih receptora u strijatumu [39, 40].

Dva glavna virusna proteina koji učestvuju u ovom indirektnom oštećenju neurona su već pomenuti Tat i gp120. Neurotoksične osobine gp120 su uglavnom ispitivane na modelima transgeničnih miševa [41]. Gp120 direktno vezuje NMDAR na ljudskim embrionalnim ćelijama mozga i može uzrokovati letalni ulazak kalcijumskih jona [42]. Takođe se može vezati za CCR5 i CXCR4 i indukovati smrt neuroblastnih ćelija [43, 44]. Ova apoptoza izgleda nastaje putem p38-MAPK (mitogen aktivirana protein kinaza) signalne kaskade [45]. Prirodni ligandi CCR5 (CCL5, CCL3) i CXCR4 (CXCL12) su neuroprotektivi za gp120 neurotoksičnost [46, 47]. Međutim, CXCL12 pokazuje neurotoksičnost nakon N-terminalnog odvajanja tetrapeptida CXCL12 putem MMP-2. Dodatni faktor koji je ushodno regulisan interakcijom gp120 i CXCR4 je neuronski nikotinski receptor  $\alpha 7$ , koji povećava ćelijsku permeabilnost za influks kalcijuma i doprinosi smrti ćelija (Slika 3) [48].

Virusni protein Tat takođe indukuje neurotoksičnost na nekoliko načina. Slično kao gp120, Tat može aktivirati NMDAR i usloviti influks kalcijumskih jona. Uz disregulaciju kalcijuma kroz NMDAR, Tat može pokrenuti aktivaciju inozitol 1,4,5-trifosfata preko fosfolipaze C, koja takođe povećava intracelularne nivoe kalcijumskih jona (mobilizacijom depoa u endoplazmatskom retikulumu) [49]. Tat takođe vezuje LRP u neuronima, uzrokujući internalizaciju LRP i sniženje u preuzimanju LRP liganada, kao što je amiloid- $\beta$ -peptid i apolipoprotein E. Interakcija Tat-a sa LRP-om može dovesti do formiranja kompleksa koji promoviše apoptozu (sadrži postsinaptički protein gustine 95 (PSD-95), NMDAR i sintetazu neuronskog azotnog oksida). Pokazalo se da Tat menja ekspresiju mRNK u neuronima, dovodeći tako do disfunkcije neurona. Tat takođe interreaguje sa sposobnošću dopaminskog receptora da preuzima dopamin (Slika 2). Ovo verovatno doprinosi posebno teškom oštećenju dopaminergičnih zona u mozgu pacijenata sa teškim HAND-om [50, 40].

Drugi toksični virusni proteini koji uzrokuju oštećenja neurona su Vpr i Nef, preko još nedovoljno preciziranih mehanizama [51]. Vpu formira katjonski-selektivne jonske kanale u dvoslojnoj lipidnoj membrani, iako ovaj efekat nije dokazan kod neurona [52]. Nedavno je pokazano da akumulacija amiloid- $\beta$ -fibrila može imati značajnu ulogu u uzrokovanju neuronske disfunkcije. Moguće je da put integrisanog odgovora na stres (*integrated stress response*- ISR) koji uključuje specifične ISR proteine stoji iza neuroinflamatornih procesa koji se uočavaju u HAND-u. Tako je prikazano da individue sa HIV encefalitisom pokazuju više nivoa intraneuralnih amiloid- $\beta$  fibrila u poređenju sa kontrolama, što ukazuje na uticaj HIV virusa na nivo A $\beta$  u mozgu [53, 54].

Tačno definisanje pobrojanih mehanizama neuronskog oštećenja bi moglo dovesti do razvoja terapijskih mogućnosti, koje bi ublažile simptome i poboljšale kvalitet života kod HIV pacijenata koji su razvili HAND.

### **1.3.1 Aktivacija makrofaga i mikroglije**

HIV-inficirani makrofazi i mikroglija oslobađaju niz neurotoksičnih faktora koji doprinose neuronskom oštećenju. Oni mogu biti okarakterisani kao proinflamatorni citokini, hemokini i mali molekuli. U proinflatorne citokine spadaju faktor tumorske nekroze TNF- $\alpha$ , interleukine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i interferon IFN- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  inhibira preuzimanje glutamata od strane astrocita, što vodi do ekstracelularnog nakupljanja glutamata koje može dovesti do neuronske ekscitotoksičnosti [55]. TNF- $\alpha$  takođe ima i još nedovoljno istraženu neuroprotektivnu ulogu. Interleukin IL-1 $\beta$  se oslobađa iz makrofaga kao odgovor na protein kinaze indukovane putem gp120. I TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  ometaju regulaciju produkcije glutamata u neuronima indukcijom glutaminaze. Interleukin IL-6 je isto direktno indukovan od strane makrofaga preko gp120, a uzrokuje formiranje velikih citoplazmatskih vakuola u neuronima, koje remete funkciju neurona [56, 57]. Visoki nivoi TNF- $\alpha$  su korelirani sa težinom HIV demencije. Mali molekuli, koje otpuštaju HIV-inficirani makrofazi, kao što je faktor aktivacije trombocita (*platelet activating factor* - PAF) i hinolinska kiselina, igraju značajnu ulogu u neurotoksičnosti kroz disregulaciju NMDAR [58, 59].

Mikroglialne ćelije su porekla mezoderma, a populacija ovih ćelija u mozgu nastaje perinatalno. Odgovorne su za imunološki nadzor CNS-a i predstavljaju primarni rezervoar inflamatornih citokina u mozgu kod HIV+ pacijenata. Inficirana mikroglia se smatra glavnim izvorom gigantskih multinuklearnih ćelija, koje su patognomonične za demenciju udruženu sa HIV-om (HAD). Mikroglia je i glavni izvor neuronske ekscitotoksičnosti (obzirom da oslobađaju glutamat kao odgovor na HIV infekciju). Čak i kod pacijenata kod kojih se postiže dobra kontrola HIV infekcije putem cART, pojačana aktivacija mikroglije pokazuje pozitivnu korelaciju sa slabom egzekutivnom performansom [60-62].

### **1.3.2. Uloga astrocita u generisanju neuronskog oštećenja**

Tokom prethodne decenije, značajna istraživanja su išla u pravcu rasvetljenja uloge astrocita u CNS-u. Ova su istraživanja promenila prethodno shvatanje o njihovom „neutralnom” statusu u kontekstu HIV infekcije. Novootkrivene uloge uključuju preuzimanje neurotransmitera, održavanje integriteta HEB, vazomodulaciju i dugoročnu ushodnu regulaciju. Novi koncept neuro-glijalne interakcije, gde astrociti imaju dinamičku ulogu integrisanjem neuronskog inputa i moduliranjem sinaptičke aktivnosti, pomaže boljem razumevanju disfunkcije astrocita u kontekstu HAND-a [63, 64].

Nedavno je pokazano da astrociti mogu biti inficirani HIV-om *in vitro*, te na taj način dodatno oštetiti funkciju HEB. Međutim, inficirani astrociti se retko sreću na obdukcionim nalazima (iako je jedna skorašnja studija pokazala da je oko 20% astrocita inficirano virusom HIV-a kod pacijenata sa HAD). Indukcija otpuštanja hemokina, citokina i sintetaze azotnog oksida u kultivisanim primarnim humanim astrocitima se događa preko veze sa rekombinantnim Tat-om (Tat indukuje astrocite da proizvode faktor rasta dobijen iz trombocita BB (PDGF-BB), koji zauzvrat indukuje produkciju CCL2; isto tako, Tat ushodno reguliše ekspresiju matriks metaloproteinaze MMP-9 koja narušava integritet HEB) [65-67].

Ekspozicija astrocita glikoproteinu gp120 uzrokuje ushodnu regulaciju IL-6 i TNF- $\alpha$  i povećava otpuštanje glutamata i kalijuma, što dovodi to toksičnog povećanja kalcijumskih jona unutar neurona i astrocita [68]. *In vitro* studije na primarnim humanim astrocitima i životinjskim

modelima pokazale su da izlaganje glikoproteinu gp 120 remeti sposobnost astrocita da transportuju i preuzimaju L-glutamat, što dovodi do poremećaja glutamat-glutaminske ravnoteže i sledstvenog poremećaja u memoriji. Oslobođanje toksičnih citokina, nesposobnost da preuzmu višak glutamata i kompenzuju oštećenje HEB čini astrocite ćelijama koje kao i sve druge unutar CNS-a aktivno učestvuju u nastanku HAND-a [69].

#### **1.4. Neuroprotektivni faktori**

Makrofagi, mikroglia i neuroni proizvode niz neuroprotektivnih medijatora inflamacije.

PDGF (*platelet derived growth factor* - faktor rasta dobijen iz trombocita) predstavlja neuroprotektiv od gp120 (stimulacijom P13K/Akt puta). Astrociti koji su izloženi HIV-u ili su hronično inficirani HIV-om ekspresuju tkivni inhibitor metaloproteinaze 1 (IMP-1) koji ima protektivnu ulogu za primarne humane neurone. Ekspozicija astrocita glikoproteinu gp120 indukuje ekspresiju Nrf2 (*nuclear factor euthyroid-derived 2-related factor 2*), koji stimuliše proizvodnju antioksidantnih enzima (pre svega usmerenih na sniženje oksidativnog stresa indukovano azotnim oksidom) [70].

Fraktalkin (FKN/CX3CL1) je hemokin koji proizvode neuroni, igra značajnu ulogu u komunikaciji sa mikroglijom, te protekciji neurona preko snižavanja toksičnosti glikoproteina gp120. Povišeni nivoi FKN se vide u neuronima pacijenata sa HIV encefalitisom, gde pre svega stimulišu migraciju monocita. Drugi do sada ispitani hemokin neurona, CCL3L1, štiti od glikoproteina gp120 preko fosforilacije CREB-a (*cAMP response element binding protein*) [71]. Putevi akcije ovih medijatora domaćina mogu poslužiti kao potencijalni modeli eventualne terapijske intervencije, bazirano na već etabliranim putevima zaštite neurona.

#### **1.5. Genetski faktori domaćina i virusa koji utiču na nivo neuronskog oštećenja**

Nekoliko značajnih modela genetskog polimorfizma domaćina je povezivano sa efektima transmisije HIV –a i progresijom sindroma stečene imunodeficijencije (*acquired immune deficiency syndrome* - AIDS). Slično, nekoliko modela polimorfizma gena je povezano sa efektima podložnosti neurokognitivnom oštećenju. Tačkasta mutacija identifikovana na CCR2

(V64I) koja je povezana sa sporijom progresijom bolesti, je specifično povezana i sa sporijim razvojem neurokognitivnog oštećenja [72]. Polimorfizam TNF- $\alpha$  gena povećava njegovu produkciju kao odgovor na bakterijske lipopolisaharide, a veoma često se nalazi kod pacijenata sa HAD. Alel CCL2, 2578G nosi 50% -no smanjenje rizika od prenosa infekcije virusom HIV-a. Međutim, isti taj alel, u slučaju infekcije HIV-om, je povezan sa 4,5 puta većim rizikom od razvoja HAD (preko povećanog infliksa monocitnih ćelija) [73, 74].

HIV virus se klasično filogenetski deli u četiri grupe: M, N, O i P, gde je M grupa najrasprostranjenija, dalje podeljena u podgrupe A, B, C, D, F, G, H, J, K te brojne cirkulišuće rekombinantne forme (CRFs) ovih podtipova. Globalna distribucija podtipva HIV-a je regionalno specifična, sa prisutnim određenim genetskim podtipovima i rekombinantnim formama u različitim geografskim područjima [75]. Ovakva distribucija virusa se smatra posledicom „efekta osnivača” (prve grupe virusa koja je stigla na to područje) i genetikom populacije domaćina koja je sklonija određenim podtipovima. Na primer, u Indiji, gde je podtip C predominantan, postoji niska prevalenca HAD-a (0-4%), za razliku od drugih regiona gde preovladava podtip B sa incidencom HAD-a (u eri pre cART) od 15-30% [76]. Kako infiltracija mozga monocitima predstavlja patognomonični znak HAD-a i igra centralnu ulogu u okidanju inflamatornog odgovora na neurone, pretpostavlja se da ovaj polimorfizam predstavlja okosnicu odgovora na nisku incidencu HAD-a u Indiji (manje monocita migira u mozak i samim tim je manje oštećenje neurona). Nekoliko drugih studija su pokazale da podtip C ima snižen potencijal za direktnu neurotoksičnost te sniženu sposobnost da indukuje inflamatorne hemokine i citokine. U Evropi, pa tako i u našoj zemlji, najčešći je podtip virusa B, koji je povezan sa relativno visokom incidencom HAD-a (15-30%) [77].

## **1. 6. Dijagnostika HAND-a**

Postavljanje dijagnoze HAND-a zahteva kombinaciju kliničkog pregleda, složenih neuropsiholoških testova i pomoćnih imidžing metoda. Dijagnoza HAND-a se uglavnom postavlja eliminacijom drugih stanja. Klinički su predominantni znaci oštećenja kognicije, dok psihološki, bihejvioralni i motorni znaci i simptomi mogu biti vrlo suptilni u ranim fazama. Motorni znaci se obično uočavaju u kasnijim fazama. Neuropsihološko testiranje predstavlja

zlatni standard za procenu kognicije a spada u proceduru koja je neophodna za postavljanje dijagnoze HAND-a. Ovo testiranje treba da obuhvati sledeće domene: verbalni/jezički, pažnja/radna memorija, apstraktno mišljenje/egzekutivna funkcija, učenje/prisećanje, brzina procesuiranja informacija i motorne veštine [78]. Kada nije dostupan psiholog, mogu se koristiti jednostavnije skale, pre svih HIV-demencija skalu (*International HIV Dementia Scale*), ali su njena senzitivnost i specifičnost ograničene.

Za klasifikaciju širokog kliničkog spektra neurokognitivnih poremećaja udruženih sa HIV infekcijom, kao set dijagnostičkih kriterijuma, koriste se Fraskati kriterijumi [2]. Međutim, Fraskati kriterijumi u kliničkoj praksi rezultuju visokom stopom lažno-pozitivnih nalaza. Iz tog razloga, skorašnje studije su usmerene na pronalaženje novih kriterijuma za postavljanje dijagnoze HAND-a. U studiji iz 2016. godine, etablirana je multivarijantna normativna komparacija (MNC), tehnika koja zadržava senzitivnost Fraskatijske skale sa dobrom kontrolom lažno-pozitivnih nalaza [79].

Rutinski laboratorijski testovi se koriste da bi pomogli u diferencijalnoj dijagnostici. Što se tiče neuroimidžinga, koji je neophodan u nekom momentu evaluacije neurokognitivnih smetnji, magnetno-rezonantni imidžing (MRI) je daleko senzitivniji od kompjuterizovane tomografije (CT). Na žalost, ni u domenu neuroimidžinga ne postoji nalaz koji je specifičan za HAND, te bolest može evoluirati i uz normalan nalaz na MRI. Često je jedini nalaz sasvim blago izražena atrofija sa dilatacijom komornog sistema i ekstracerebralnih likvorskih prostora [80].

Rutinski se lumbalna punkcija i analiza cerebrospinalne tečnosti (CSF) ne rade u cilju dijagnostike HAND-a, ali ju je ponekad neophodno načiniti u cilju diferencijalne dijagnostike. Obično je citobiohemijski nalaz likvora uredan ili postoji blaga pleocitoza, koja sugerise imunološki odgovor na HIV virus u kontekstu imune rekonstitucije. Koncentracije ukupnih proteina i albumina mogu biti blago povišene, kao posledica narušenog integriteta hematoencefalne barijere. Oligoklonalne trake i povišen IgG indeks indikuju produkciju autohtonih imunoglobulina unutar CNS-a. Međutim, ovi su nalazi nespecifični, često prisutni i kod asimptomatskih HIV+ pacijenata. Kod pacijenata koji nisu na cART-u, postoji slaba ali ipak statistički značajna korelacija višeg virusnog titra u likvoru u uslovima manifestnog HAND-a



[81]. Međutim, ova asocijacija prestaje da postoji sa uvođenjem cART. Elektroencefalogram (EEG) pokazuje ili nalaz bez osobenosti ili samo blago usporenje moždane aktivnosti.

Sa razvijanjem antiretroviralne terapije, populacija HIV+ pacijenata postaje sve starija, te se i drugi tipovi demencije, kao što su Alchajmerova, vaskularna, demencija sa Lewyjevim telašcima, moraju diferencijalno dijagnostički isključiti.

## **1.7. Neuroimidžing HAND-a**

Mogućnosti neuroimidžinga u dijagnostici i monitoringu HAND-a su sve veće i značajnije. Puno novih tehnika je još uvek u procesu razvoja. Napredne tehnike magnetno-rezonantnog imidžinga (pre svega magnetno-rezonantna spektroskopija (MRS), volumetrija, difuzioni tenzor imidžing (DTI) i funkcionalni magnetno-rezonantni imidžing (fMRI)) i pozitronska emisiona tomografija (PET) se koriste u dijagnostici HIV+ pacijenata [82].

### **1.7.1. Magnetno-rezonantna spektroskopija**

Najčešća metoda neuroimidžinga u ispitivanju neuroHIV infekcije u eri pre i posle uvođenja cART je magnetno-rezonantna spektroskopija [83]. Magnetno-rezonantna (MR) spektroskopija je dostupna metoda rutinskog kliničkog imidžinga za prostorno mapiranje multiplih tkivnih signala in vivo, u neurološkim, psihijatrijskim i metaboličkim bolestima. Lokalizovana MR spektroskopija ljudskog mozga je prvi put publikovana pre više od 25 godina, a danas se koristi u medicinskim centrima širom sveta, pre svega u dijagnostici tumora mozga [84].

Postoji nekoliko vrsta MRS, ali je najčešće u upotrebi protonska  $^1\text{H}$ -MRS, zbog svoje visoke senzitivnosti i jednostavne implementacije u komercijalno dostupne aparate. Postoje dve osnovne vrste prostorne lokalizacione tehnike MRS: jednovokselska tehnika (*single-voxel*, SV) i multivokselska (*multi-voxel*, MV) [85]. Jednovokselska magnetno-rezonantna spektroskopija snima spektre iz jednog regiona mozga u jednom momentu, korišćenjem metoda PRESS (*Point RESolved Spectroscopy*) i STEAM (*STimulation Echo Acquisition Mode*). Multivokselska magnetno-rezonantna spektroskopija, koja se naziva još i imidžingom hemijskog pomeraja,

*Chemical Shift Imaging* (CSI), simultano određuje spektre iz multiplih regiona i daje prostornu distribuciju metabolita unutar mozga. MV spektroskopija se tipično izvodi u dvodimenzionalnoj (2D) ili trodimenzionalnoj (3D) tehnici, zavisno od broja gradijenata koji se koriste za prostorno enkodiranje. Enkodiranje predstavlja proces lokalizovanja MR signala menjanjem faze spinova u jednoj dimenziji, pulsni gradijentom, duž te dimenzije pre akvizicije signala. Većina MV MRS studija se i dalje izvodi korišćenjem intermedijernog ili dugog vremena ehoa (TE) da bi se atenuirali signali masti (obzirom na male T2 vrednosti signala masti). Ovo je delom posledica teškoća u kvantifikaciji multiplih rezonancija koje se prekrivaju na kratkom TE. Međutim, korišćenje dugog TE rezultuje u značajno sniženoj senzitivnosti na signale metabolita zbog gubitka efekta T2 relaksacije i J-modulacije multiplih rezonancija, te je ograničeno na prikaz pikova i merenje koncentracija svega nekoliko metabolita. Poboljšana lokalizacija dozvoljava MV MRS mapiranje na mnogo kraćem TE, te omogućava određivanje koncentracija metabolita koji su se tradicionalno merili samo na SV MRS. Multivokselna MRS u kliničkim aplikacijama nikada ne obuhvata celu zapreminu mozga, već se ograničava na pokrivanje volumena od interesa (VOI) [86]. Pokrivanje volumena od interesa se naziva i prelokalizacijom volumena, a izvodi se iz sledećih razloga:

1. izbegavanje područja sa jakim statičkim i radiofrekventnim nehomogenostima polja, koje izazivaju distorziju spektralne linije
2. ograničenje veličine matriksa, pre svega u konvencionalnom faznom enkodiranju, što je neophodno za dobijanje klinički prihvatljivog vremena skeniranja
3. u cilju supresije perifernih signala vode i masti, odnosno sprečavanja kontaminacije spektara unutar regije od interesa [84].

Konvencionalna fazno-enkodirana MV MRS, kod koje se amplituda fazno enkodirajućeg gradijenta povećava jednom za jedno vreme repeticije (TR), je najčešće korišćena metoda i predstavlja zlatni standard za postizanje adekvatne senzitivnosti i adekvatnu lokalizaciju. MV MRS koristi modularne pulsne sekvence. Korišćenje faznog enkodiranja za dobijanje informacije o lokalizaciji omogućava kompletno vremensko razdvajanje prostornog enkodiranja od spektralnog, i prevenira nepoželjno širenje spektralne linije zbog aplikacije gradijenata. Fazno enkodiranje samo modulira fazu i amplitudu MR signala pre detekcije frekvencije signala

(spektralno enkodiranje), što osigurava nezavisnost modulacije faze i amplitude od prostornog enkodiranja. Rekonstrukcija podataka je jednostavna, korišćenjem Furijeove (Fourier) transformacije duž ortogonalnih prostornih i spektralnih dimenzija matriksa sa sirovim podacima. Lokalizacija faznog enkodiranja (korišćenjem konstantnog trajanja gradijenta faznog enkodiranja) takođe ne zavisi od hemijskog pomeraja i nehomogenosti magnetnog polja. Drugim rečima, distorzije slike zbog nehomogenosti polja ili hemijskog pomeraja nisu prisutne u MV MRS [87].

Prostorna lokalizacija u MV MRS ne može se objasniti bez uvođenja pojma širenja prostorne tačke (*spatial point spread- PSF*), koji objašnjava širenje signala od tačkastog izvora u okolne voksele. PSF je direktna posledica grube prostorne rezolucije u MV MRS u odnosu na anatomske imidžing. Molekulske koncentracije metabolita čiji se signali snimaju su najmanje 10.000 puta manje od vode, sa isto toliko puta slabijim signalom. Da bi se snimio ovako slab signal, MRS mora da koristi mnogo veći vokal (jedinicu zapremine iz koje se snimaju signali) u komparaciji sa MRI. Na aparatima magnetne indukcije od 3T se mogu meriti vokselne zapremine od  $0.3\text{cm}^3$ , a sa korišćenjem specijalnih kalemova i zapremine od oko  $0.1\text{cm}^3$ . Korišćenje većih jedinica zapremine smanjuje prostornu (spacijalnu) rezoluciju, što je uzrok mnogih problema u kvalitetu dobijenih spektara. PSF odražava problem artefakta zamagljivanja (*blurring*), obzirom da kombinacija faznog enkodiranja i rekonstrukcije slika uzrokuje da se signali metabolita prenose iz jednog u drugi vokal (objašnjenje: za tačkasti izvor u centru vokselni preseki PSF-a su tačno u centru susednog vokseli, tako da je slika tačkastog izvora jedan svetao vokal. Situacija je različita za tačkasti izvor na periferiji vokseli, što uzrokuje značajno širenje signala u susedne voksele.) [88]. Ovakvi artefakti se nazivaju Gibsovi (Gibbs), i prisutni su i u konvencionalnoj MRI, ali znatno manje izraženi u odnosu na MRS obzirom na veću prostornu rezoluciju. Da bi se smanjili Gibsovi artefakti, potrebno je da se primene agresivni filteri  $k$ -prostora u rekonstrukciji slike, koji suprimiraju spoljne regione  $k$ -prostora i redukuju prostornu rezoluciju (Sinebell, Fermi, Hamming filteri). Prostorno filtriranje se koristi tokom procesa rekonstrukcije slike da se smanji ovaj neželjeni efekat i da se poveća odnos signala i šuma (*signal-to-noise ratio*, SNR), ali ono zapravo povećava efektivnu veličinu vokseli. PSF može biti odgovoran za spektralne artefakte i efekat parcijalnog volumena. Da bi se dobili kvalitetni spektri iz posmatrane regije, potrebno je uraditi i optimalno šimovanje (optimizacija homogenosti magnetnog polja  $B_0$  u

lokalizovanom vremenu). Nehomogenosti magnetnog polja imaju veliki uticaj na enkodiranje  $k$ -prostora.  $K$ -prostor u centru spin eha je idealno simetričan u odnosu na liniju koja prolazi kroz centar  $k$ -prostora. U idealno šimovanoj sferi,  $k$ -prostor je nepromenjen duž vremenskog domena. Međutim, lokalni gradijent se meša sa gradijentima faznog enkodiranja i progresivno pomera centar  $k$ -prostor duž smera lokalnog gradijenta tokom spektralnog enkodiranja. Ovo rezultuje u proširivanju rekonstruisanih spektralnih linija. Šimovanje ima za cilj poništavanje efekta lokalnih gradijenata poništavanjem pomeraja signala u prostoru podataka, da bi se povratilo vremenski-nezavisno enkodiranje  $k$ -prostora. Povećavanje prostorne rezolucije povećava veličinu  $k$ -prostora, omogućava da divergentni signali iz regija sa nehomogenim magnetnim poljem ostanu duže unutar akviriranog prostora podataka, što sužava spektralnu liniju u ovim regijama [89].

MV MRS je senzitivna i na artefakte od pomeranja pacijenta, koji se akviriraju u svim prostornim ravnima, te na nehomogenosti polja unutar vokseli i unutar volumena od interesa (VOI), što uvodi pojam regionalnog širenja spektralne trake. Tipično je širina spektralne trake manja od 0.1 ppm (*part per million*) i ona je potrebna i dovoljna za adekvatnu kvantifikaciju podataka. Ukoliko postoje velike nehomogenosti magnetnog polja, ponekad je potrebno žrtvovati prekrivanje nekih anatomskih regiona. Neprihvatljive nehomogenosti polja su na spojevima tkivo-kost i tkivo-vazduh, te su regioni sa ovakvim tkivnim kombinacijama veoma teški za ispitivanje putem ove metode. U  $^1\text{H}$ -MRS često se javljaju artefakti vezani za signale vode i lipida, a u vezi sa nehomogenošću polja i PSF. Voda produkuje mnogo jači signal nego ciljani metaboliti, te je potrebno neutralisati (saturisati) signal vode. Pulsne sekvence u MRS koriste frekvenciono selektivne radiofrekventne (RF) pulseve da bi se saturisao signal vode, ali u delovima gde postoje prelazi različitih tkiva postoji tzv. hemijski pomeraj frekvencije. Baš iz tih regiona se mogu snimiti signali vode koji su pomeranih frekvencija, te ih proces saturacije vode ne suprimira adekvatno. Kontaminacija signala iz ovih regiona je obično teška za detekciju. Lipidni signali su oko 1000 puta jači od signala metabolita koji se snimaju putem spektroskopije, te je i njih potrebno dodatno suprimirati, odnosno saturisati. Zbog opisanih problema sa signalima vode i masti koji se „prelivaju” u voksele, potrebna je vrlo precizna prostorna lokalizacija. Većina  $^1\text{H}$ -MRS pulsnih sekvenci koristi procedure volumenske ekscitacije analogne onima u SV MRS, sa formiranjem regiona oblika kocke. Alternativni način je da se saturišu signali iz regiona koji će dati visoke lipidne signale ili imaju neprihvatljive nehomogenosti polja, ili se koristi anuliranje

lipida korišćenjem T1W STIR sekvenci (*Short T1 Inversion Recovery*). Iako se tako poboljšava ukupni kvalitet, prelokalizacija regiona oblika kocke unutar anatomskog polja od interesa može rezultovati značajnim gubitkom u pokrivanju volumena u perifernim regionima mozga [84].

$k$ -prostor je elegantan način za opis prostora sirovih podataka, koji daje univerzalan okvir za komparaciju različitih metoda prostornog enkodiranja i olakšava analizu lokalizacionih parametara i artefakata.  $k$ -prostor se formira iz seta periodičnih rotacija faze spina unutar objekta, a generisan je u sukcesivnim eksperimentima putem aplikacije gradijenata faznog enkodiranja (*spin wrap imaging*). Periodične rotacije faze spina, okarakterisane talasnom dužinom  $\lambda$ , povećavaju moment (amplituda  $G$  x vreme  $t$ ) aplikovanih gradijenata faznog enkodiranja. Periode variraju od beskonačnosti (bez faznog moduliranja u centru  $k$ -prostora) do veoma brzih perioda koje odgovaraju najmanjim segmentima u objektu. Prostorna frekvencija periode spina ( $=1/\lambda$ ) se izračunava kao:

$$k = 2\pi/\lambda = \gamma Gt$$

Formalizam  $k$ -prostora opisuje strukturu prostorno enkodiranih podataka u formi seta prostornih frekvencija, koja nakon Furijeove transformacije predstavlja sliku objekta. Svaka tačka u  $k$ -prostoru odgovara pojedinačnom signalu iz celokupnog volumena u prijemnom kalemu i predstavlja jedinstvenu prostornu modulaciju faze spina objekta duž smerova gradijenata faznog enkodiranja. Momenat gradijenata faznog enkodiranja određuje fazu rotacije koju prolazi svaki spin u odnosu na centar magneta [90]. Ova prostorna distribucija faza spinova generisana gradijentima faznog enkodiranja identifikuje svaku tačku objekta i omogućava prostornu rekonstrukciju slike. U MV MRS vremenska dimenzija koja odgovara spektralnom enkodiranju je orijentisana ortogonalno prema  $k$ -prostoru i formira  $k$ - $t$ -prostor, koji iz dvodimenzionalnog prostornog enkodiranja formira trodimenzionalni prostor ( $k_y$ - $k_x$ - $t$ ). Svaki presek  $k$ - $t$ -prostora u određenoj vremenskoj tački (vremenski presek) se može rekonstruisati u sliku putem Furijeove transformacije. Furijeova transformacija duž serije konsekventnih slika generiše lokalizovane spektre [91].

MRS signal hemijske supstance, frekvencije  $\omega$ , nakon aplikacije gradijenta faznog enkodiranja se definiše kao:

$$S(\mathbf{k}, t) = \int \sigma(\mathbf{x}) e^{i\omega t} e^{i2\pi \mathbf{k}\mathbf{x}} d\mathbf{x}$$

Gde je  $\sigma(\mathbf{x})$  denzitet spinova objekta duž vektorske dimenzije  $\mathbf{x}$  aplikovanog gradijenta faznog enkodiranja a  $\mathbf{k}$  je enkodirana spacijalna frekvencija. MR signali dobijeni sa raznim koracima faznog enkodiranja karakterišu distribuciju gustine spinova u objektu. Postoji pet jednostavnih pravila koja objašnjavaju enkodiranje  $\mathbf{k}$ -prostora :

1. veličina  $\mathbf{k}$ -prostora određuje prostornu rezoluciju
2. razmak između sukcesivnih tačaka (priraštaj faznog enkodiranja, ili veličina koraka) duž datog smera  $\mathbf{k}$ -prostora odgovara enkodiranom FOV-u duž odgovarajućeg smera
3. grube karakteristike objekta su enkodirane blizu centra  $\mathbf{k}$ -prostora (niske prostorne frekvencije)
4. detalji objekta su enkodirani na periferiji (visoke prostorne frekvencije)
5.  $\mathbf{k}$ -prostor u spin eho eksperimentu je simetričan u odnosu na centar (tačke na suprotnim stranama centra imaju identičnu amplitudu, ali kompleksnu konjugovanu fazu)

Fazno enkodiranje se mora izvesti u svim prostornim dimenzijama, što čini metodu dugotrajnom. Broj koraka faznog enkodiranja odgovara ukupnom broju voksela u spektroskopskoj slici. Na primer, da bi se akvirirao  $32 \times 32 \times 16$  trodimenzionalni matriks korišćenjem TR od 2s potrebno je 32.768s (više od 9h), što je apsolutno neprihvatljivo. Količina sirovih podataka za 2D matriks, koji se koristi u kliničkim studijama, dimenzija  $16 \times 16$ ,  $24 \times 24$ ,  $32 \times 32$ , je mnogo manja, ali i dalje zahtevaju dugo vreme akvizicije u konvencionalnoj MV MRS [92, 93].

Enkodiranje celog  $\mathbf{k}$ -prostora je suvišno, pa se parcijalno Furijeovo enkodiranje može razmotriti u smislu ubrzanja enkodiranja, iako nehomogenosti magnetnog polja i druge nesavršenosti limitiraju ovaj pristup. Često korišćena strategija za ubrzanje fazno enkodirane MRS je žrtvovanje visoke prostorne rezolucije po dijagonali, isecanjem ćoškova  $\mathbf{k}$ -prostora i

enkodiranjem eliptičnog ili sferičnog  $k$ -prostora (potrebno vreme za 3D enkodiranje se može smanjiti na polovinu). Ukupna prostorna kontaminacija signala i veličina vokselu su povećane u odnosu na pravougaono uzorkovanje. Ubrzanje MV MRS je veoma poželjno da bi se pokrio veći volumen, snizila osetljivost od pomeranja pacijenta i skratilo vreme skeniranja, koliko to SNR dozvoljava. Brze MRS metode su poželjne i zbog integracije visoko-rezolutivnih MRS metoda, kao što je korelaciona spektroskopija (CPSY) i *J-resolved* spektroskopija. Brze MRS metode spadaju u sledeće kategorije:

1. Ehoplanarni spektroskopski imidžing (EPSI), nekada često korišćen. Prednosti EPSI uključuju adekvatnu širinu spektralne linije na poljima do 3T u slučaju 1D imidžinga, visoku spektralnu rezoluciju i visoku senzitivnost u poređenju sa konvencionalnom MRS, te relativno jednostavnu rekonstrukciju podataka. Spiralna MRS za 2D i 3D imidžing daje još bržu akviziciju podataka. Međutim, rekonstrukcija podataka je zahtevnija i zahteva dosta korekcija; takođe, ovaj način zahteva dugo vreme snimanja i ograničava širinu spektralne linije koja se može dobiti.
2. Diksonova metoda je najbazičniji primer ehošiftinga, za razdvajanje signala vode i masti. Brze 2D imidžing metode, kao EPSI, brza akvizicija sa pojačanjem relaksacije (RARE) na spiralnoj MRI, su kombinovane sa eho šiftingom za brzo mapiranje moždanih metabolita. Ova metoda je efikasna za aplikacije koje zahtevaju ograničenu spektralnu rezoluciju.
3. Multiple spin eho akvizicije sa odvojenim faznim enkodiranjem pojedinačnih spin eho su razvijene za ubrzanje konvencionalne MRS. Međutim, spektralna rezolucija je snižena a mora se uraditi i korekcija  $k$ -prostora da bi se minimizirali artefakti zamagljivanja.
4. Paralelni imidžing sa korišćenjem kalemova sa faznom rešetkom se koristi za ubrzanje prostornog enkodiranja (uključujući *single shot* 2D enkodiranje). Međutim, ubrzanje enkodiranja se mora balansirati povećanjem šuma zbog smanjenog vremena akvizicije i greškama rekonstrukcije vezanim za  $g$ -faktor (koje mogu kompromitovati prostornu lokalizaciju i kvalitet spektara).

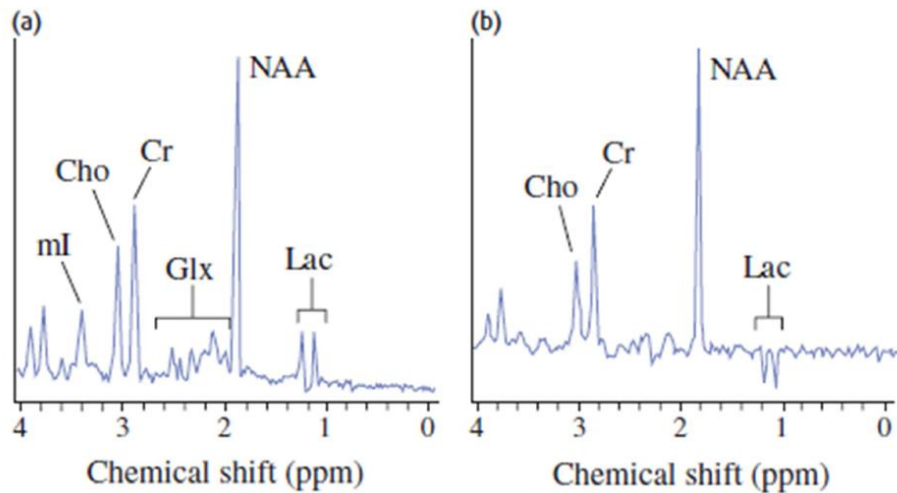
5. *Steady-State Free Precession* (SSFP) MRS daje ubrzanje i visoku senzitivnost za istu jedinicu vremena, ali zahteva žrtvovanje spektralne rezolucije na 1.5T i 3T. Takođe je osetljiva na efekte rezonancije, što remeti prekrivanje većeg volumena. Skorije studije pokazuju dobre rezultate kada se kombinuju SSFP sa eho-planarnim enkodiranjem i paralelnim imidžingom.
6. Spektralna lokalizacija putem imidžinga (*Spectral Localization by Imaging* (SLIM)) predložena je u situacijama gde je potrebna lokalizacija malog broja kompartmana različitih oblika.
7. Hadamard enkodiranje je uvedeno za situacije gde se zahteva minimalna interakcija među vokselima [94-100].

#### 1.7.1.1. Tipični spektar fantoma na $^1\text{H}$ MRS

Na slici 4. je prikazan protonski spektar fantoma sa supresijom vode. Molekuli čiji se pikovi jasno uočavaju i čije se koncentracije mere kao površine ispod krive, su:

1. N-acetil-aspartat (NAA), neuronski marker, koji se izdvaja pikom na 2.0 ppm
2. holinske komponente (Cho), marker integriteta ćelijske membrane, ćelijske proliferacije i inflamatornog odgovora. Izdvajaju se pikom na 3.2ppm.
3. kreatin (Cr), mera energetskeg metabolizma mozga i referentni marker, obzirom da se značajnije menja samo u malignim procesima. Izdvaja se pikom na 3.0ppm.
4. mioinozitol (mI), marker glioze (aktivnosti ćelija glije), odnosno produkt raspada mijelina, sa pikom na 3.6ppm.
5. glutamin i kompleks glutamata (Gln+Glx), su markeri neurotransmisije i ekscitotoksičnosti, sa pikom na 2.1-2.5ppm.
6. laktat/ lipid (Lac) je dublet koji predstavlja marker nekroze tkiva, izdvaja se pikom na 1.3ppm [101].





**Slika 4.** *Magnetno-rezonantni spektar fantoma koji prikazuje normalne koncentracije karakterističnih metabolita na tačno određenim talasnim dužinama, sa različitim vremenima eha a) kratki eho, TE=30ms, b) dugi eho, TE=135ms. mI- mioinozitol, Cho- holin, Cr- kreatin, NAA- N-acetil-aspartat, Glx- glutamati, Lac- laktati. (Ljubaznošću dr.sc. Jelene Ostojić)*

#### NAA

Dominantna rezonanca u spektru moždanog tkiva potiče od metil grupe N-acetil aspartata na 2.02 ppm. Koncentracija ovog metabolita, koji se nalazi samo u nervnom sistemu, jako varira u različitim regionima mozga i tokom životnih doba. Smešten je u neuronima, aksonima i dendritima, te se smanjuje u patološkim procesima koji pogađaju neurone, kao što su infarkt, tumori, multipla skleroza, demencije i sl.

#### Cho

Holin je prisutan na spektralnoj liniji sa svojim pikom na 3.22ppm, koji potiče od devet protona identičnih po magnetnim osobinama, raspoređenih u tri metil grupe. Holin ima još dve rezonantne linije, ali su one znatno manjeg intenziteta i preklapaju se sa drugim. U mozgu i mišićima, najveći doprinos piku holina daju fosforilholin i glicerofosforilholin. Komponente koje sadrže holin su uključene u puteve fosfolipidne sinteze i degradacije, te reflektuju sintezu i dezintegraciju membrane. Tipično, patološki procesi koji dovode do porasta pika Cho uključuju

aktivnu demijelinaciju (rezultat degradacije mijelinskih fosfolipida do glicerofosforilholina, ili povećanja broja glijalnih ćelija).

### *Cr*

U protonskom spektru normalnog tkiva mozga, singlet rezonance kreatina nalazi se na 3.03 ppm i 3.93 ppm. Ovi singleti potiču od kreatina i fosfokreatina. (Fosfo)kreatin igra ključnu ulogu u energetske metabolizmu tkiva, služi kao energetski depo održavajući nivo adenzin-3-fosfata (ATP) konstantnim. Takođe služi i kao transporter energije, obzirom da difunduje od mitohondrija do mesta na kojima se energija iskorištava. Suma kreatina i fosfokreatina u zdravih osoba je konstantna. Sinteza kreatina dešava se u jetri, te se nivou mogu poremetiti kod disfunkcije jetrenog parenhima. U mozgu je prisutan u neuronima i ćelijama glije, viši je u beloj masi nego u sivoj. Koristi se kao referentni signal, jer je njegov nivo u mozgu konstantan.

### *mI*

Rezonantne linije mioinozitola (mI) se nalaze na pozicijama 3.28ppm, 3.54ppm, 3.6ppm i 4.05 ppm, najizraženije na 3.56 ppm na kratkom ehu. Lokalizovan je u astrocitima, gde predstavlja regulator ćelijskog volumena, odnosno osmolit.

### *Glx+Gln*

Protonski spektar glutamina i glutamata se sastoji od kuplovanih rezonanci, te je njegoa interpretacija složena, posebno u svetlu zavisnosti od intenziteta magnetog polja (pri jačem polju smanjuju se efekti kuplovanja). Glutamat je jedan od glavnih ekscitativnih neurotransmitera u mozgu. Nalazi se u svim moždanim ćelijama, ali su koncentracije najveće u neuronima.

### *Lac*

Laktat je važan metabolički marker, sa singletom tri metil protona na 1.33ppm i kvartetom metinskog protona na 4.11ppm. Koncentracija značajno raste u aerobnim tkivima (mozak) u anaerobnim uslovima. Pik laktata se ne uočava na spektru normalnog moždanog tkiva, tako da samo njegovo prisustvo ukazuje na razvoj određenog patološkog procesa. Javlja se u slučaju mitohodrijalnog deficita, malignih promena (anaerobna glikoliza), invazije makrofaga i vaskularnog akcidenta, kao i u demijelinaciji, Alchajmerovoj demenciji [86].

### 1.7.2 Ostale metode neuroimidžinga u HAND-u

Volumetrijski MRI može odrediti strukturne razlike između HIV+ pacijenata i zdravih individua. Ova se tehnika koristi u proceni specifičnih struktura mozga ili na relativno velike zone mozga. U eri pre cART-a, značajan gubitak volumena je registrovan u bazalnim ganglijama, okcipitalnom korteksu, te beloj masi HIV+ pacijenata [102-104]. Najveće promene se uočavaju u odmaklim fazama HAND-a. U eri cART-a uočena je i kortikalna i supkortikalna atrofija, što sugeriše da promene u smislu volumnog gubitka napreduju bez obzira na inicijaciju efektivne terapije [105-107]. U novijim studijama pokazano je da volumetrijske promene koreliraju sa stepenom kognitivnog oštećenja i virološkim markerima. Slabija neurokognitivna postignuća su povezana sa redukcijom volumena moždanih struktura i većim virusnim titrom. Oštećen imuni odgovor (nizak nadir CD4+ T limfocita) je takođe povezan sa većom atrofijom mozga [108-110]. Kortikalna atrofija mozga i dilatacija treće moždane komore su uočene brzo nakon serokonverzije, odnosno pojave antitela na virusne proteine HIV-a [111].

Difuzioni tenzor imidžing (DTI) je postao popularan u proceni strukturalnog integriteta bele mase u HIV infekciji. Ova metoda meri difuziju molekula vode. U izotropnom stanju, kretanje molekula vode je podjednako u svim pravcima (na primer u likvoru). U tkivu mozga je kretanje vode anizotropno, sa difuzijom koja je veća duž pravca pružanja aksonalnih vlakana u poređenju na perpendikularni pravac. Za svaki voksel, izračunava se tenzor, koji opisuje trodimenzionalni oblik difuzije vode. Smer vlakana se određuje preko tenzorskog glavnog eigen vektora. Srednja difuzivnost (*mean diffusivity*- MD) određuje prosečnu difuziju u tri ose. Frakcionalna anizotropija (FA) procenjuje opšti oblik elipsoida [112-113]. Većina studija je pokazala da HIV dovodi do povećanja MD i sniženja FA unutar puteva bele mase. Međutim, suptilne razlike u mestu tih razlika su pokazane u različitim studijama. Do danas, nijedna studija nije posmatrala DTI promene brzo nakon serokonverzije [114-117].

Funkcionalni magnetno-rezonantni imidžing (fMRI) se bazira na nivou utilizacije kiseonika u krvi u regionima mozga koji su aktivirani. Promene u nivou kiseonika u krvi (*Blood Oxygen Level Dependent*- BOLD) kao odgovor na određeni stimulans indirektno pokazuju odnos neuronske aktivnosti i cerebralnog protoka krvi (*Cerebral Blood Flow*- CBF) u određenim regionima mozga.

HIV+ pacijenti imaju veću BOLD aktivnost u parijetalnim lobusima za jednostavne zadatke i veću aktivnost u frontalnim i parijetalnim lobusima za kompleksnije zadatke. Ove promene odražavaju angažman asocijativnih zona u odgovoru na postavljeni zadatak. Skorije meta-analize BOLD fMRI koje su koristile različite funkcionalne paradigme su pokazale veću aktivaciju levog donjeg frontalnog girusa i kaudalnog jedra kod HIV+ pacijenata. Disfunkcija fronto-strijatne mreže je kvalitativno povezana sa nivoom neurokognitivnog oštećenja. Promene kod HIV-pacijenata se uočavaju i kod primene fMRI u mirovanju (*resting state fMRI*). Funkcionalna povezanost neuronskih krugova u mozgu je značajno snižena kod HIV+ pacijenata sa potencijalnom patognomoničnom šemom oštećenja, koja je drugačija od drugih neurodegenerativnih oštećenja. U dostupnoj literaturi nisu evaluirani efekti korišćenja terapije u sklopu cART [118-120].

Pozitronska emisiona tomografija (PET) koja koristi fluoro-deoksi-glukozu (FDG) meri metaboličku aktivnost različitih tkiva (pre svega neoplastičnih). U mozgu, stepen preuzimanja FDG od strane neurona se koristi u dijagnostici mnogih poremećaja, pre svega u Alchajmerovoj demenciji i Parkinsonovoj bolesti. U neuroHIV-u, rane FDG-PET studije su pokazale slabije preuzimanje FDG kod HIV+ pacijenata u odnosu na zdrave kontrole, iako na MRI nisu utvrđene strukturne abnormalnosti. Postoje dva osnovna tipa promena u metabolizmu glukoze koje su povezane sa HIV infekcijom. Prva je hipermetaboličko stanje, pre svega u strijatumu, koje odražava specifičnu meru ranog zahvatanja CNS-a, a bez dokazanog motornog oštećenja na neuropsihološkom testiranju. Ovo može da odražava prekide u supkortikalnim vezama neurona. Drugi tip promena se uočava u hroničnim fazama bolesti i karakteriše se generalizovanim hipometabolizmom u kortikalnim i supkortikalnim zonama. Ove promene koreliraju sa dobi, cerebralnom atrofijom i neurokognitivnim statusom. Prelaz iz hiper- u hipometaboličko stanje u supkortikalnim zonama predstavlja odraz funkcionalnog deficita i progresije blažeg kognitivnog oštećenja u demenciju. U eri cART-a, diskretnije promene na FDG-PET skenu su uočene i u optimalno tretiranih HIV+ pacijenata sa virološkom supresijom. Oko polovine HIV-pacijenata imaju različit nivo hipometabolizma u mezijalnim frontalnim lobusima. Primećena je sinergistična interakcija između starenja i HIV infekcije, pre svega u frontalnim regionima [121-123].

## 1.8. Skrining i terapijske mogućnosti za HAND

Skrining na neurokognitivni poremećaj povezan sa HIV infekcijom je preporučljiv kod svih HIV+ pacijenata, bez obzira na status primenjene terapije. Idealno je da se skrining izvede pre uvođenja cART da bi se dobio uvid u početno stanje. Skrining bi trebalo ponavljati svakih 6-24 meseci, prema profilu rizika kod svakog individualnog pacijenta. Internacionalna skala HIV demencije, *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA) test i *General Practitioner Assessment of Cognition* (GPCOG) su validni kao skrining instrumenti [124-125]. Kada rezultati testa upućuju na kognitivno oštećenje, potrebna je dalja neurološka i neuropsihološka obrada. Prema patogenezi HAND-a, terapija bi trebala biti usmerena na supresiju virusne replikacije u CNS-u. Iako je CNS poseban kompartman u smislu virusne replikacije, inicijacija cART-a kod pacijenata dovodi do brzog pada virusnog titra u likvoru. Obično je oporavak drastičan u slučajevima razvijene HAD, a mnogo slabiji u slučajevima blagog neurokognitivnog poremećaja. Pacijenti sa HAD mogu povratiti radnu sposobnost i nezavisnost od tuđe nege za oko 3-9 meseci. Tokom prvih meseci terapije, i uprkos kliničkom poboljšanju, radiološki znaci leukoencefalopatije mogu biti čak i izraženiji, ali se vremenom ipak povlače.

Indikacija za uvođenje cART kod pacijenata sa simptomatskim HAND-om je jasna, pre svega sa ciljem supresije replikacije virusa u plazmi i cerebrospinalnoj tečnosti. Još uvek nije jasno koje komponente ART i u kojoj kombinaciji su najbolje za prevenciju HAND-a. Obim penetracije u centralni nervni sistem, likvorski prostor i parenhim mozga se smatra esencijalnim faktorom, a meri se pomoću dva indeksa:

1. CPE indeks (*CNS penetration efficacy*) je sastavljen od relativnih vrednosti penetracije supstanci i njihovih komponenti u CNS, i podeljen u 4 kategorije (1-4), gde niži skor označava niži stepen penetracije u CNS [126, 127]. Međutim, nije jasno da li je viši CPE povezan sa boljim kliničkim, odnosno neurokognitivnim odgovorom. Većina studija je pokazala skroman ali pozitivan efekat [128]. Pojedinačne vrednosti lekova predstavljene su u tabeli 3.

**Tabela 3.** CPE skor za pojedinačne lekove iz režima kombinovane antiretroviralne terapije.

CPE skor	4	3	2	1
<i>Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze</i>	ZIDOVUDIN	ABAKAVIR EMTRICITABIN	DIDANOZIN LAMIVUDIN STAVUDIN	TENOFOVIR ZALCITABIN
<i>Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze</i>	NEVIRAPIN	DELAVIRDIN EFAVIRENC	ETRAVIRIN	
<i>Inhibitori proteaze</i>	INDINAVIR-R	DARUNAVIR-R FOSAMPRENAVIR-R INDINAVIR LOPINAVIR-R	ATANAZAVIR-R ATANAZAVIR FOSAMPRENAVIR	NELFINAVIR RITONAVIR SAKVINAVIR-R SAKVINAVIR TIPRANAVIR-R
<i>Inhibitori fuzije</i>		MARAVIROK		ENFUVIRTID
<i>Inhibitori integraze</i>		RALTEGRAVIR		

2. ME indeks (*Monocyte Efficacy*), je formiran nakon potvrđivanja patogene uloge monocita. Definisani su za svaki režim antiretroviralne terapije kao suma pojedinačnih komponenti terapijskog režima bazirano na srednjoj efektivnoj koncentraciji ( $EC_{50}$ ), dobijenoj na modelu akutne infekcije na mirujućim makrofazima [129]. Pojedini lekovi nemaju definisane vrednosti  $EC_{50}$  (atanazavir i lopinavir). Vrednosti  $EC_{50}$  i ME skor za pojedinačne lekove iz cART je sumiran u tabeli 4. Ovaj je indeks usko povezan sa promenama u kogniciji i kognitivnim disfunkcijama [130].

Kombinovana antiretroviralna terapija (cART) snižava broj kopija virusa u perifernom krvotoku i u centralnom nervnom sistemu, te je veoma značajna za signifikantno smanjenje incidence i prevalencije teških formi HAND-a. Međutim, skorije kliničke studije i meta-analiza pacijenata na cART je pokazala postojanje blaže forme neurološke disfunkcije (ANI i MND) u više od polovine HIV+ pacijenata.

**Tabela 4.**  $EC_{50}$  vrednosti za akutnu infekciju za različite antiretroviralne lekove u primarnim makrofazima i izračunati ME skorovi.

Antiretroviralni lek	$EC_{50}$ vrednosti	ME skor
<b>Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze</b>		
ABAKAVIR	300	3
DIDANOZIN	50	20
EMTRICITABIN	80	12.5
LAMIVUDIN	20	50
STAVUDIN	240	4
TENOFOVIR	20	50
ZALCITABIN	3	333
ZIDOVUDIN	20	50
<b>Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze</b>		
DELAVIRDIN	10	100
EFAVIRENC	10	100
NEVIRAPIN	50	20
<b>Inhibitori proteaze</b>		
AMPRENAVIR	10	100
INDINAVIR	60	17
NALFINAVIR	80	12.5
RITONAVIR	120	8.3
SAKVINAVIR	50	20
<b>Inhibitor fuzije</b>		
ENFUVIRTID	20	50

U studijama koje su ispitivale pojedince sa ART-kontrolisanom viremijom, HIV DNK u mikrovaskularnim ćelijama mozga je korelirala sa regionalnom atrofijom mozga, što je ukazalo na ulogu perifernih rezervoara virusa u patologiji CNS-a. Čak i modifikovana ART, koja uključuje lekove sa boljim indeksom efikasnosti prodora u CNS (mereno preko CPE indeksa), pokazuje slab učinak. Mnogi od prikazanih načina delovanja virusa i virusnih proteina na neurone (citokini, hemokini, oksidativni stres) su refrakterni na antiretroviralnu terapiju. Korišćenje antiinflamatornih i anti-ekscitotoksičnih lekova (minociklin, derivat tetraciklina druge generacije) i memantina (NMDAR blokator), koji prolaze hematoencefalnu barijeru, se pokazalo

korisnim na životinjskim modelima, i trenutno se ispituje kao adjuvantna terapija HAND-a. Nekoliko neuroprotektivnih faktora, endogenih i egzogenih, su predloženi kao alternativna terapija, sa fokusom na eliminaciju neuroinflamacije kao odgovora na izloženost HIV-u. Intranazalna upotreba insulina, IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) i neurotrofina se pokazala delotvornom kod životinjskih modela. *In vitro* studije su pokazale da su nanopartikli na bazi zlata i lipida sposobni da prenesu cART i antiinflamatorne/ antiiekscitotoksične lekove kroz HEB i specifično napadnu rezervoare HIV virusa. Natalizumab, monoklonalno antitelo protiv alfa-4-integrina, blokira promet leukocita kroz HEB, te se pokazao delotvoran na modelima majmuna.

Nekoliko ne-antiretroviralnih supstanci je u skorije vreme korišćeno kao adjuvantna terapija za HAND (minociklin, memantin, selegilin, litijum, valproat, leksipafant, CPI-1189, peptid T, nimodipin, psihostimulansi, rivastigmin). Iako su se svi pokazali bezbednim, nijedan nije dao značajne kliničke efekte [131].

Novi inovativni režimi terapije, u kombinaciji sa neuroART, bi trebali pridoneti terapiji HAND-a kod populacije HIV-inficiranih, koja doživljava sve stariju životnu dob. Pristup terapiji HAND-a u budućnosti će uključivati ne samo pažljiv izbor antiretroviralnih lekova sa boljom penetracijom u CNS (mereno preko oba indeksa, CPE i ME), već i korišćenje neuroprotektivnih agenasa u modulaciji faktora domaćina u budućnosti.

Značajni nezavisni prediktori HANDa u eri pre cART-a bili su detektabilna viremija i slaba imunska rekonstitucija, ali u eri posle uvođenja cART-a to su: nizak nadir CD4+ broj T-limfocita, prethodni AIDS, duže trajanje infekcije HIV-om, niži stepen obrazovanja, starija dob, nivoi TNF- $\alpha$  i MCP-1 u plazmi (*monocyte chemoattractant protein 1*), zloupotreba narkotika i komorbiditet [78]. Nastanak i/ili trajanje HAND-a uprkos efikasnoj supresiji virusne replikacije u plazmi, može biti posledica hronične aktivacije imunog sistema unutar CNS-a (potkrepljeno visokim nivoima neopterina i anti-MOG antitelima (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG) u likvoru, te mikroglijalnom aktivacijom na PET-u). Ovo zapažanje može da objasni nepodudaranje mehanizama inflamacije unutar CNS-a i onih u perifernom kompartmanu.

Neurotoksičnost antiretroviralnih supstanci je faktor koji se može razmatrati kod pacijenata koji razvijaju ili održavaju neurokognitivni ili psihijatrijski poremećaj. Neuropsihijatrijski poremećaji su najbolje dokumentovani za efavirenc, ali su oni uglavnom prolaznog karaktera. U nekim



studijama je pokazano da se stepen kognitivne disfunkcije smanjuje sa prekidanjem cART-a, ali su ovi zaključci vremenom dovedeni u pitanje. Kompletni prekid terapije se ni u kom slučaju ne preporučuje, ali je potrebna modulacija terapijskog režima ukoliko se sumnja na neurotoksičnost [132].

U prošlosti je tačka započinjanja cART u svetlu prevencije kognitivnih poremećaja bila predmet diskusije a danas ga većina vodiča preporučuje kod svih HIV+ pacijenata nezavisno od faze bolesti. Aktuelni EACS (*European AIDS Clinical Society*) vodič iz oktobra 2015, preporučuje započinjanje cART odmah nakon postavljanja dijagnoze HIV infekcije [133] što je u skladu sa rezultatima nedavnih studija [134].

Danas je mnogo bolje razumevanje preciznih mehanizama od strane domaćina, koji su medijatori neurotoksičnosti kod infekcije HIV-om (kao posledica izloženosti HIV virusu, specifičnim viralnim proteinima ili HIV-inficiranim ćelijama). Povećava se obim saznanja o putevima neurotoksičnosti, kao i regionalnim genetskim varijacijama virusnih podtipova koji dovode do interregionalnih razlika u težini kliničke slike. Ukazuju se brojne mogućnosti da se na specifičan način spreči neurotoksičnost virusnih i proteina domaćina, kao i da se razviju neuroprotektivni faktori da bi se ublažio negativan uticaj virusa HIV-a na mozak.

Pregledom savremene dostupne literature, nisu pronađene studije sa primenom multivokselne magnetno-rezonantne spektroskopije bele i sive mase na aparatu jačine magnetnog polja od 3T. Ranije studije su rađene pretežno jednovokselnom MR spektroskopijom na aparatima jačine magnetnog polja 1.5T i 3T [135, 136]. Za razliku od pređašnjih studija, naša studija je rađena na uzorku od ukupno 60 HIV+ pacijenata, dok su ranije studije rađene na manjem broju uzoraka. Literaturni podaci jasno sugerišu korelacije odnosa metabolita sa imunološkim i serološkim parametrima, kao i sa rezultatima obimnih neuropsiholoških testiranja [134]. Konačno, u literaturi nisu publikovani rezultati korelacija neurobiohemijskog profila mozga i parametara penetracije antiretroviralne terapije (CPE i ME indeksi) u centralni nervni sistem.

## 2. CILJEVI

Ciljevi ove studije su:

1. Utvrditi da li postoje promene u odnosima koncentracija tipičnih metabolita u mozgu dobijenih metodom multivokselne magnetno-rezonantne spektroskopije u neurološki asimptomatskih HIV+ pacijenata u poređenju sa zdravim kontrolnim subjektima.
2. Utvrditi da li postoje značajne razlike u odnosima metabolita mozga dobijenih metodom MRS kod HIV+ pacijenata, koji su na kontinuiranoj cART i kod HIV+ pacijenata, kod kojih nije inicirana cART.
3. Utvrditi da li postoji i kakva je povezanost odnosa moždanih metabolita dobijenih MR spektroskopijom sa imunološkim parametrima HIV+ pacijenata (brojem CD4+, CD3+ i CD8+ T-limfocita u plazmi, te odnosom CD4+/CD8+ T-limfocita).
4. Utvrditi da li postoji i kakva je povezanost dobijenih odnosa metabolita mozga (pre svega parametara neuronskog oštećenja) sa nivoom nadir CD4+ T-limfocita.
5. Utvrditi da li postoji i kakva je povezanost dobijenih odnosa metabolita dobijenih MR spektroskopijom mozga sa parametrima penetracije antiretroviralne terapije u centralni nervni sistem (mereno indeksima CPE i ME).

### 3. HIPOTEZE

Radne hipoteze studije su:

1. Postoji značajna razlika u nivoima odnosa metabolita mozga kod HIV+ pacijenata i zdravih kontrolnih subjekata, pre svega u smislu smanjenja odnosa NAA/Cr, te povišenja odnosa Cho/Cr i mI/Cr kod HIV+ pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike.
2. Postoji značajna razlika u nivoima odnosa metabolita mozga kod HIV+ pacijenata koji su na kontinuiranoj cART i onih koji nisu na terapiji. Postoji viši nivo parametara inflamacije (odnos Cho/Cr i mI/Cr) kod HIV+ pacijenata koji nisu na terapiji antiretroviralnim lekovima.
3. Postoji povezanost imunoloških parametara (CD4+, CD3+, CD8+ T-limfocita i odnosa CD4+/CD8+ T-limfocita) sa nivoima odnosa metabolita u mozgu, dobijenih metodom multivokselne MR spektroskopije. Postoji pozitivna korelacija imunoloških parametara sa nivoom NAA/Cr odnosa i negativna korelacija sa nivoima Cho/Cr i mI/Cr.
4. Postoji povezanost nivoa nadir CD4+ T-limfocita sa parametrima neurobiohemizma, u smislu pozitivne korelacije nadir CD4+ T-limfocita sa odnosom NAA/Cr i negativne korelacije nadir CD4+ T-limfocita sa odnosima Cho/Cr i mI/Cr.
5. Postoji povezanost parametara penetracije antiretroviralne terapije u centralni nervni sistem sa odnosima metabolita dobijenih metodom MRS. Postoji pozitivna korelacija CPE i ME indeksa sa nivoima NAA/Cr, te negativna korelacija CPE i ME sa Cho/Cr i mI/Cr.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Učesnici u studiji

U studiju je uključeno ukupno 114 subjekata, podeljenih u tri grupe:

1. Prvu grupu sačinjavalo je 32 HIV+ pacijenta, koji su na kontinuiranoj kombinovanoj antiretroviralnoj terapiji (28 muškaraca i 4 žene), prosečne starosti 41.97 godina (25-61). Ova grupa je primala terapiju prosečno 5.6 godina (1-16) godina, sa kontrolisanim virusnim titrom u plazmi (ispod 40 kopija virusne RNK u plazmi).
2. Drugu grupu činilo je 28 HIV+ pacijenata, kod kojih nije inicirana terapija antiretroviralnim lekovima (26 muškaraca i 2 žene), prosečne starosti 35.21 godina (24-52).
3. Treću grupu činilo je 50 kontrolnih, zdravih subjekata (48 muškaraca i 2 žene), prosečne starosti 36.56 godina (19-53).

Svi ispitanici su potpisali informisani pristanak za učešće u studiji. Ispitivanje je odobreno od strane Etičke komisije Instituta za onkologiju Vojvodine, kao i Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Kriterijum za uključivanje pacijenata u studiju je bio prisustvo HIV infekcije potvrđene PCR (*polymerase chain reaction*) testiranjem. Nije postavljena granična vrednost broja CD4+ T-limfocita u plazmi. Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije su bili: prisustvo aktivne oportunističke infekcije, prisustvo aktivnog neurološkog oboljenja, podatak o aktivnoj zloupotrebi narkotika, koinfekcija virusom hepatitisa B i C, prisustvo lezija bele ili sive mase na konvencionalnom MRI i kontraindikacije za snimanje na aparatu za magnetnu rezonancu. 4 subjekta su isključena iz ispitivanja (3 HIV+ pacijenta i jedan kontrolni ispitanik, zbog prisustva fokalnih ili difuznih lezija bele mase).

## **4.2. Neuropsihološko testiranje**

Svaki pacijent je podvrgnut kratkom neuropsihološkom testiranju od strane iskusnog kliničkog psihologa. Korišćen je *International HIV Dementia Scale* test (IHDS), koji se koristi za skrining globalnog neurokognitivnog poremećaja u HIV-infekciji. Test se sastoji iz nekoliko jednostavnih zadataka koje pacijent treba da obavi (radi procene motorne brzine, psihomotorne brzine i memorije/ prisećanja). Maksimalni skor na IHDS testu je 12. Kod svih pacijenata kod kojih je ukupan IHDS skor ispod 10, vrši se dalja neuropsihološka procena u pravcu razvoja moguće demencije.

## **4.3. Laboratorijski testovi**

Svim HIV+ pacijentima su u momentu uključivanja u studiju određene vrednosti osnovnih parametara T-limfocita (broj CD4+, CD3+, CD8+ T-limfocita i odnos CD4+/CD8+) kao i virusni titar HIV RNK u plazmi, na Klinici za infektivne bolesti, Kliničkog centra Vojvodine. Za sve HIV+ pacijente određen je broj nadir CD4+ limfocita. Broj T-limfocita je meren na svežim uzorcima venske krvi, dok je nivo HIV RNK određivan na ultrasenzitivnom Amplicor HIV Monitoru V 1.5, Roche Molecular Diagnostic Systems, Bazel, Švajcarska.

## **4.4. Neuroimidžing**

Svim ispitanicima je urađen konvencionalni MR imidžing sa sledstvenom multivokselnom MR spektroskopijom na aparatu jačine magnetnog polja od 3Tesla (Trio Tim, Siemens, Erlangen, Nemačka), sa korišćenjem kalema za glavu. Konvencionalni MR imidžing se sastojao od T1W sagitalnih spin eho tomograma (TR/TE 440ms/3.8ms, debljina preseka 5mm, trajanje 2:00min), T2W turbo spin eho transverzalnih tomograma (TR/TE 5150ms/105ms, debljina preseka 5mm, trajanje 2:57min), FLAIR transverzalnih tomograma (TR/TE 8000ms/101ms, debljina preseka 5mm, 3:30min), difuzonog imidžinga (DWI) (TR/TE 4100ms/91ms, debljina preseka 5mm, trajanje 2:07min), koronalnih T2W turbo spin eho tomograma (TR/TE 7150ms/111ms, debljina preseka 5mm, trajanje 2:17min) te 3D T1W MPR sagitalnih tomograma (TR/TE 1530ms/2.97ms,

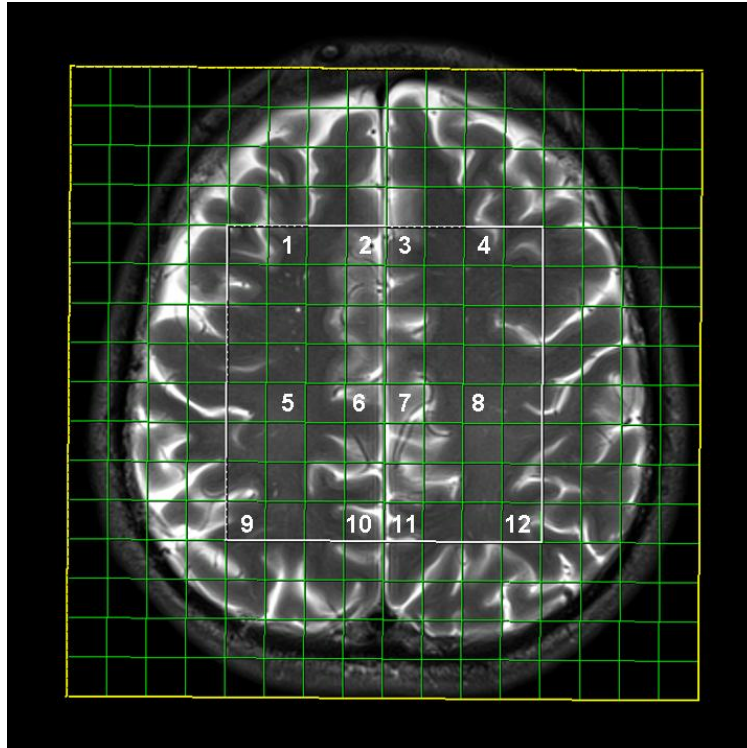
debljina preseka 1mm, trajanje 5:12min). Konvencionalni imidžing je poslužio za isključivanje eventualnih fokalnih ili difuznih lezija bele i sive mase, te za trodimenzionalno pozicioniranje regije od interesa spektroskopskog imidžinga (mreže vokseli).

3D multivokselna MR spektroskopija suprakalozalne bele i sive mase je urađena kod svih subjekata uključenih u studiju. Za dobijanje spektroskopskih podataka korišćena je protonska 3D MRS putem Point RESolved Spectroscopy metode (PRESS), sa TR/TE za dugi eho 1700/135ms i za kratki eho 1700/30ms. Dimenzije sleba na CSI spektroskopskom imidžingu određene su sledećim parametrima: veličina FOV-a je bila 160x160x160mm, volumen od interesa (VOI) 80x80x80mm, debljina sleba 10mm. Mreža vokseli je postavljena neposredno iznad korpusa kalozuma duž anteriorno-posteriorne komisure, u cilju određivanja spektara iz supkortikalne bele mase te duboke bele mase centra semiovale frontalnih i parijetalnih lobusa. MRS sive mase je određivan unutar korteksa parafalksnih struktura prednjeg i zadnjeg cingularnog girusa. Broj koraka faznog enkodiranja je bio 16 u svim pravcima (desno-levo, anteriorno-posteriorno i kaudalno-kranijalno). Rezolucija interpolacije je bila 16 u svim pravcima, sa dobijanjem VOI od 10x10x10mm, a vreme akvizicije 8.17min za MRS dugog eha i min za MRS kratkog eha. Saturacija signala i područja van VOI je izvršena primenom 6 regiona saturacije, koji su postavljani manuelno, duž ivica VOI. Homogenost magnetnog polja je optimizovana korišćenjem automatskog, volumen-selektivnog šimovanja. Region od interesa je kod svakog pacijenta postavljan na identičan način, u cilju osiguranja reproducibilnosti podataka, uzimajući u obzir anatomske varijacije. Spektri sa niskom SNR-om su isključivani i repositionirani do dobijanja spektara zadovoljavajućeg kvaliteta. Konačno je dobijena mreža od 64 vokseli (8x8).

Analizirano je 12 spektara dobijenih metodom dugog i kratkog eha u suprakalozalnoj sivoj i beloj masi mozga na sledećim anatomskim pozicijama:

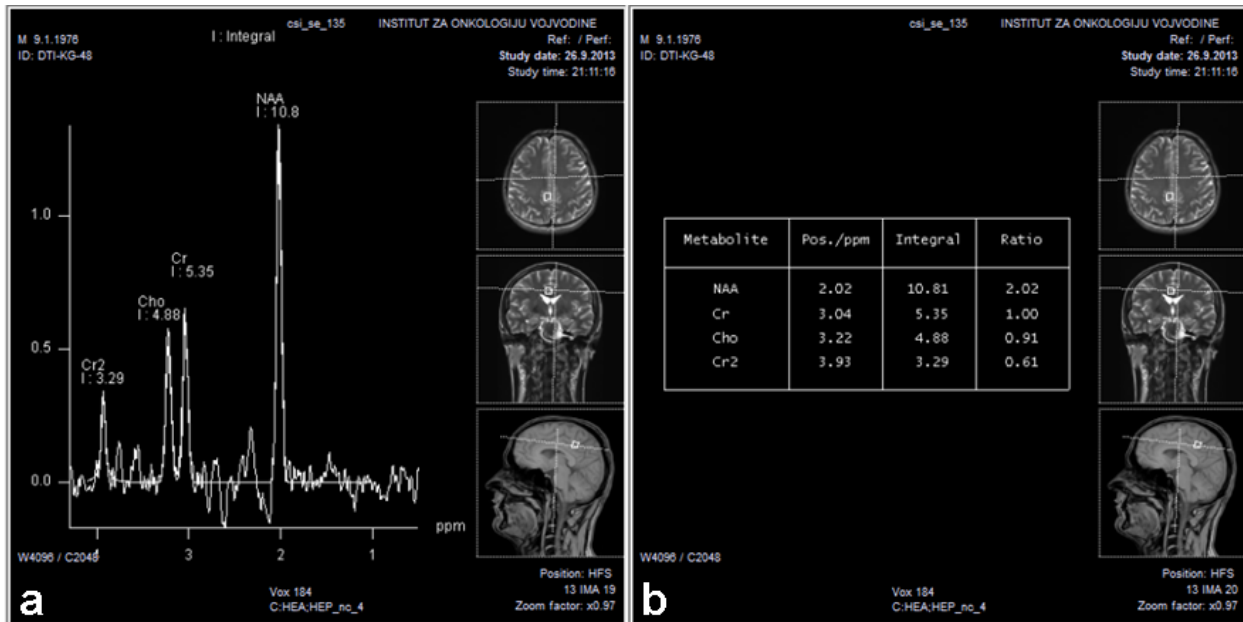
1. frontalna supkortikalna bela masa desne hemisfere cerebruma
2. siva masa ventralnog dela prednjeg cingularnog girusa desne cerebralne hemisfere
3. siva masa ventralnog dela prednjeg cingularnog girusa leve cerebralne hemisfere
4. frontalna supkortikalna bela masa leve hemisfere cerebruma
5. duboka bela masa (centrum semiovale) frontalno desno
6. siva masa dorzalnog dela prednjeg cingularnog girusa desne cerebralne hemisfere

7. siva masa dorzalnog dela prednjeg cingularnog girusa leve cerebralne hemisfere
8. duboka bela masa (centrum semiovale) frontalno levo
9. supkortikalna bela masa parijetalno desno
10. siva masa zadnjeg cingularnog girusa desne cerebralne hemisfere
11. siva masa zadnjeg cingularnog girusa leve cerebralne hemisfere
12. supkortikalna bela masa parijetalno levo (Slika 5).

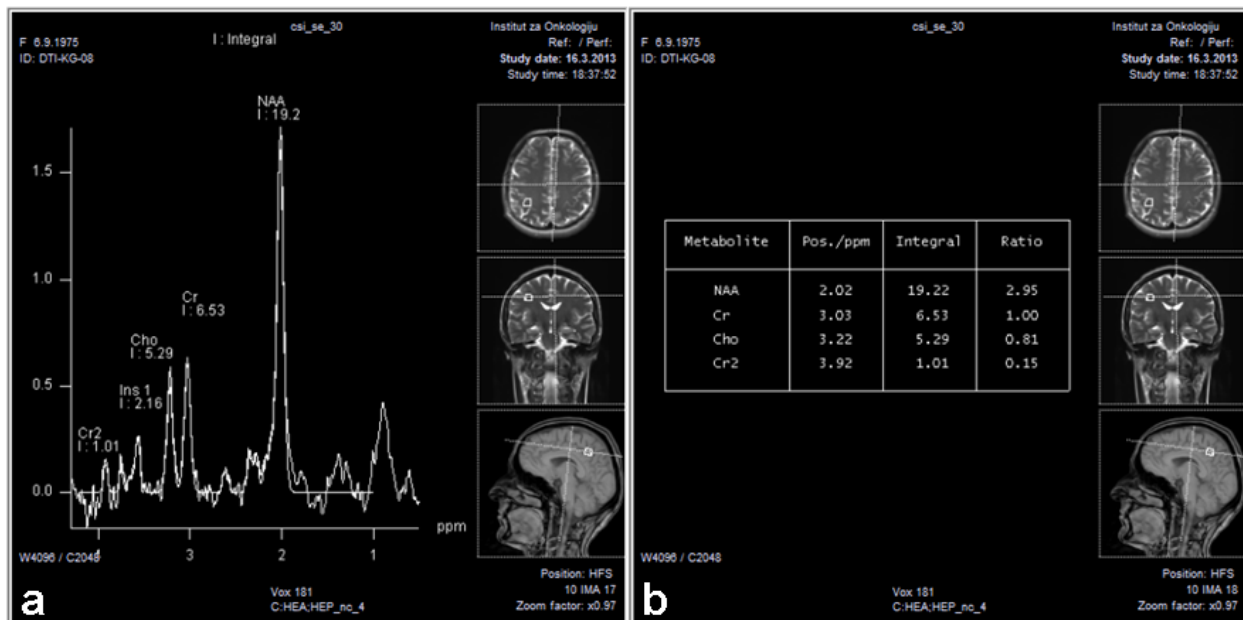


**Slika 5.** Vokselska mreža dobijena multivokselskom MR spektroskopijom suprakalozalne sive i bele mase, na transverzalnom T2W tomogramu kod 30-godišnjeg zdravog muškarca. Vokselske lokalizacije odgovaraju sledećim anatomskim: 1- supkortikalna bela masa frontalno desno, 2- siva masa ventralnog dela prednjeg cinguluma desno i 3- levo, 4- supkortikalna bela masa frontalno levo, 5- duboka bela masa frontalno desno, 6- siva masa dorzalnog dela prednjeg cinguluma desno i 7- levo, 8- duboka bela masa frontalno levo, 9- supkortikalna parijetalna bela masa desno, 10- siva masa zadnjeg cinguluma desno i 11- levo, 12- supkortikalna bela masa parijetalno levo.

Ukupno je analizirano više od 7900 spektara. Na metodi dugog eha analizirana su tri glavna pika: NAA na 2.0ppm, Cho na 3.2ppm i tCr na 3.ppm, izražena preko odnosa koncentracija NAA/Cr i Cho/Cr (Slika 6).



**Slika 6.** Multivokselna MRS dugog eha (a) kod kontrolnog ispitanika u regiji posteriornog cingularnog girusa desno (voksel 10), koji pokazuje normalne odnose NAA/Cr (2.02) i Cho/Cr (0.91) (b).



**Slika 7.** Normalan spektar (a) kratkog eha kod kontrolnog ispitanika, dobijen iz supkortikalne bele mase parijetalno desno (voksel 9), prikazuje normalne odnose ispitivanih metabolita (NAA/Cr=2.95, Cho/Cr=0.81, mI/Cr=0.15) (b).



Na metodi kratkog eha analizirani su signali NAA, Cho, Cr te mI na 3.5ppm i Glx+Gln (izdvojen kao kvadriplet) na 2.2-2.4ppm (Slika 7). Ovi signali su izraženi kroz odnose koncentracija NAA/Cr, Cho/Cr, mI/Cr i (Glx+Gln)/Cr.

#### **4.5. Statistička obrada podataka**

Za statističku obradu podataka korišćen je IBM SPSS ver. 21.0 (Chicago, IL, SAD) softverski paket. Obzirom da su svi ispitanici snimljeni na istom MR aparatu, potencijalne skener-zavisne razlike među pacijentima nisu postojale. Deskriptivna statistika je uključila određivanje srednje vrednosti, minimuma, maksimuma i standardne devijacije. Razlike između posmatranih grupa ispitanika (HIV+ pacijenti na cART, HIV+ pacijenti bez uvedene terapije i kontrolni zdravi subjekti) za sve kontinuirane varijable uključujući godine života, ispitivane su jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa naknadnim (post-hoc) testovima za koje je korišćena metoda po *Tukey*-ju. Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti, standardne devijacije, najviše i najniže izmerene vrednosti (maksimum i minimum), i za svaki ispitivani parametar pridružena je vrednost F i p. Veza između kontinuiranih varijabli je ispitivana pomoću koeficijenta Pirsonove linearne korelacije (*Pearson linear correlation test*), uz prethodnu proveru zadovoljavanja uslova o homogenosti varijansi, normalnosti raspodele i linearnosti. Vrednosti  $p < 0.05$  su uzimane kao statistički značajne.

## 5. REZULTATI

Nakon provere distribucije varijabli i uklanjanja ekstremnih vrednosti, utvrđeno je da sve ispitivane varijable ispunjavaju uslove za korišćenje parametrijskih statističkih tehnika (normalnost raspodele izražene kroz Komologorov-Smirnovljev test, mere zakrivljenosti i spljoštenosti raspodele, zatim uslov homogenosti varijanse izražen kroz Levenov test jednakosti varijansi). Takođe je izvršena provera ispunjenosti pojedinačnih za dodatne „*post hoc*” testove.

Raspodele koncentracija ispitivanih parametara prikazane su grafički pomoću pravougaonih dijagrama (*boxplot*). Središnja horizontalna linija koja prolazi kroz pravougaonik predstavlja medijanu, dok sam pravougaonik označava interkvartilnu vrednost (Q1-Q3) tj. raspon vrednosti ispitivanog obeležja koje je zabeleženo kod 50% slučajeva (onih koji se nalaze u sredini distribucije frekvencije). Tzv. “repovi” koji izlaze iz pravougaonika idu od najnižih do najviših zabeleženih vrednosti (minimum i maksimum). Kružićima su označene netipične vrednosti (*outlayer*), kojima se smatra svaka izmerena vrednost koja je od ivica pravougaonika udaljena više od 1,5 njegove dužine, dok se ekstremnim vrednostima smatraju izmerene vrednosti koje su od ivica pravougaonika udaljene više od 3 njegove dužine.

Razlike između posmatranih grupa ispitanika (HIV+ pacijenti na cART, HIV+ pacijenti bez uvedene terapije i kontrolni zdravi ispitanici) za sve kontinuirane varijable, uključujući godine života i odnose metabolita na svim posmatranim lokalizacijama, ispitivane su jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa naknadnim (*post-hoc*) testovima za koje je odabrana metoda po *Tukey*-ju. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti, standardne devijacije, najviše i najniže izmerene vrednosti (maksimum i minimum), i za svaki ispitivani parametar data je vrednost F i p.

Ispitivanje veza između kontinuiranih varijabli ispitivano je pomoću koeficijenta Pirsonove linearne korelacije, nakon prethodne provere zadovoljavanja uslova o homogenosti varijansi, normalnosti raspodele i linearnosti.

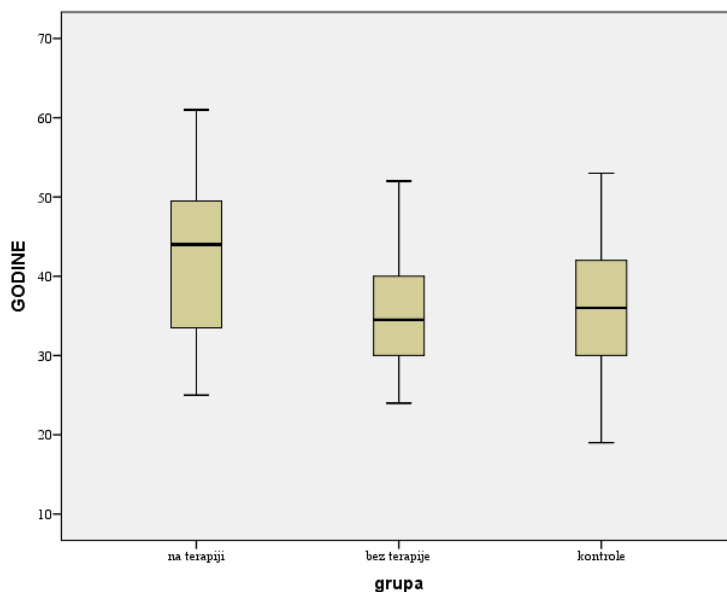
Statistički značajnim smatrane su vrednosti  $p < 0,05$ .

## 5.1. Godine života

**Tabela 5.** Dobne osobine pripadnika tri grupe ispitanika.

	N	Srednja vrednost	Standradna devijacija (SD)	Minimum	Maksimum	F	p
1 - na terapiji	32	41.97	10.117	25	61	5.857	<b>0.004</b>
2 - bez terapije	28	35.21	7.709	24	52		
3 - kontrole	50	36.56	7.443	19	53		
Ukupno	110	37.79	8.733	19	61		

Na osnovu prikazane tabele 5. i grafikona 1., postoji statistički značajna razlika u godinama života između ispitivanih grupa. *Tukey-ev HSD* test ukazuje na to da su pacijenti koji su na terapiji statistički značajno stariji kako od pacijenata koji nisu na terapiji ( $p=0,007$ ), tako i od kontrolne grupe ispitanika ( $p=0,014$ ) dok se kontrolna grupa i grupa bolesnika koji su bez terapije ne razlikuju statistički značajno po uzrastu ( $p=0,775$ ). Rezultati su grafički predstavljeni na grafikonu 1.



**Grafikon 1.** Grafički prikazane dobne karakteristike pripadnika tri grupe ispitanika, gde je ilustrativno prikazano odstupanje grupe pacijenata na terapiji, u odnosu na druge dve grupe ispitanika.

## 5.2. Stepen obrazovanja

Imajući u vidu činjenicu da stepen obrazovanja takođe može značajno da utiče na vrednosti ispitivanih metabolita (pre svega na koncentraciju NAA/Cr), grupe ispitanika međusobno su upoređene prema stepenu obrazovanja (Tabela 6). Subjekti su podeljeni prema stepenu obrazovanja na one sa osnovnim i srednjim obrazovanjem, i na grupu sa višim i visokim obrazovanjem. Obzirom da su u pitanju neparametrijski podaci, za upoređivanje grupa se koristila analiza  $\chi^2$ -test. Nije nađena statistički značajna razlika u nivou obrazovanja između tri posmatrane grupe ispitanika ( $\chi^2=5.233$ , df (degree of freedom)=2, p=0.073).

**Tabela 6.** Razlike u stepenu obrazovanja pripadnika tri grupe ispitanika.

		Grupa			
			1 na terapiji	2 bez terapije	3 kontrole
Stručna	osnovna i srednja škola	N	24	21	26
		%	75.0%	84.0%	59.1%
sprema	viša i visoka škola	N	8	4	18
		%	25.0%	16.0%	40.9%
Ukupno		N	32	25	44
		%	100.0%	100.0%	100.0%

## 5.3. Korelacija odnosa pojedinih metabolita sa godinama života i stepenom obrazovanja

S obzirom na utvrđenu statistički značajnu razliku u godinama života između ispitivanih grupa, kao i na podatke iz literature o uticaju godina života na koncentracije pojedinih metabolita (pre svega na markere neurodegeneracije NAA i Cho), izvršena je korelacija odnosa metabolita sa godinama života. Sa godinama života statistički značajno korelira samo NAA, te je dalje poređenje odnosa NAA/Cr između grupa ispitanika izvršeno analizom kovarijanse (ANCOVA).

Na ovaj način je ispitana razlika u koncentraciji metabolita na osnovu pripadnosti grupi, uz prethodno statističko uklanjanje uticaja godina života, koje su u analizu uvrštene kao kovarijetet.

NAA na MRS dugog eha na 8/12 ispitivanih voksela statistički značajno negativno korelira sa godinama života (što su stariji ispitanici, niži je NAA), dok ostali ispitivani metaboliti ne pokazuju korelacije sa godinama života (Tabela 7). Prema Koenovim (Cohen) kriterijumima, jačina veze između NAA i godina života je na većini voksela srednjeg intenziteta (Pirsonov koeficijent korelacije  $0,300 < r < 0,500$ ).

Nije načinjena korelacija nivoa metabolita i stepena obrazovanja, obzirom da je  $\chi^2$ -testom pokazano da su grupe homogene po ovom kriterijumu, odnosno da nema statistički značajne razlike u stepenu obrazovanja između tri grupe ispitanika.

Za razliku od dugog eha, na kratkom ehu, odnosi NAA/Cr ne pokazuju tako značajne korelacije sa godinama života i prisutne su na samo 3/12 voksela (Tabela 7).

Odnosi Cho/Cr ni na dugom ni na kratkom ehu ni na jednom posmatranom lokalitetu ne koreliraju statistički značajno sa godinama života (Tabela 8).

Koncentracije mI/Cr su korelirale sa godinama života na 2/12 voksela (voksel 2- ventralni prednji cingularni girus desno i voksel 7- dorzalni prednji cingularni girus levo), ali je korelacija slabog intenziteta (Tabela 9).

Kompleks glutamina i glutamata (Glx+Gln) takođe ne korelira sa godinama života ni na jednom od ispitivanih vokselskih lokalizacija (Tabela 9).

**Tabela 7.** Korelacija odnosa NAA/Cr dobijenih metodom MRS dugog i kratkog eha sa godinama života (*r*- Pirsonov koeficijent korelacije, *p*- statistička značajnost).

		Godine života	
		Dugi eho	Kratki eho
NAA/Cr1	r	-0.355**	-0.138
	p	<b>&lt;0.001</b>	0.149
	N	110	110
NAA/Cr2	r	-0.369**	0.010
	p	<b>&lt;0.001</b>	0.918
	N	110	110
NAA/Cr3	r	-0.243*	-0.275**
	p	<b>0.011</b>	<b>0.004</b>
	N	110	110
NAA/Cr4	r	-0.308**	-0.240*
	p	<b>0.001</b>	<b>0.012</b>
	N	110	110
NAA/Cr5	r	-0.112	-0.079
	p	0.246	0.412
	N	110	110
NAA/Cr6	r	-0.099	-0.027
	p	0.305	0.778
	N	110	110
NAA/Cr7	r	-0.288**	-0.188*
	p	<b>0.002</b>	<b>0.049</b>
	N	110	110
NAA/Cr8	r	-0.278**	-0.017
	p	<b>0.003</b>	0.857
	N	110	110
NAA/Cr9	r	-0.308**	0.024
	p	<b>0.001</b>	0.806
	N	110	110
NAA/Cr10	r	-0.383**	-0.164
	p	<b>&lt;0.001</b>	0.086
	N	110	110
NAA/Cr11	r	-0.081	-0.121
	p	0.402	0.207
	N	110	110
NAA/Cr12	r	-0.019	0.006
	p	0.840	0.952
	N	110	110

**Tabela 8.** *Korelacija odnosa Cho/Cr dobijenih metodom MRS dugog i kratkog eha sa godinama života ispitanika.*

		Godine života	
		Dugi eho	Kratki eho
Cho/Cr1	r	0.170	0.175
	p	0.076	0.068
	N	110	110
Cho/Cr2	r	-0.055	0.074
	P	0.572	0.440
	N	110	110
Cho/Cr3	r	-0.050	0.080
	p	0.604	0.404
	N	110	110
Cho/Cr4	r	0.042	-0.075
	P	0.666	0.434
	N	110	110
Cho/Cr5	r	-0.147	0.004
	p	0.124	0.970
	N	110	110
Cho/Cr6	r	-0.123	-0.049
	p	0.202	0.611
	N	110	110
Cho/Cr7	r	0.021	0.105
	p	0.828	0.277
	N	110	110
Cho/Cr8	r	0.044	0.107
	p	0.650	0.265
	N	110	110
Cho/Cr9	r	0.105	-0.071
	p	0.275	0.462
	N	110	110
Cho/Cr10	r	-0.045	-0.077
	p	0.638	0.422
	N	110	110
Cho/Cr11	r	0.003	-0.122
	p	0.976	0.206
	N	110	110
Cho/Cr12	r	0.084	-0.028
	p	0.382	0.772
	N	110	110

**Tabela 9.** Korelacija odnosa  $mI/Cr$  i  $(Glx+Gln)/Cr$  dobijenih metodom MRS kratkog eha sa godinama života subjekata.

Kratki eho		Godine života	Kratki eho	Godine života	
mI/Cr1	r	0.183	(Glx+Gln)/Cr1	r	-0.118
	p	0.056		p	0.370
	N	110		N	60
mI/Cr2	r	0.253**	(Glx+Gln)/Cr2	r	-0.229
	p	<b>0.008</b>		p	0.079
	N	110		N	60
mI/Cr3	r	0.004	(Glx+Gln)/Cr3	r	0.079
	p	0.964		p	0.546
	N	110		N	60
mI/Cr4	r	0.007	(Glx+Gln)/Cr4	r	0.022
	p	0.942		p	0.866
	N	110		N	60
mI/Cr5	r	-0.097	(Glx+Gln)/Cr5	r	-0.140
	p	0.326		p	0.287
	N	110		N	60
mI/Cr6	r	-0.048	(Glx+Gln)/Cr6	r	0.018
	p	0.621		p	0.894
	N	110		N	60
mI/Cr7	r	0.233*	(Glx+Gln)/Cr7	r	-0.023
	p	<b>0.014</b>		p	0.860
	N	110		N	60
mI/Cr8	r	0.083	(Glx+Gln)/Cr8	r	-0.138
	p	0.389		p	0.293
	N	110		N	60
mI/Cr9	r	0.184	(Glx+Gln)/Cr9	r	0.094
	p	0.055		p	0.474
	N	110		N	60
mI/Cr10	r	0.110	(Glx+Gln)/Cr10	r	-0.097
	p	0.252		p	0.460
	N	110		N	60
mI/Cr11	r	0.082	(Glx+Gln)/Cr11	r	-0.054
	p	0.394		p	0.683
	N	110		N	60
mI/Cr12	r	0.161	(Glx+Gln)/Cr12	r	0.115
	p	0.093		p	0.381
	N	110		N	60

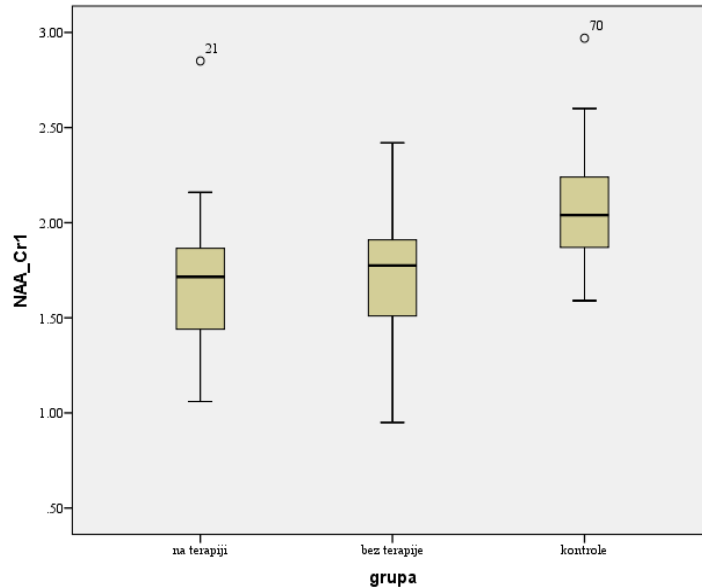


## 5.4. Rezultati multivokselne MR spektroskopije sa korišćenjem dugog eha

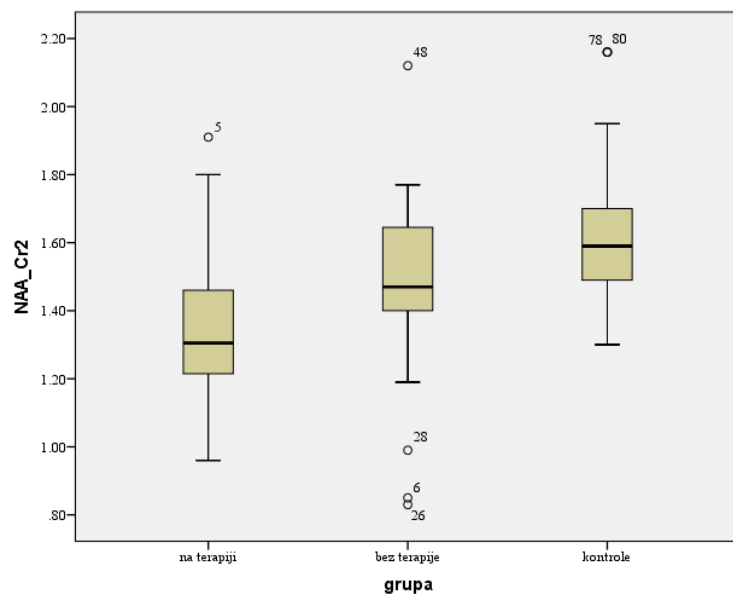
### 5.4.1. NAA/Cr

Na grafikonima 2-13. su prikazane raspodele vrednosti NAA/Cr kod sve tri grupe ispitanika.

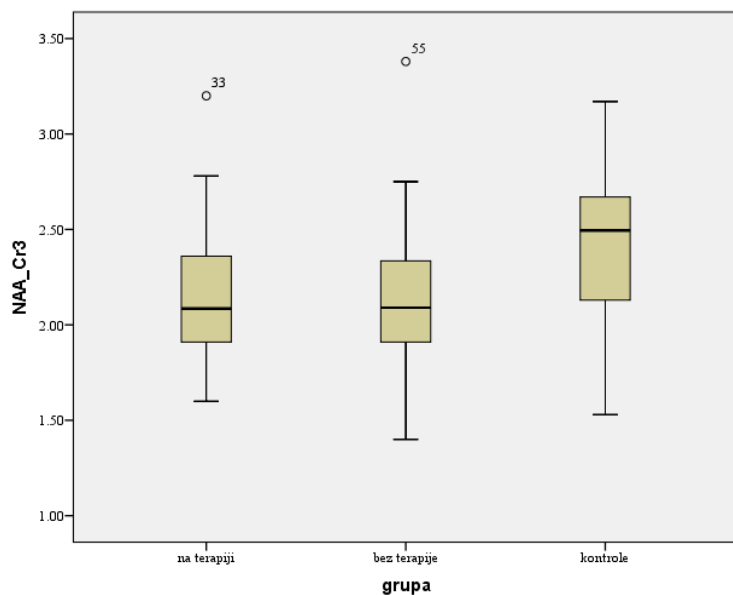
Zbog poznatog uticaja godina života na vrednosti NAA, koji je dokazan i na ovom uzorku, kao i na činjenicu da su pacijenti koji su na terapiji statistički značajno stariji od ostale dve grupe ispitanika, razlike u koncentracijama NAA/Cr ispitivane su jednofaktorskom analizom kovarijanse (ANCOVA). Pre sprovođenja analize potvrđeno je da pomenute varijable zadovoljavaju uslove korišćenja ove tehnike (normalnost raspodele, linearnost, homogenost varijansi, homogenost regresionih nagiba i pouzdanosti merenja kovarijeteta). Kao nezavisna varijabla u analizu je uključena grupa ispitanika, zavisnu varijablu činile su koncentracije NAA/Cr, dok su godine života u analizu uključene kao kovarijat.



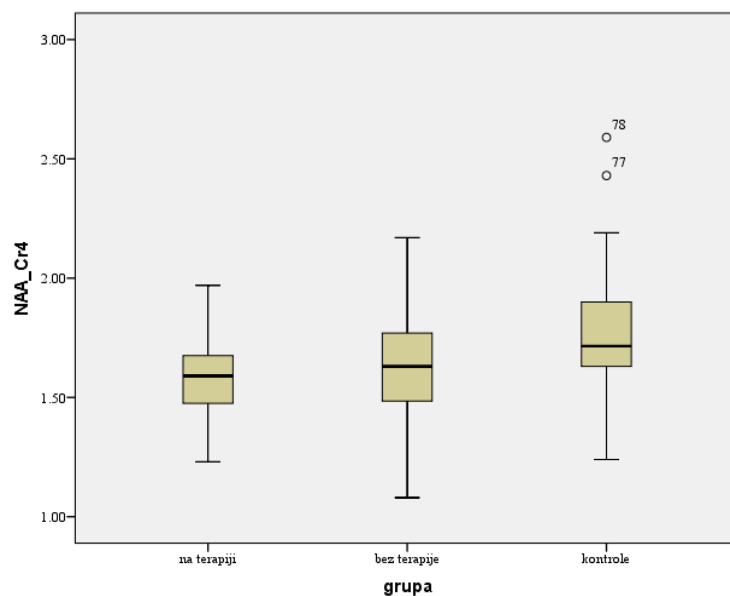
**Grafikon 2.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u supkortikalnoj beloj masi frontalnog lobusa desne hemisfere.



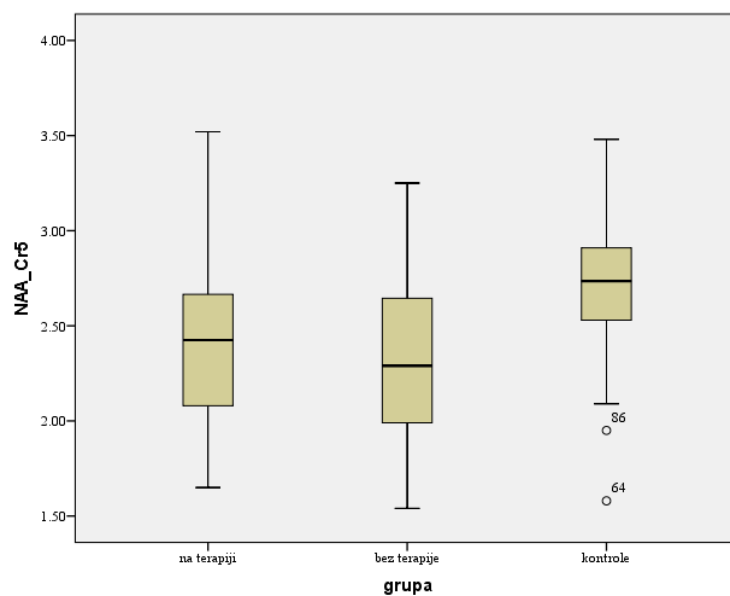
**Grafikon 3.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u svojoj masi desnog prednjeg cingularnog girusa (ventralni deo).



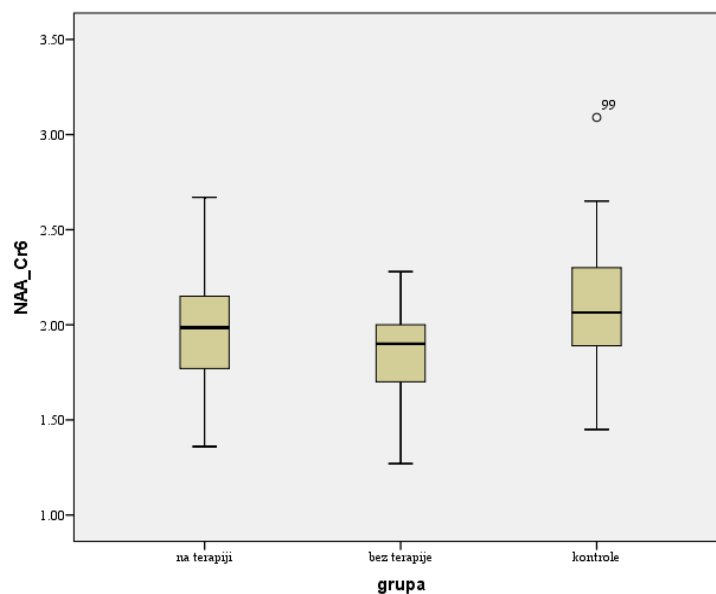
**Grafikon 4.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u svojoj masi levog prednjeg cingularnog girusa (ventralni deo).



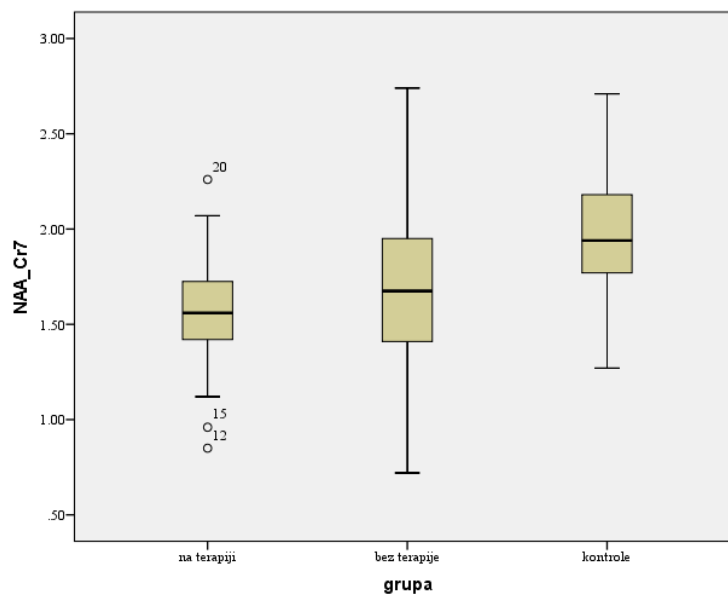
**Grafikon 5.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u supkortikalnoj beloj masi frontalnog lobusa leve hemisfere.



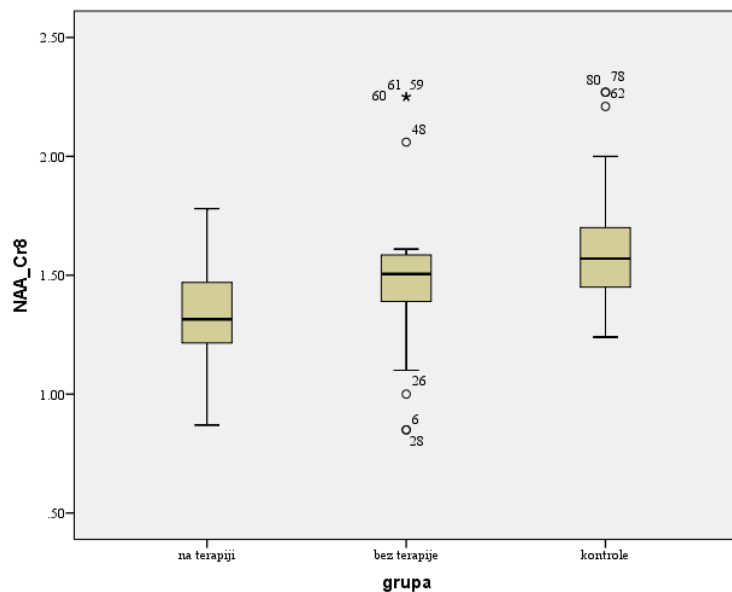
**Grafikon 6.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u dubokoj beloj masi frontalnog lobusa desne hemisfere.



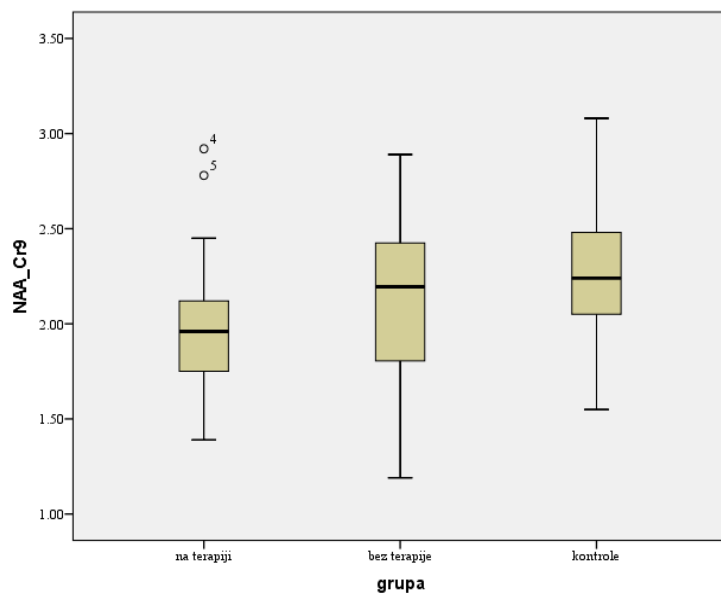
**Grafikon 7.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u sivoj masi desnog prednjeg cingularnog girusa (dorzalni deo).



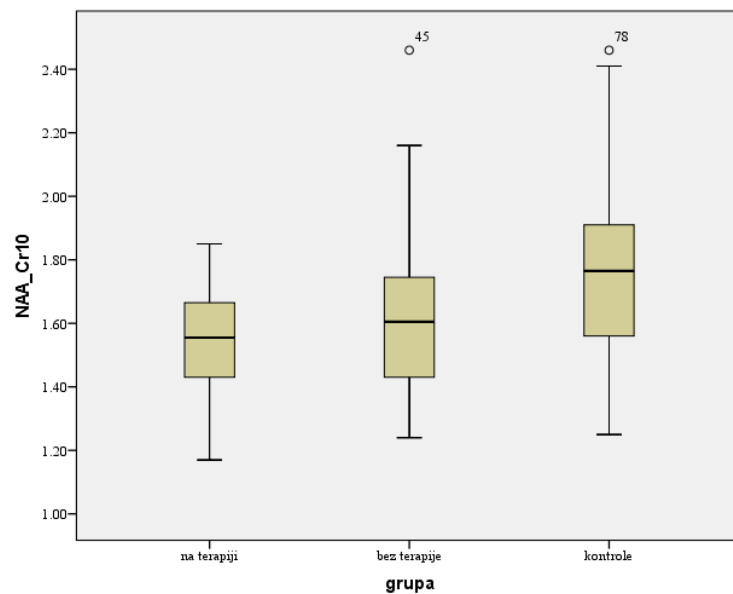
**Grafikon 8.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u sivoj masi levog prednjeg cingularnog girusa (dorzalni deo).



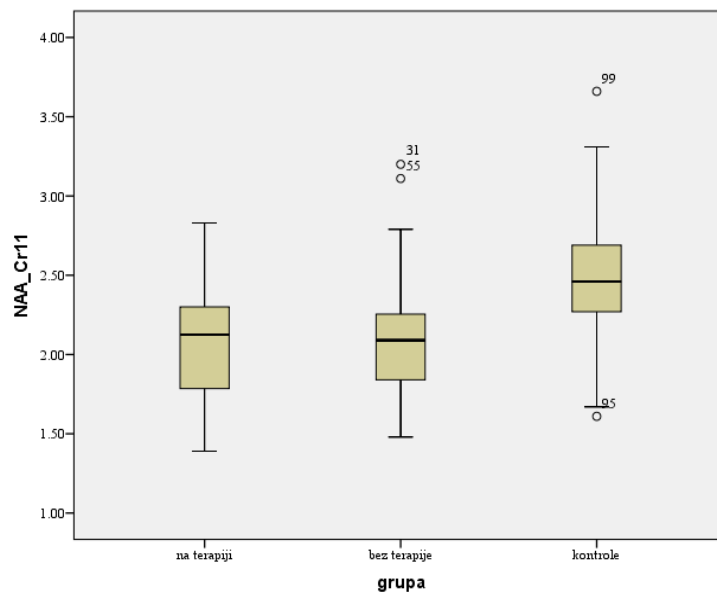
**Grafikon 9.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u dubokoj beloj masi frontalnog lobusa leve hemisfere.



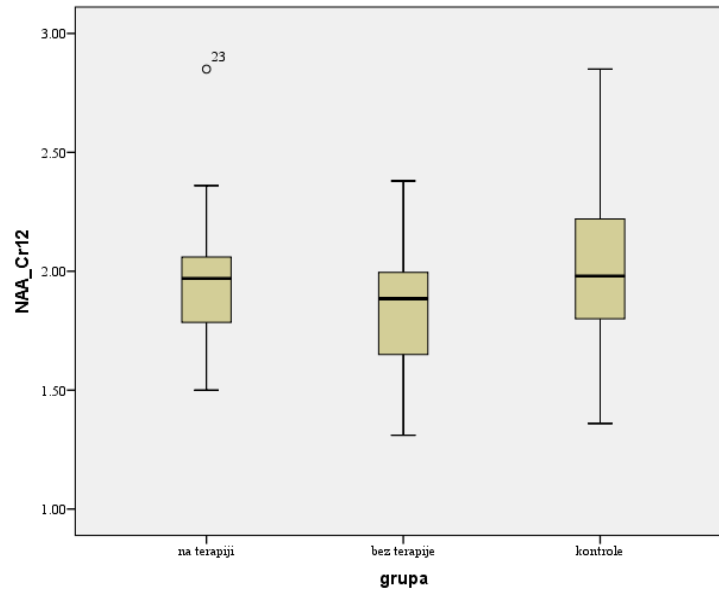
**Grafikon 10.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u supkortikalnoj beloj masi parijetalnog lobusa desne hemisfere.



**Grafikon 11.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u sivoj masi desnog zadnjeg cingularnog girusa.



**Grafikon 12.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u sivoj masi levog zadnjeg cingularnog girusa.



**Grafikon 13.** Razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijenih metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u supkortikalnoj beloj masi parijetalnog lobusa leve hemisfere.

Rezultati su prikazani u tabeli 10. Rezultati jednofaktorske analize kovarijanse, nakon statističkog uklanjanja uticaja godina života, pokazuju da između posmatranih grupa pacijenata postoji statistički značajna razlika u NAA/Cr na MR spektroskopiji sa dugim ehom, na svim ispitivanim vokalima. Procenjena srednja vrednost predstavlja srednju vrednost nakon uklanjanja uticaja kovarijeteta, godina života. Parcijalna  $\eta^2$  govori o doprinosu određenog faktora razlici, signifikantna je vrednost  $\eta^2 > 0.14$ . Doprinos godina života razlici u koncentracijama NAA/Cr je slabog do umerenog intenziteta veze, a uticaj pripadnosti grupi (odnosno postojanje HIV-infekcije) jakog intenziteta. Na primer, u regiji supkortikalne bele mase frontalno desno, pripadnost grupi, odnosno inficiranost HIV-om objašnjava 21.2% varijanse (prema Cohenovim kriterijumima, spada u uticaj jakog intenziteta), dok dob objašnjava 10.4% varijanse, što odgovara uticaju srednjeg intenziteta.

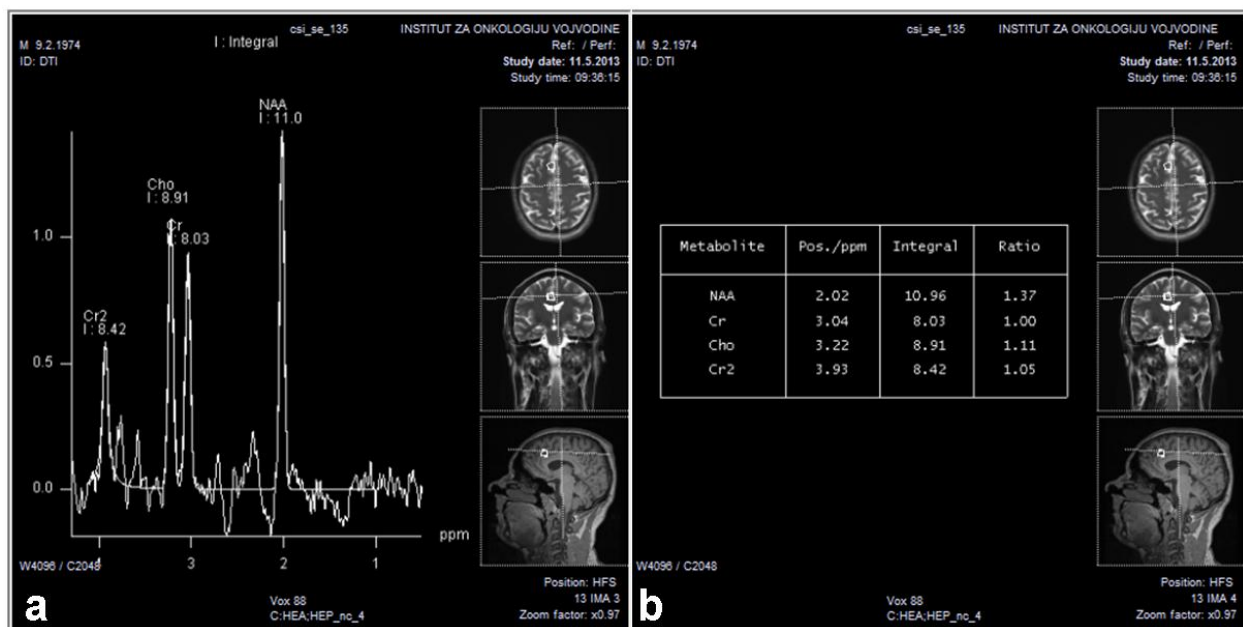
**Tabela 10.** Vrednosti ispitivanih razlika u odnosima NAA/Cr dobijenih metodom MRS dugog eha.\*

		Srednja vrednost	SD	Min	Max	Procenjena srednja vrednost	F	p	Parcijalna $\eta^2$
NAA/Cr1	na terapiji	1.675	0.358	1.06	2.85	1.726	14.251	<b>&lt;0.001</b>	0.212
	bez terapije	1.765	0.342	0.95	2.42	1.734	12.258	<b>0.001</b>	0.104
	kontrole	2.056	0.273	1.59	2.97	2.041			
NAA/Cr2	na terapiji	1.346	0.218	0.96	1.91	1.381	11.823	<b>&lt;0.001</b>	0.182
	bez terapije	1.477	0.272	0.83	2.12	1.455	11.201	<b>0.001</b>	0.096
	kontrole	1.624	0.203	1.30	2.16	1.614			
NAA/Cr3	na terapiji	2.161	0.345	1.60	3.20	2.203	6.152	<b>0.003</b>	0.104
	bez terapije	2.145	0.415	1.40	3.38	2.119	5.799	<b>0.018</b>	0.052
	kontrole	2.411	0.356	1.53	3.17	2.398			
NAA/Cr4	na terapiji	1.588	0.188	1.23	1.97	1.619	6.222	<b>0.003</b>	0.105
	bez terapije	1.632	0.239	1.08	2.17	1.613	8.624	<b>0.004</b>	0.075
	kontrole	1.774	0.241	1.24	2.59	1.765			
NAA/Cr5	na terapiji	2.425	0.463	1.65	3.52	2.446	9.801	<b>&lt;0.001</b>	0.156
	bez terapije	2.323	0.418	1.54	3.25	2.300	1.104	0.296	0.010
	kontrole	2.714	0.367	1.58	3.48	2.708			
NAA/Cr6	na terapiji	1.979	0.305	1.36	2.67	1.996	6.370	<b>0.002</b>	0.107
	bez terapije	1.854	0.245	1.27	2.28	1.843	1.519	0.220	0.014
	kontrole	2.088	0.291	1.45	3.09	2.083			
NAA/Cr7	na terapiji	1.556	0.296	0.85	2.26	1.559	14.398	<b>&lt;0.001</b>	0.214
	bez terapije	1.681	0.487	0.72	2.74	1.654	6.230	<b>0.014</b>	0.056
	kontrole	2.014	0.341	1.27	2.71	2.001			
NAA/Cr8	na terapiji	1.337	0.213	0.87	1.78	1.363	8.091	<b>0.001</b>	0.132
	bez terapije	1.511	0.356	0.85	2.25	1.495	4.249	0.042	0.039
	kontrole	1.615	0.234	1.24	2.27	1.608			
NAA/Cr9	na terapiji	1.970	0.344	1.39	2.92	2.015	3.974	<b>0.022</b>	0.070
	bez terapije	2.132	0.403	1.19	2.89	2.104	7.152	<b>0.009</b>	0.063
	kontrole	2.251	0.342	1.55	3.08	2.238			
NAA/Cr10	na terapiji	1.537	0.156	1.17	1.85	1.580	8.178	<b>&lt;0.001</b>	0.134
	bez terapije	1.612	0.274	1.24	2.46	1.586	14.616	<b>&lt;0.001</b>	0.121
	kontrole	1.775	0.270	1.25	2.46	1.762			
NAA/Cr11	na terapiji	2.092	0.388	1.39	2.83	2.097	11.329	<b>&lt;0.001</b>	0.176
	bez terapije	2.120	0.419	1.48	3.20	2.117	0.053	0.818	0.001
	kontrole	2.496	0.439	1.61	3.66	2.494			
NAA/Cr12	na terapiji	1.970	0.274	1.50	2.85	1.978	4.652	<b>0.012</b>	0.081
	bez terapije	1.814	0.265	1.32	2.38	1.809	0.323	0.571	0.003
	kontrole	2.014	0.302	1.36	2.85	2.012			

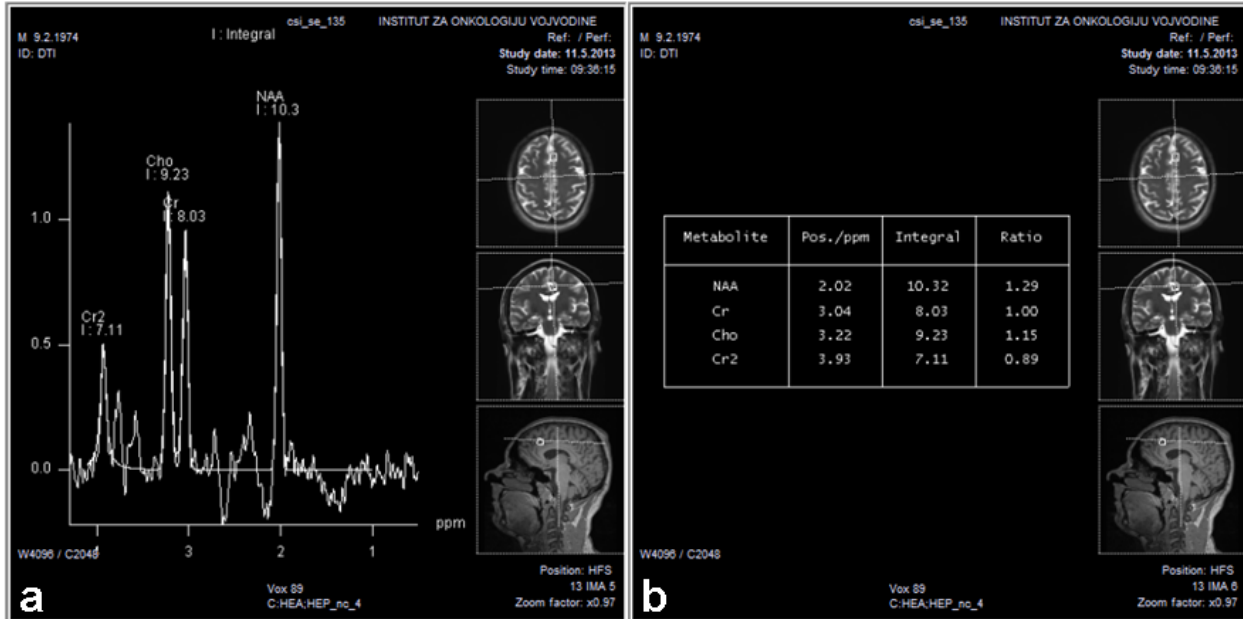


\* Obzirom na doprinos više faktora razlici među grupama, korišćena je ANCOVA, sa godinama života koje predstavljaju kovarijetet u analizi. Doprinos varijabli razlici među grupama je opisan putem vrednosti parcijalne  $\eta^2$ . U gornjem redu se nalazi doprinos pripadnosti grupi (prisustvo HIV infekcije) a redu ispod doprinos godina života. Signifikantan doprinos značava vrednost parcijalne  $\eta^2$  iznad 0.14.

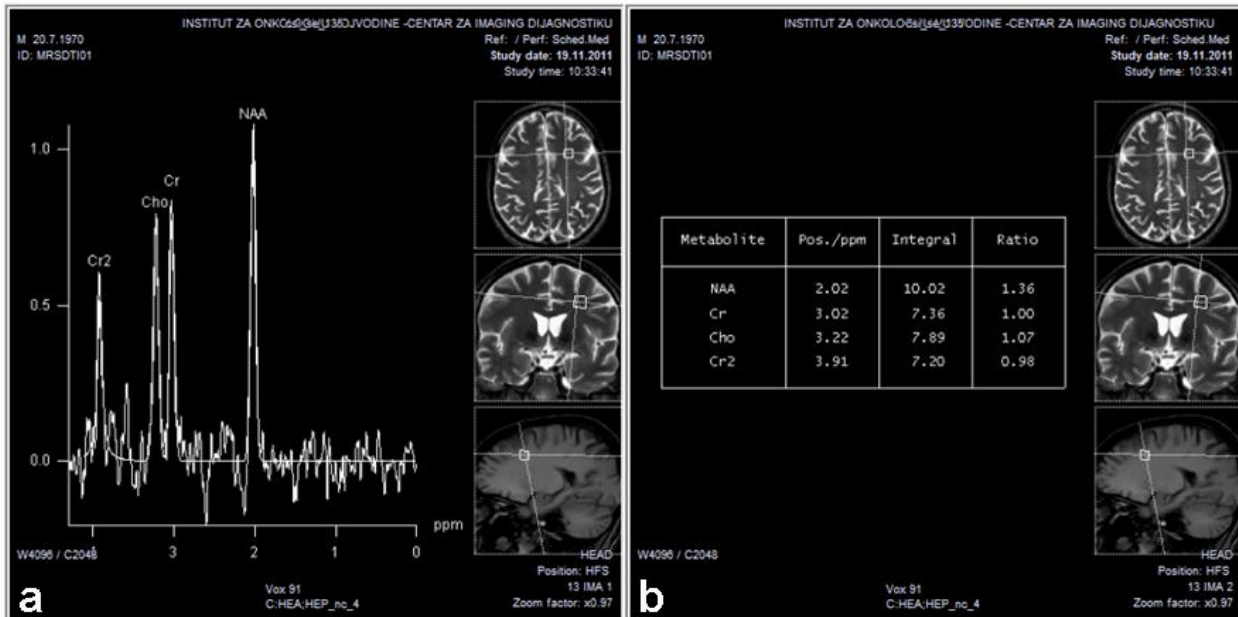
Na slikama 8., 9. i 10. prikazani su spektri dobijeni metodom MRS dugog eha kod pacijenata kojima je uvedena cART, sa markantnim sniženjem NAA/Cr odnosa u regiji ventralnog prednjeg cingularnog girusa desno (voksel 2, Slika 8), ventralnog prednjeg cingularnog girusa levo (voksel 3, Slika 9) i duboke frontalne bele mase levo (voksel 4, Slika 10).



**Slika 8.** Spektar (a) dobijen na MV MRS dugog eha u regiji ventralnog prednjeg cingularnog girusa desno (voksel 2), kod pacijenta na cART. Evidentan je značajan pad NAA/Cr odnosa (1.37) kao i značajan porast Cho/Cr odnosa (1.11) (b).

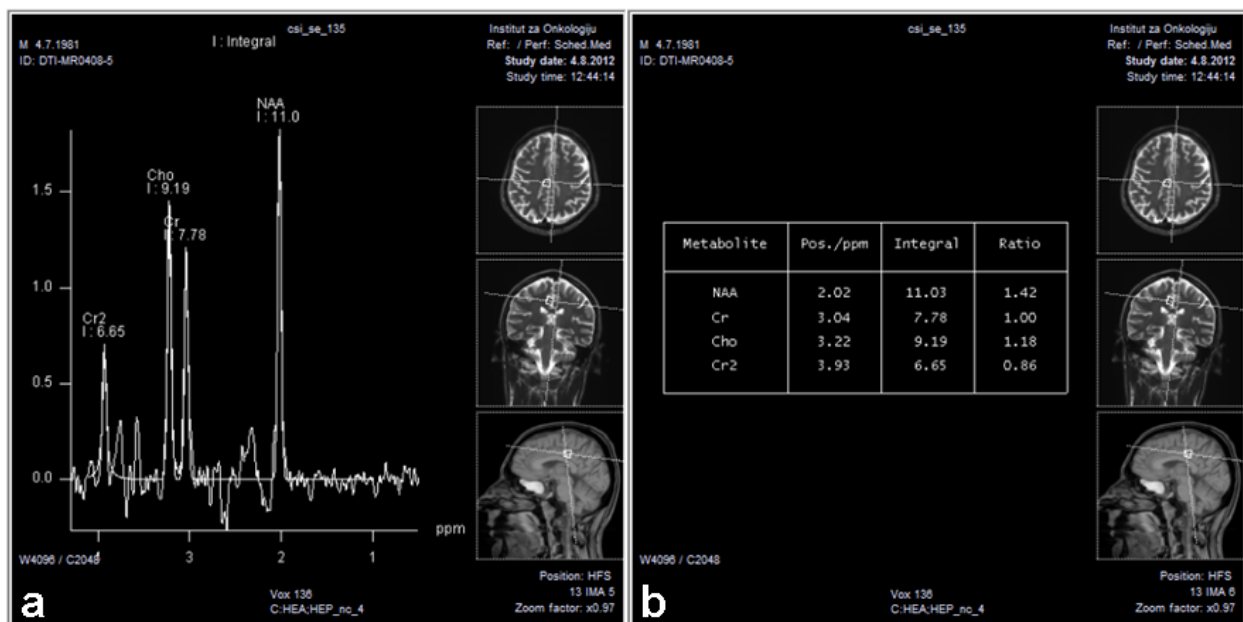


**Slika 9.** Spektar (a) dobijen na MV MRS dugog eha u regiji ventralnog prednjeg cingularnog girusa levo (voksel 3), kod pacijenta na cART, prikazuje značajan pad NAA/Cr odnosa (1.29) i značajan porast Cho/Cr odnosa (1.15) (b).



**Slika 10.** Spektar (a) dobijen na MV MRS dugog eha supkortikalne bele mase frontalno desno (voksel 4), kod pacijenta na cART, sa vidljivim padom NAA/Cr odnosa (1.36) i nešto slabije izraženim porastom Cho/Cr (1.07) (b).

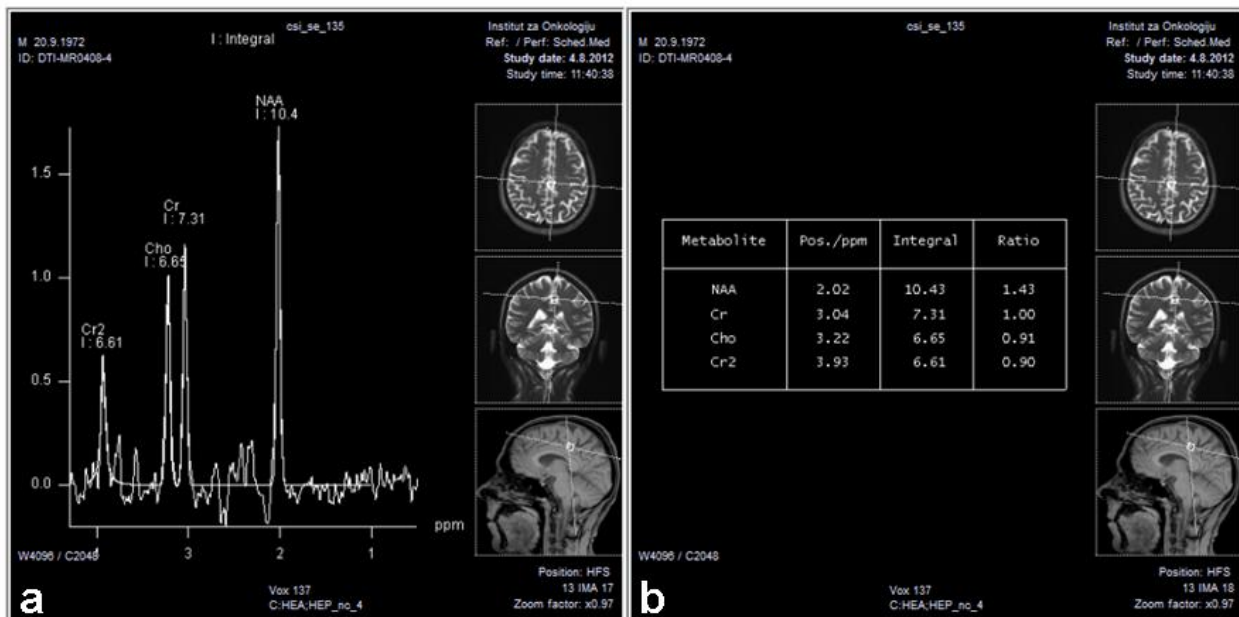
Naknadna poređenja pomoću *Tukey*-jevog HSD testa (Tabela 11) pokazuju da se u 8/12 vokselata statistički značajno razlikuju grupa zdravih i grupa HIV+ na terapiji, a istovremeno i grupa zdravih i grupa HIV+ bez terapije. Grupe obolelih od HIV-a pokazuju značajno niže vrednosti odnosa NAA/Cr u odnosu na zdrave ispitanike. Na samo 2 od 12 lokacija (dorzalni deo prednjeg cingulumata desno i supkortikalna bela masa parijetalno levo) ne uočava se statistički značajna razlika između zdravih subjekata i HIV+ pacijenata na terapiji. Takođe na samo dva vokselata (duboka bela masa frontalno levo i supkorteks parijetalno desno), ne uočava se statistički značajna razlika između kontrolnih i HIV+ subjekata kojima nije uvedena cART. Na slici 11. prikazan je spektar dugog eha kod pacijenata bez terapije, sa evidentnim sniženjem NAA/Cr odnosa i povišenjem odnosa Cho/Cr. Jedino u vokselu 8 (duboka bela masa frontalno levo) zabeležene su statistički značajno niže koncentracije NAA/Cr kod HIV+ subjekata na terapiji u odnosu na HIV+ bez terapije ( $p=0.034$ ), što se najverovatnije može objasniti dužinom trajanja infekcije koja je svakako veća kod bolesnika koji su na terapiji nego kod novootkrivenih HIV+ pacijenata (Slika 12). Na ostalim vokselima nije zabeležena statistički značajna razlika u NAA/Cr kod HIV+ pacijenata na terapiji i onih bez terapije.



**Slika 11.** Spektar (a) dobijen na MV MRS dugog eha u regiji desnog dorzalnog prednjeg cingularnog girusa (voksel 6), kod pacijenta kod koga nije uvedena cART. Uočava se sniženje NAA/Cr odnosa (1.42) kao i značajan porast Cho/Cr odnosa (1.18) (b).

**Tabela 11.** Razlike među tri posmatrane grupe ispitanike u odnosima NAA/Cr po vokselima (NAA/Cr1-NAA/Cr12) dobijene pomoću naknadnih testiranja Tukey-jevim HSD testom.

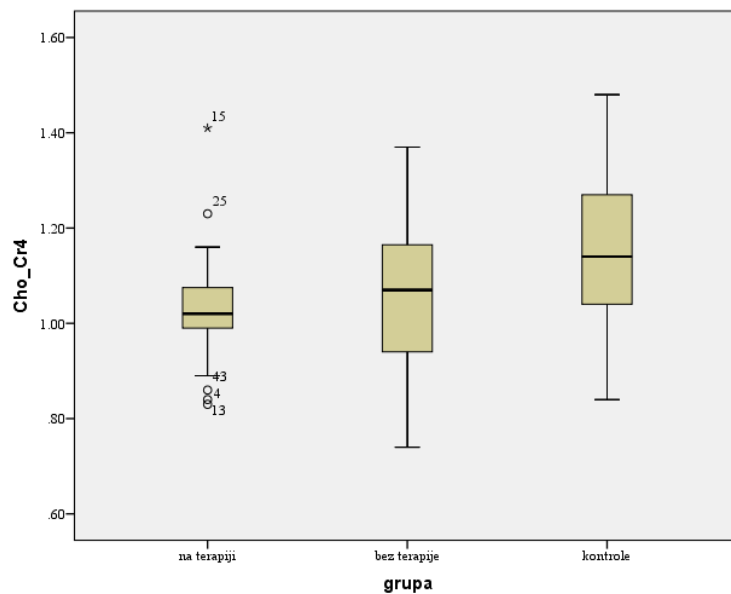
Post hoc analiza putem Tukey HSD testa	Dugi eho	HIV+ na terapiji / HIV+ bez terapije	Kontrole / HIV+ na terapiji	kontrole / HIV+ bez terapije
	NAA/Cr1	0.522	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>
	NAA/Cr2	0.071	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.019</b>
	NAA/Cr3	0.985	<b>0.009</b>	<b>0.008</b>
	NAA/Cr4	0.732	<b>0.001</b>	<b>0.025</b>
	NAA/Cr5	0.543	<b>0.007</b>	<b>&lt;0.001</b>
	NAA/Cr6	0.210	0.213	<b>0.002</b>
	NAA/Cr7	0.394	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>
	NAA/Cr8	<b>0.034</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.220
	NAA/Cr9	0.192	<b>0.002</b>	0.342
	NAA/Cr10	0.459	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.016</b>
	NAA/Cr11	0.963	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.001</b>
	NAA/Cr12	0.090	0.778	<b>0.010</b>



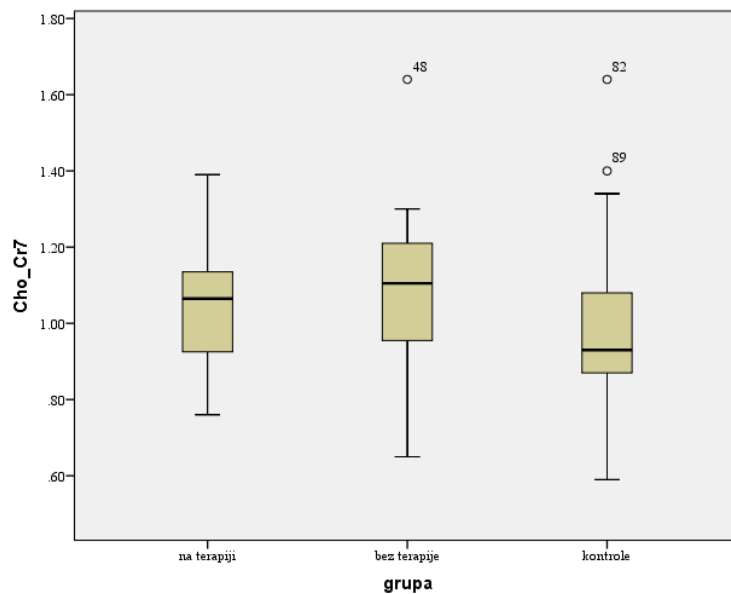
**Slika 12.** Spektar (a) dobijen na MV MRS dugog eha u regiji dorzalnog prednjeg cingularnog girusa levo (voksel 7), kod pacijenta sa uvedenom cART. Prisutno je sniženje NAA/Cr odnosa (1.43), uz normalan odnos Cho/Cr odnosa (0.91) (b).

#### 5.4.2. Cho/Cr

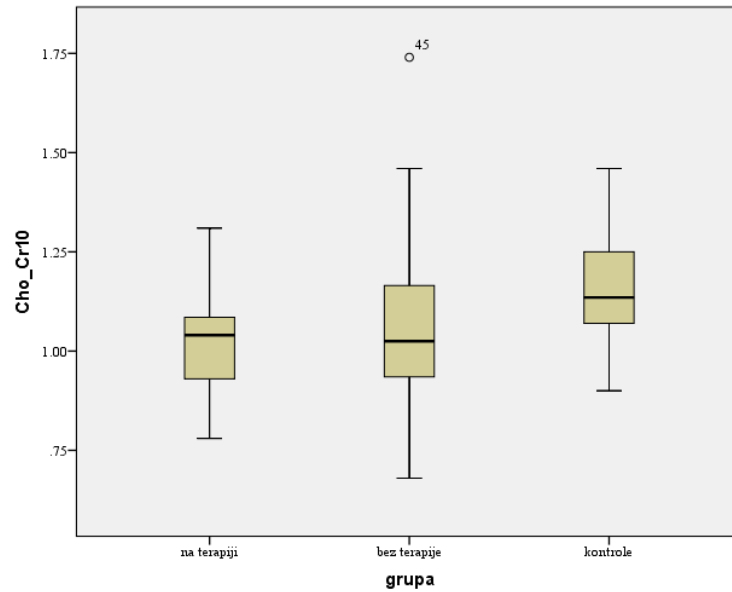
Na grafikonima 14-17. prikazane su lokalizacije na kojima je pokazano prisustvo statistički značajne razlike među grupama ispitanika u odnosima metabolita Cho/Cr korišćenjem metode dugog eha. Uočava se postojanje statistički značajne razlike među posmatranim grupama ispitanika na vokselima 4, 7, 10 i 12 (supkortikalna frontalna bela masa levo, anteriorni cingulum levo (dorzalni deo), posteriorni cingulum desno i supkortikalna parijetalna bela masa levo).



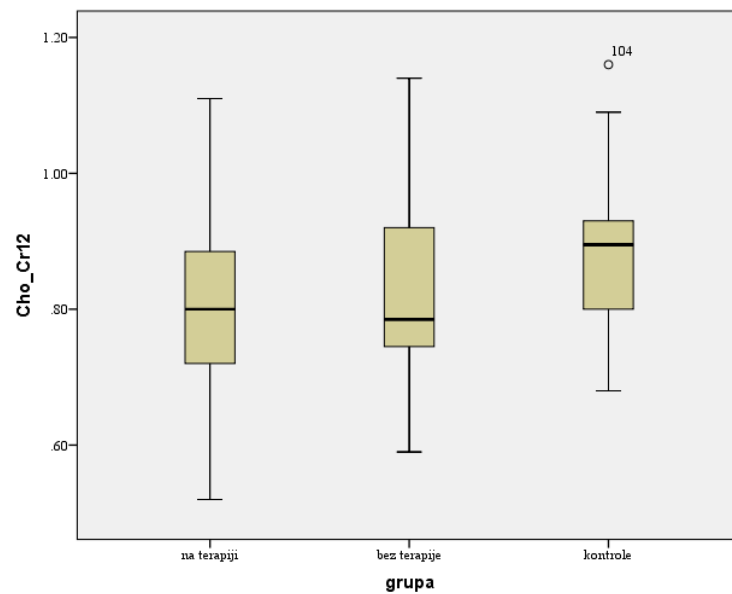
**Grafikon 14.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr dobijene metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u supkortikalnoj beloj masi frontalno levo.



**Grafikon 15.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr dobijene metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanike u sivoj masi levog prednjeg cingularnog girusa (dorzalni deo).

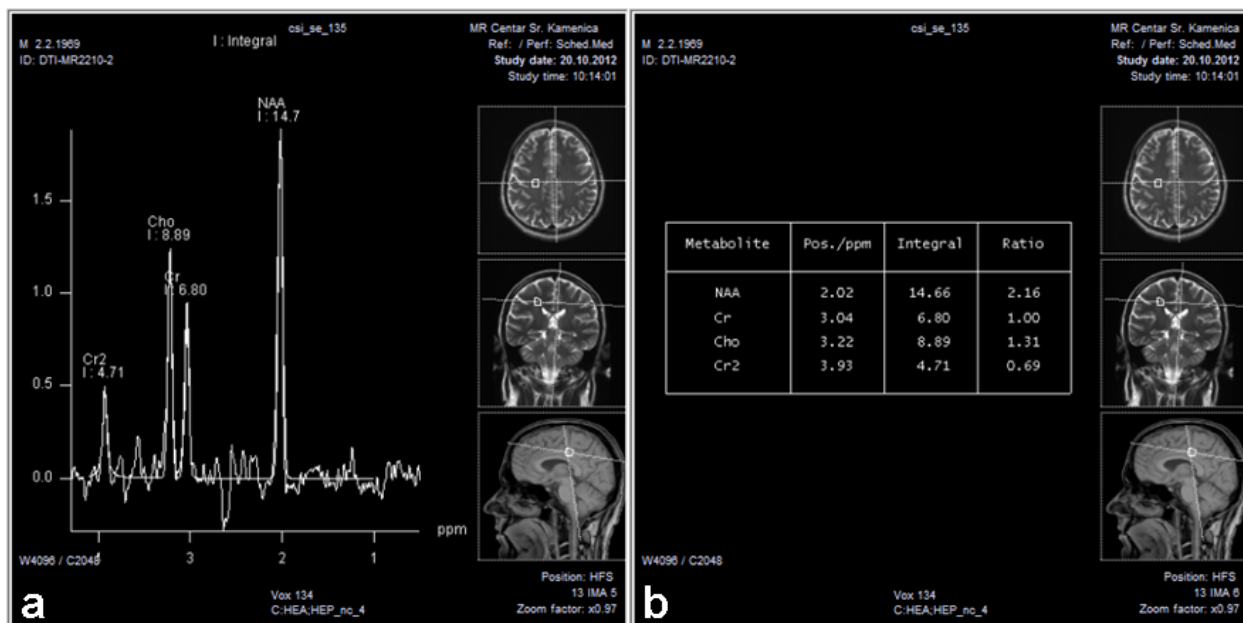


**Grafikon 16.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr dobijene metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanike u sivoj masi desnog zadnjeg cingularnog girusa.



**Grafikon 17.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr dobijene metodom dugog eha između tri posmatrane grupe ispitanike u supkortikalnoj belojoj masi parijetalno levo.

Univarijantnom analizom varijanse (ANOVA), upoređene su vrednosti Cho/Cr dobijene na multivokselnoj MRS sa dugim ehom među posmatranim grupama ispitanika (Tabela 12). Utvrđena je statistički značajna razlika u vrednostima Cho/Cr između tri grupe ispitanika u vokselima 4, 6, 7, 10 i 12 (supkorteks frontalno levo, dorzalni delovi prednjeg cingularnog girusa obostrano, zadnji cingulum desno i supkorteks parijetalno levo). Na vokselima 4 (supkorteks frontalno levo) i 10 (posteriorni cingularni girus desno) vrednosti Cho/Cr su značajno niže kod HIV+ subjekata obe grupe u odnosu na kontrole ( $p < 0.001$  i  $p = 0.001$ ). Na vokselima 6 (dorzalni prednji cingulum desno) i 12 (parijetalni supkorteks levo), odnos Cho/Cr je niži kod HIV+ pacijenata na cART u odnosu na zdrave subjekte i HIV- pacijente kod kojih nije uvedena terapija ( $p = 0.032$  i  $p = 0.018$ ). Jedino na vokselu 7 (dorzalni prednji cingulum levo) je pokazan statistički značajno viši Cho/Cr kod HIV+ subjekata u odnosu na zdrave kontrolne subjekte ( $p = 0.040$ ). Na slikama 13. i 14. prikazani su tipični spektri pacijenata bez i sa terapijom (respektivno), na kojima se uočava porast Cho/Cr odnosa.

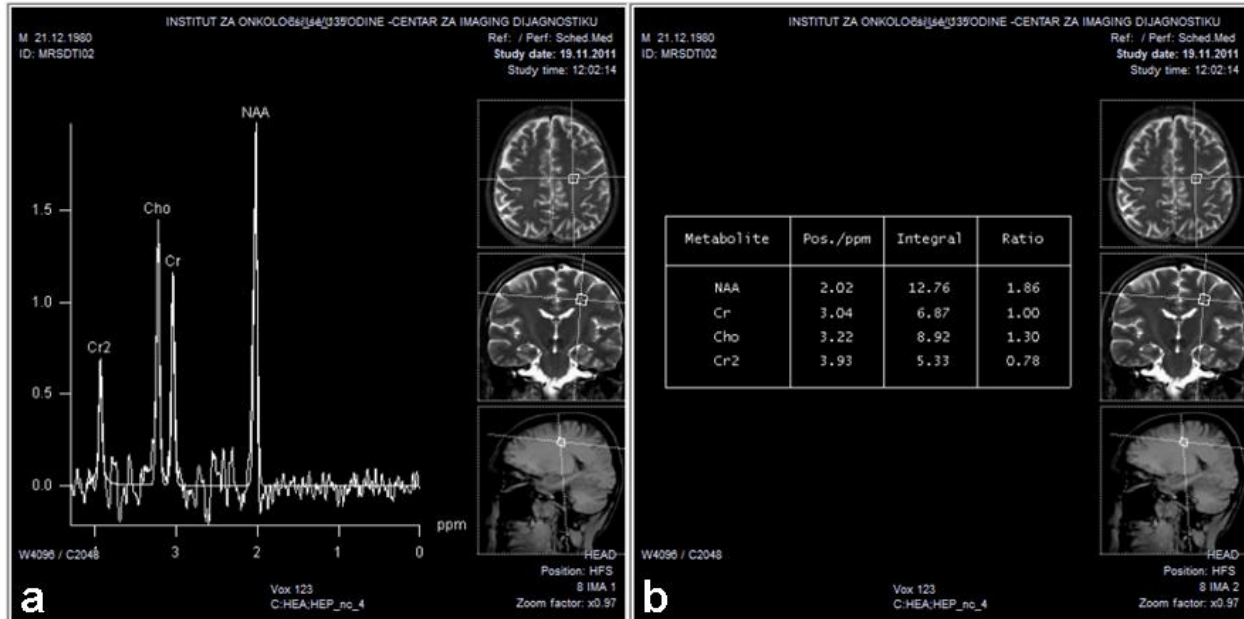


**Slika 13.** Multivokselna MRS dugog eha (a) kod HIV+ pacijenta bez uvedene cART u regiji duboke bele mase midfrontalno desno (voksel 5), pokazuje normalan odnos NAA/Cr (2.16) i veoma izražen porast Cho/Cr (1.31) (b).



**Tabela 12.** Razlike u odnosima Cho/Cr dobijenih metodom MRS dugog eha, testirane ANOVA-om.

		Srednja vrednost	SD	Min	Max	F	P
Cho/Cr1	na terapiji	1.075	0.245	0.64	1.61	2.192	0.117
	bez terapije	1.044	0.198	0.76	1.46		
	kontrole	0.978	0.204	0.63	1.57		
Cho/Cr2	na terapiji	1.103	0.149	0.86	1.48	3.049	0.052
	bez terapije	1.192	0.171	0.92	1.48		
	kontrole	1.134	0.118	0.90	1.37		
Cho/Cr3	na terapiji	1.023	0.146	0.79	1.32	2.394	0.096
	bez terapije	1.080	0.239	0.77	1.75		
	kontrole	0.977	0.205	0.29	1.51		
Cho/Cr4	na terapiji	1.032	0.113	0.83	1.41	9.108	<b>&lt;0.001</b>
	bez terapije	1.064	0.155	0.74	1.37		
	kontrole	1.156	0.141	0.84	1.48		
Cho/Cr5	na terapiji	0.870	0.174	0.49	1.27	1.693	0.189
	bez terapije	0.890	0.182	0.56	1.20		
	kontrole	0.814	0.198	0.37	1.35		
Cho/Cr6	na terapiji	0.787	0.141	0.55	1.08	3.548	<b>0.032</b>
	bez terapije	0.859	0.159	0.55	1.22		
	kontrole	0.863	0.109	0.56	1.14		
Cho/Cr7	na terapiji	1.043	0.137	0.76	1.39	3.325	<b>0.040</b>
	bez terapije	1.085	0.204	0.65	1.64		
	kontrole	0.979	0.193	0.59	1.64		
Cho/Cr8	na terapiji	1.133	0.181	0.82	1.66	1.786	0.173
	bez terapije	1.194	0.185	0.93	1.57		
	kontrole	1.125	0.125	0.86	1.38		
Cho/Cr9	na terapiji	1.055	0.132	0.81	1.37	1.610	0.205
	bez terapije	1.070	0.182	0.61	1.44		
	kontrole	1.004	0.187	0.60	1.44		
Cho/Cr10	na terapiji	1.020	0.122	0.78	1.32	7.423	<b>0.001</b>
	bez terapije	1.060	0.217	0.68	1.74		
	kontrole	1.149	0.130	0.90	1.46		
Cho/Cr11	na terapiji	0.856	0.251	0.49	1.51	1.539	0.219
	bez terapije	0.903	0.189	0.61	1.53		
	kontrole	0.950	0.252	0.10	1.62		
Cho/Cr12	na terapiji	0.808	0.145	0.52	1.11	4.154	<b>0.018</b>
	bez terapije	0.834	0.138	0.59	1.14		
	kontrole	0.886	0.101	0.68	1.16		

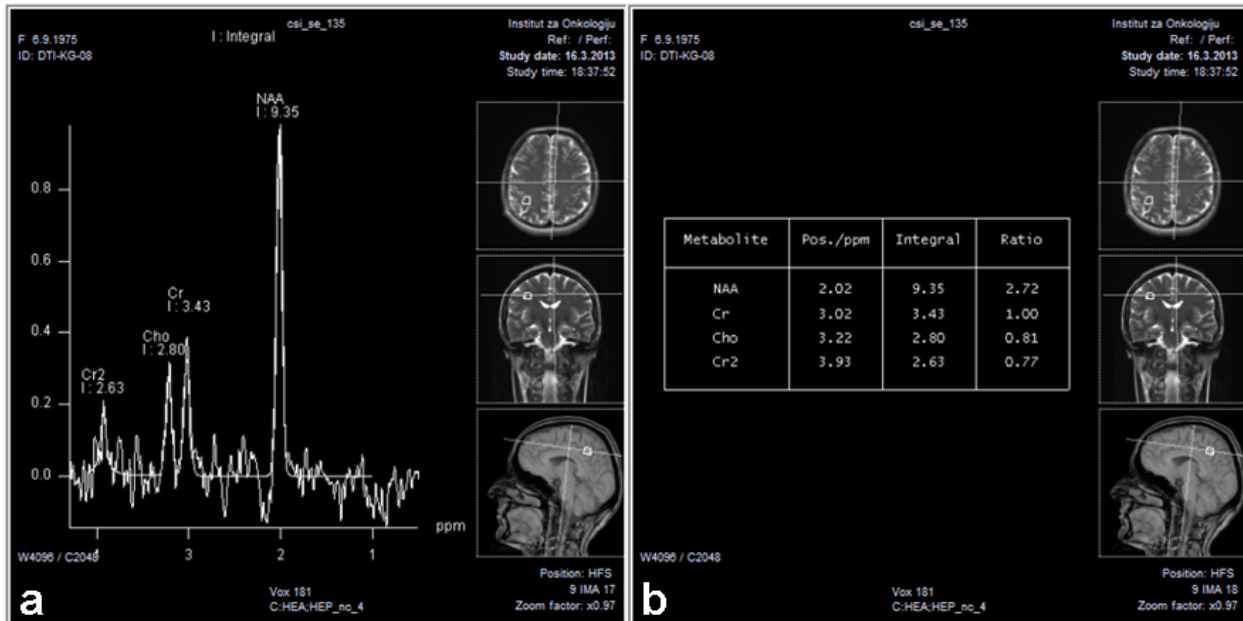


**Slika 14.** Spektar (a) iz duboke bele mase midfrontalno levo (voksel 8) kod pacijenta na cART, pokazuje sniženje NAA/Cr odnosa (1.86) i veoma izraženo povišenje Cho/Cr odnosa (1.30) (b).

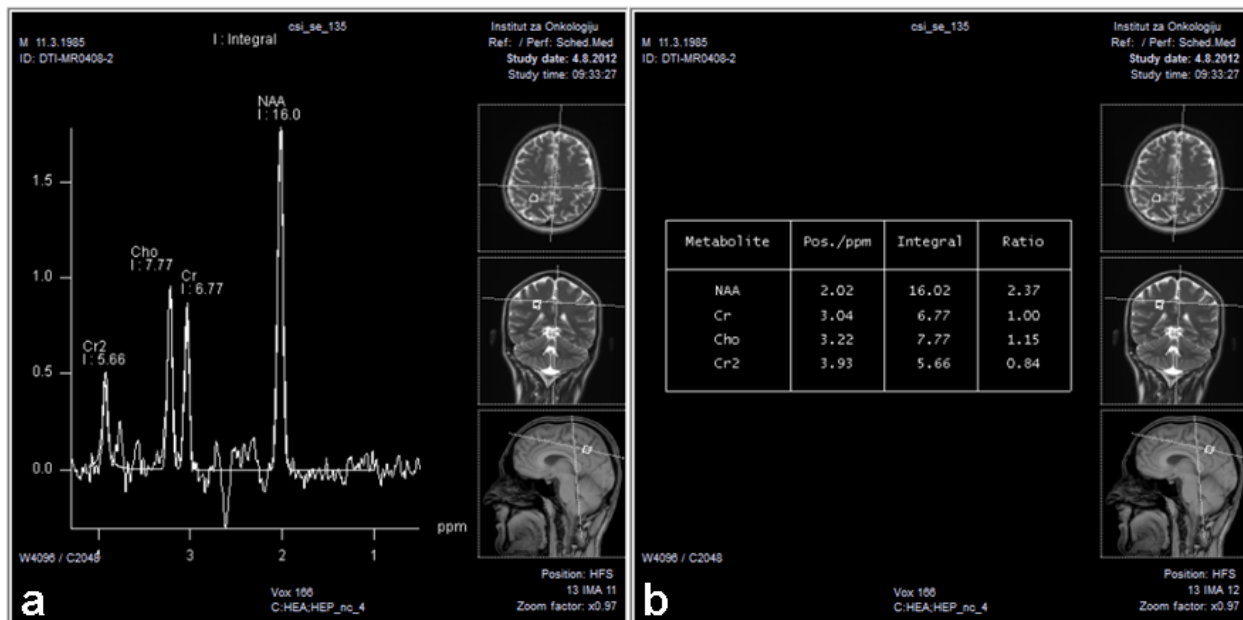
Naknadna poređenja uz pomoć *Tukey*-jevog HSD testa pokazuju se na vokselima 6 i 12 (dorzalni prednji cingulum desno, supkorteks parijetalno levo) značajno razlikuju grupe zdravih ispitanika i pacijenata koji su na terapiji (niži su nivoi Cho/Cr kod HIV+ pacijenata,  $p=0.036$  i  $p=0.018$ ), u vokselu 7 (dorzalni prednji cingulum levo) značajno se razlikuju zdravi ispitanici i pacijenti bez terapije (Cho/Cr je viši kod pacijenata bez terapije,  $p=0.038$ ). Na vokselima 4 (supkorteks frontalno levo) i 10 (posteriorni cingularni girus desno) zabeležen je statistički značajno viši odnos Cho/Cr kod zdravih ispitanika u odnosu na obe grupe HIV+ pacijenata (za pacijente na terapiji na vokselima 4 i 10  $p<0.001$  i  $p=0.001$ ; za pacijente bez uvedene terapije na vokselima 4 i 10  $p=0.015$  i  $p=0.045$ ). Ni na jednom vokselu nije zabeležena statistički značajna razlika u Cho/Cr odnosu između dve podgrupe HIV+ pacijenata (Tabela 13).

**Tabela 12.** Razlike u odnosima Cho/Cr dobijenih metodom MRS dugog eha, testirane ANOVA-om.

		Srednja vrednost	SD	Min	Max	F	P
Cho/Cr1	na terapiji	1.075	0.245	0.64	1.61	2.192	0.117
	bez terapije	1.044	0.198	0.76	1.46		
	kontrole	0.978	0.204	0.63	1.57		
Cho/Cr2	na terapiji	1.103	0.149	0.86	1.48	3.049	0.052
	bez terapije	1.192	0.171	0.92	1.48		
	kontrole	1.134	0.118	0.90	1.37		
Cho/Cr3	na terapiji	1.023	0.146	0.79	1.32	2.394	0.096
	bez terapije	1.080	0.239	0.77	1.75		
	kontrole	0.977	0.205	0.29	1.51		
Cho/Cr4	na terapiji	1.032	0.113	0.83	1.41	9.108	<b>&lt;0.001</b>
	bez terapije	1.064	0.155	0.74	1.37		
	kontrole	1.156	0.141	0.84	1.48		
Cho/Cr5	na terapiji	0.870	0.174	0.49	1.27	1.693	0.189
	bez terapije	0.890	0.182	0.56	1.20		
	kontrole	0.814	0.198	0.37	1.35		
Cho/Cr6	na terapiji	0.787	0.141	0.55	1.08	3.548	<b>0.032</b>
	bez terapije	0.859	0.159	0.55	1.22		
	kontrole	0.863	0.109	0.56	1.14		
Cho/Cr7	na terapiji	1.043	0.137	0.76	1.39	3.325	<b>0.040</b>
	bez terapije	1.085	0.204	0.65	1.64		
	kontrole	0.979	0.193	0.59	1.64		
Cho/Cr8	na terapiji	1.133	0.181	0.82	1.66	1.786	0.173
	bez terapije	1.194	0.185	0.93	1.57		
	kontrole	1.125	0.125	0.86	1.38		
Cho/Cr9	na terapiji	1.055	0.132	0.81	1.37	1.610	0.205
	bez terapije	1.070	0.182	0.61	1.44		
	kontrole	1.004	0.187	0.60	1.44		
Cho/Cr10	na terapiji	1.020	0.122	0.78	1.32	7.423	<b>0.001</b>
	bez terapije	1.060	0.217	0.68	1.74		
	kontrole	1.149	0.130	0.90	1.46		
Cho/Cr11	na terapiji	0.856	0.251	0.49	1.51	1.539	0.219
	bez terapije	0.903	0.189	0.61	1.53		
	kontrole	0.950	0.252	0.10	1.62		
Cho/Cr12	na terapiji	0.808	0.145	0.52	1.11	4.154	<b>0.018</b>
	bez terapije	0.834	0.138	0.59	1.14		
	kontrole	0.886	0.101	0.68	1.16		



**Slika 15.** Multivokselna MRS dugog eha (a) kod kontrolnog ispitanika u regiji parijetalne supkortikalne bele mase desno (voksel 9), koji pokazuje normalne odnose NAA/Cr (2.72) i Cho/Cr (0.81) (b).



**Slika 16.** Multivokselna MRS dugog eha (a) u regiji supkorteksa parijetalno desno (voksel 9) kod HIV+ ispitanika bez cART (a), koji pokazuje normalan odnos NAA/Cr (2.37) i povišen Cho/Cr odnos (1.15) (b).

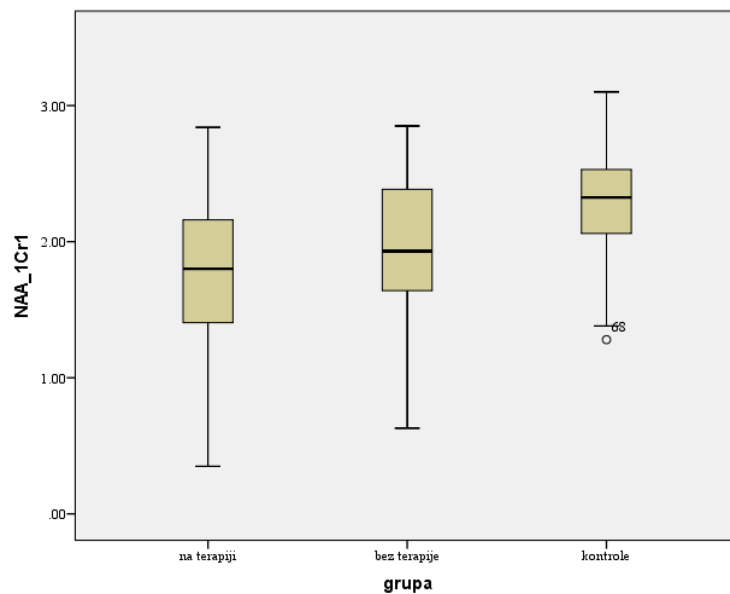
**Tabela 13.** Razlike u nivoima Cho/Cr između tri grupe ispitanika dobijene naknadnim testiranjem prema Tukey-u.

Post hoc Tukey HSD test	Dugi eho	HIV+ na terapiji / HIV+ bez terapije	Kontrole / HIV+ na terapiji	Kontrole / HIV+ bez terapije
	Cho/Cr1	0.842	0.116	0.393
	Cho/Cr2	0.055	0.622	0.225
	Cho/Cr3	0.519	0.567	0.080
	Cho/Cr4	0.622	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.015</b>
	Cho/Cr5	0.911	0.399	0.212
	Cho/Cr6	0.097	<b>0.036</b>	0.992
	Cho/Cr7	0.643	0.266	<b>0.038</b>
	Cho/Cr8	0.309	0.974	0.167
	Cho/Cr9	0.944	0.387	0.241
	Cho/Cr10	0.567	<b>0.001</b>	<b>0.045</b>
	Cho/Cr11	0.722	0.194	0.686
	Cho/Cr12	0.699	<b>0.018</b>	0.184

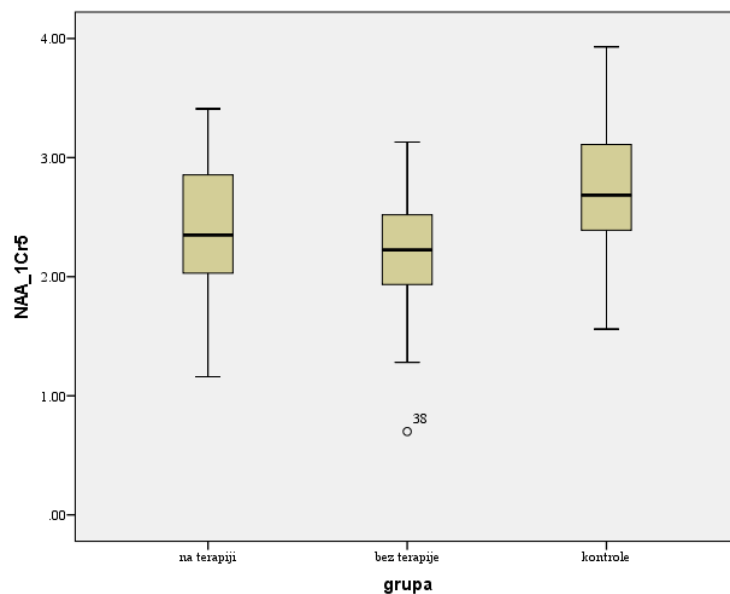
## 5.5. Rezultati multivokselne MR spektroskopije sa korišćenjem kratkog eha

### 5.5.1. NAA/Cr

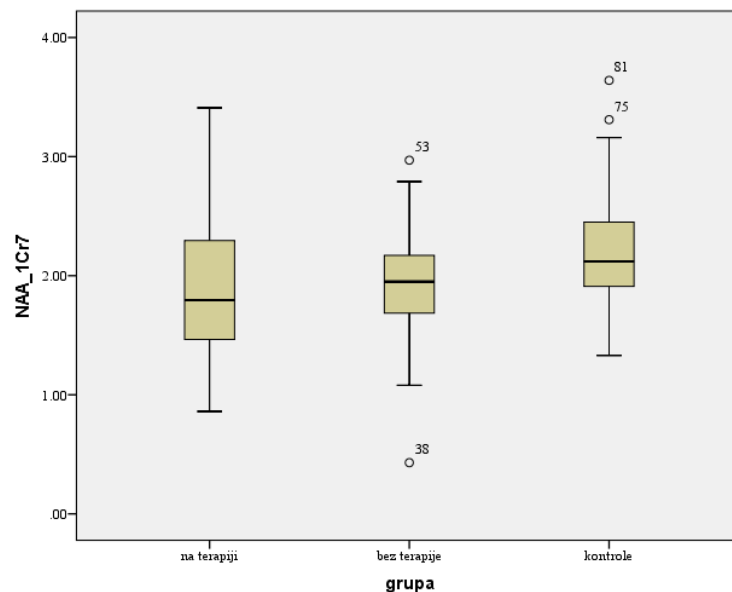
Na grafikonima 18-20. su prikazane raspodele vrednosti NAA/Cr kod sve tri grupe ispitanika.



**Grafikon 18.** Razlike između koncentracija NAA/Cr dobijenih metodom kratkog eha između tri grupe ispitanika u supkortikalnoj beloj masi frontalno desno.



**Grafikon 19.** Razlike između koncentracija NAA/Cr dobijenih metodom kratkog eha između tri grupe ispitanika u dubokoj beloj masi frontalno levo.



**Grafikon 20.** Razlike između koncentracija NAA/Cr dobijenih metodom kratkog eha između tri grupe ispitanika u svojoj masi levog prednjeg cingularnog girusa (dorzalni deo).

Zbog poznatog uticaja godina života na vrednosti NAA/Cr, koji smo pokazali i na ovom uzorku, te činjenice da su u našem uzorku pacijenti koji su na terapiji statistički značajno stariji od ostale dve grupe ispitanika, razlike u koncentracijama NAA/Cr dobijene na MR spektroskopiji sa kratkim ehom ispitivane su jednofaktorskom analizom kovarijanse (ANCOVA). Pre sprovođenja analize potvrđeno je da pomenute varijable zadovoljavaju uslove korišćenja ove tehnike (normalnost raspodele, linearnost, homogenost varijansi, homogenost regresionih nagiba i pouzdanosti merenja kovarijeteta). Kao nezavisna varijabla u analizu je uključena pripadnost grupi ispitanika, zavisnu varijablu činile su koncentracije NAA/Cr, dok su godine života u analizu uključene kao kovarijat (Tabela 14).

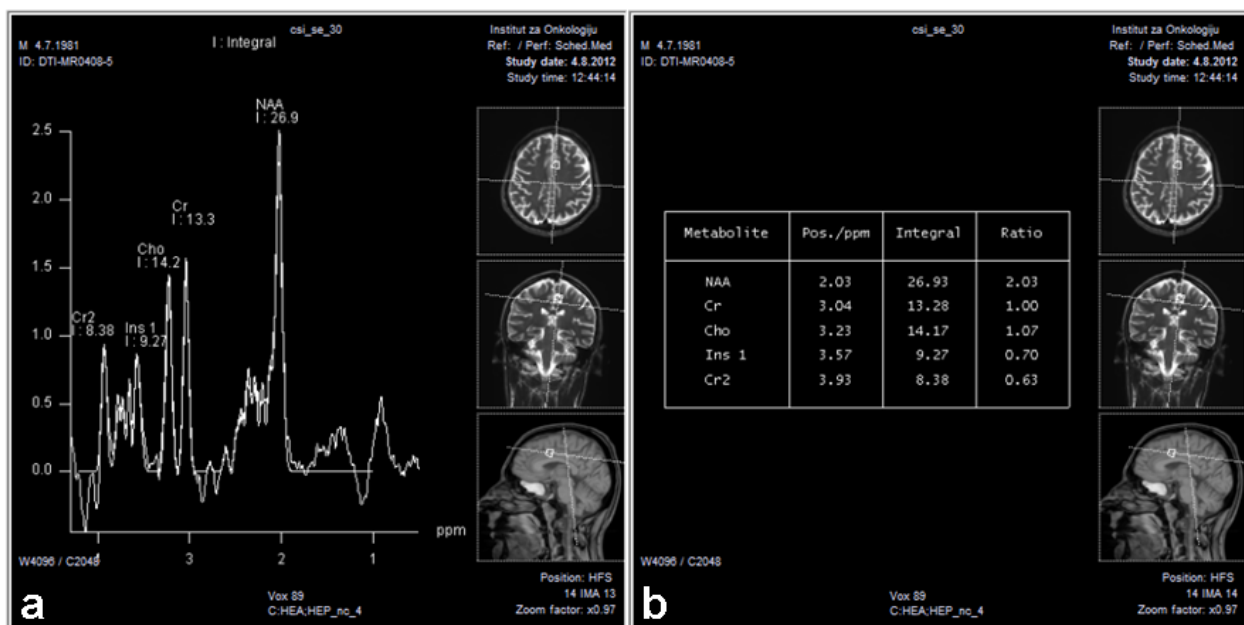
**Tabela 14.** Razlika između grupa ispitanika u nivoima NAA/Cr dobijenih metodom MRS kratkog eha.\*

Kratki eho		Srednja vrednost	SD	Min	Max	Procenjena srednja vrednost	F	P	Parcijalna $\eta^2$
NAA/Cr1	na terapiji	1.777	0.599	0.35	2.84	1.792	9.398	<b>&lt;0.001</b>	0.150
	bez terapije	1.958	0.516	0.63	2.85	1.948	0.405	0.526	0.004
	kontrole	2.283	0.430	1.28	3.10	2.279			
NAA/Cr2	na terapiji	1.916	0.554	0.97	3.32	1.908	1.040	0.357	0.019
	bez terapije	1.921	0.496	0.74	2.81	1.926	0.096	0.757	0.001
	kontrole	2.068	0.577	0.17	3.48	2.070			
NAA/Cr3	na terapiji	2.356	0.433	1.53	3.20	2.419	0.438	0.647	0.008
	bez terapije	2.452	0.490	1.70	3.32	2.413	7.325	<b>0.008</b>	0.065
	kontrole	2.522	0.538	1.42	3.53	2.503			
NAA/Cr4	na terapiji	1.981	0.490	1.29	3.49	2.035	0.039	0.962	0.001
	bez terapije	2.074	0.400	1.23	2.78	2.041	5.916	<b>0.017</b>	0.053
	kontrole	2.030	0.482	1.00	2.98	2.014			
NAA/Cr5	na terapiji	2.403	0.579	1.16	3.41	2.426	7.589	<b>0.001</b>	0.125
	bez terapije	2.200	0.608	0.70	3.13	2.186	0.700	0.405	0.007
	kontrole	2.707	0.541	1.56	3.93	2.700			
NAA/Cr6	na terapiji	2.008	0.432	1.09	2.96	2.013	1.487	0.232	0.027
	bez terapije	1.947	0.495	0.76	3.32	1.944	0.051	0.822	<0.001
	kontrole	2.127	0.460	1.24	3.00	2.125			
NAA/Cr7	na terapiji	1.887	0.580	0.86	3.41	1.929	3.510	<b>0.033</b>	0.062
	bez terapije	1.950	0.547	0.43	2.97	1.924	2.621	0.108	0.024
	kontrole	2.218	0.528	1.33	3.64	2.205			
NAA/Cr8	na terapiji	1.909	0.466	0.80	3.22	1.909	1.277	0.283	0.024
	bez terapije	1.900	0.558	0.68	3.12	1.900	<0.001	0.998	<0.001
	kontrole	2.047	0.391	1.17	2.97	2.047			
NAA/Cr9	na terapiji	2.184	0.453	1.50	3.52	2.164	1.942	0.148	0.035
	bez terapije	2.329	0.489	1.42	3.16	2.342	0.618	0.432	0.006
	kontrole	2.400	0.579	1.42	3.84	2.405			
NAA/Cr10	na terapiji	1.947	0.322	1.32	2.80	1.978	0.175	0.840	0.003
	bez terapije	2.010	0.435	1.16	3.19	1.991	2.328	0.130	0.021
	kontrole	2.039	0.449	1.23	3.48	2.030			
NAA/Cr11	na terapiji	2.181	0.565	0.92	2.97	2.206	0.592	0.555	0.011
	bez terapije	2.300	0.553	0.74	3.35	2.284	0.087	0.353	0.008
	kontrole	2.354	0.551	1.42	3.49	2.347			
NAA/Cr12	na terapiji	2.166	0.437	1.54	2.89	2.171	0.410	0.665	0.008
	bez terapije	2.088	0.405	1.34	3.28	2.085	0.047	0.828	<0.001
	kontrole	2.082	0.466	1.21	3.68	2.080			



\* Testiranje je izvršeno primenom ANCOVA testa, sa uključenjem godina života kao kovarijatom. Parcijalna  $\eta^2$  pokazuje doprinos dve varijable varijansi, u gornjem redu je doprinos pripadnosti grupi (prisustvo HIV infekcije), u donjem redu je doprinos dobi života. Značajnim se smatraju vrednosti parcijalne  $\eta^2 > 0.14$ .

Postoje statistički značajne razlike između tri grupe ispitanika u odnosu NAA/Cr dobijenom na MRS katkog eha, na nekoliko lokacija: 1, 5 i 7 (supkortikalna bela masa frontalno desno, duboka bela masa frontalno desno i dorzalni deo prednjeg cinguluma levo). Na vokselima 1 (frontalni supkorteks desno) i 5 (duboka bela masa frontalno desno) uticaj pripadnosti grupi, odnosno prisustvo HIV-a u organizmu, je jakog intenziteta, a uticaj starenja vrlo slabog (svega 0,4%, odnosno 0,7% varijanse); dok je na vokselu 7 (dorzalni prednji cingulum levo) uticaj pripadnosti grupi jakog intenziteta a starenja slabog (starenje doprinosi razlici sa svega 2,4% varijanse). Na slici 15. prikazano je sniženje NAA/Cr odnosa kod pacijenta na terapiji u regiji ventralnog prednjeg cinguluma levo, dobijenog metodom kratkog eha.



**Slika 17.** Spektar (a) dobijen iz regije sive mase levog ventralnog prednjeg cinguluma levo (voksel 3) metodom kratkog eha kod pacijenta na terapiji, pokazuje snižen odnos NAA/Cr (2.03), kao i povišene markere inflamacije (Cho/Cr=1.07, mI/Cr=0.7) (b).

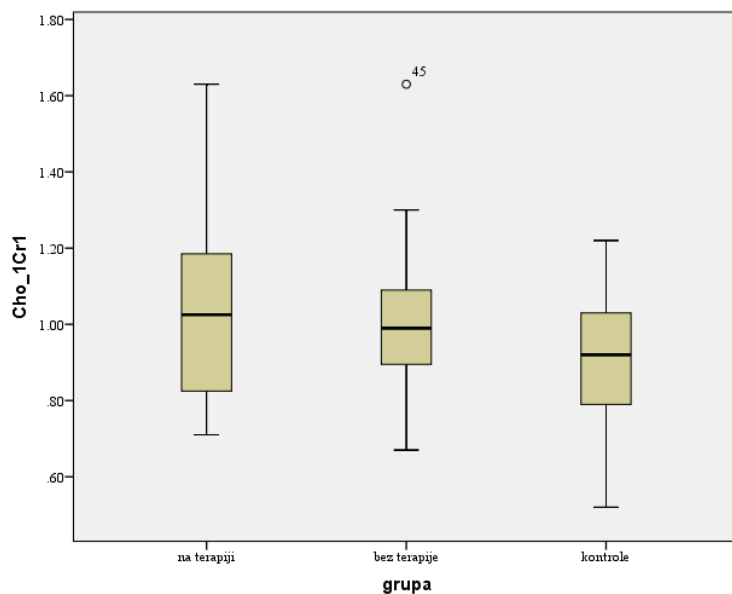
**Tabela 15.** Rezultati naknadnih testiranja razlike u odnosu NAA/Cr između grupa ispitanika.

Post hoc Tukey HSD test	Kratki eho	HIV+ na terapiji / HIV+ bez terapije	zdravi / HIV+ na terapiji	zdravi / HIV+ bez terapije
	NAA/Cr1	0.352	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.020</b>
	NAA/Cr2	0.999	0.446	0.497
	NAA/Cr3	0.736	0.307	0.823
	NAA/Cr4	0.720	0.890	0.914
	NAA/Cr5	0.357	0.052	<b>0.001</b>
	NAA/Cr6	0.868	0.493	0.230
	NAA/Cr7	0.896	<b>0.024</b>	0.120
	NAA/Cr8	0.996	0.386	0.367
	NAA/Cr9	0.532	0.167	0.837
	NAA/Cr10	0.830	0.591	0.951
	NAA/Cr11	0.687	0.354	0.909
	NAA/Cr12	0.773	0.680	0.998

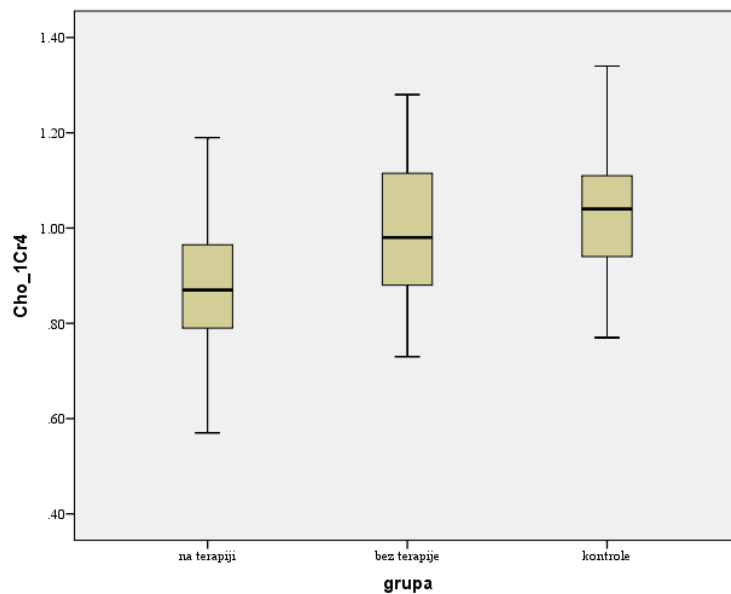
Odnosi NAA/Cr između zdravih kontrolnih i HIV+ subjekata na terapiji statistički značajno niži na vokselima 1 i 7 (supkorteks frontalno desno i dorzalni prednji cingularni girus levo), sa vrednostima  $p < 0.001$  i  $p = 0.024$ . Odnosi NAA/Cr su statistički značajno niži kod HIV+ pacijenata bez terapije u odnosu na zdrave kontrole na vokselima 1 i 5 (frontalna supkortikalna i duboka bela masa desno,  $p = 0.020$  i  $p = 0.001$ ). Između dve podgrupe HIV+ subjekata nisu zabeležene statistički značajne razlike u odnosima NAA/Cr na MV MRS kratkog eha.

### 5.5.2. Razlike u odnosima Cho/Cr dobijenih metodom MR spektroskopije kratkog eha

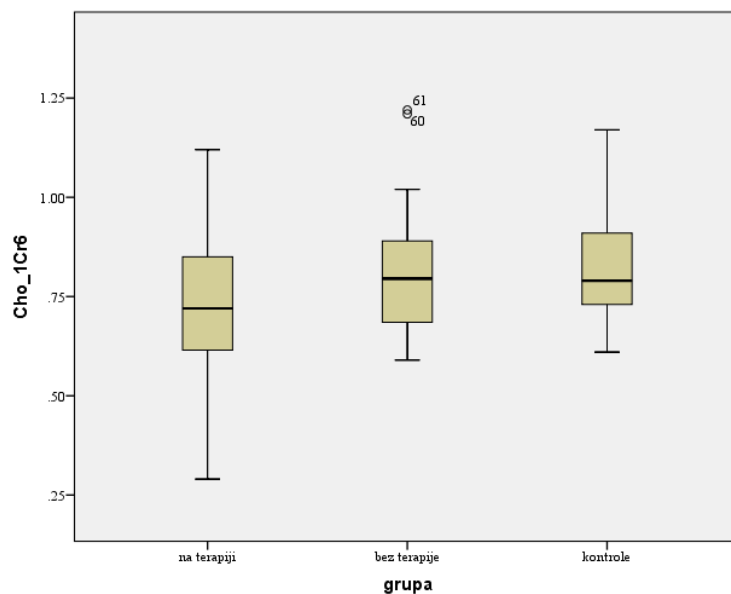
Na grafikonima 21-25. prikazana je raspodela vrednosti odnosa Cho/Cr dobijena metodom multivokselske MR spektroskopije kratkog eha između tri posmatrane grupe ispitanika (HIV+ na terapiji, HIV+ bez uvedene antiretroviralne terapije i zdravi kontrolni ispitanici), na onim lokalizacijama gde je potvrđena statistički značajna razlika među posmatranim grupama ispitanika (voksel 1- supkortikalna bela masa frontalno desno, voksel 4- supkortikalna bela masa frontalno levo, voksel 6- dorzalni deo prednjeg cingularnog girusa desno, voksel 10- zadnji cingularni girus desno i voksel 12- parijetalna supkortikalna bela masa sa leve strane).



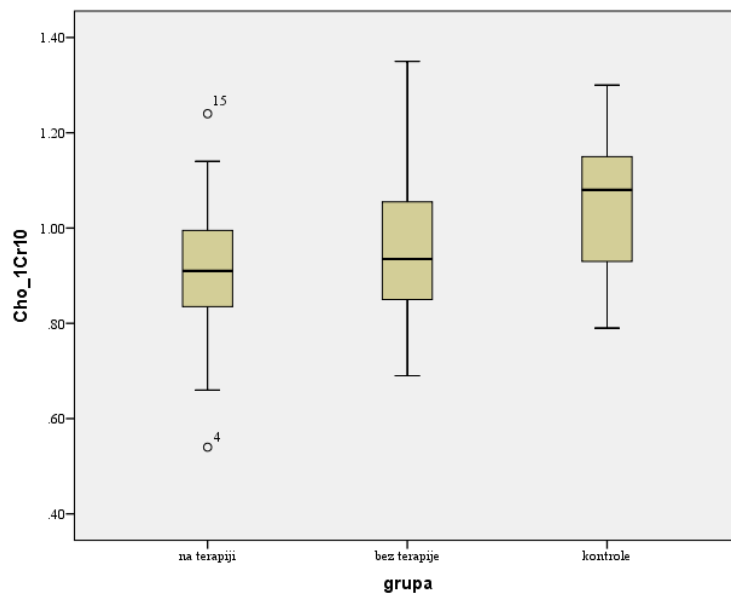
**Grafikon 21.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr dobijenih metodom kratkog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u supkortikalnoj beloj masi frontalno desno.



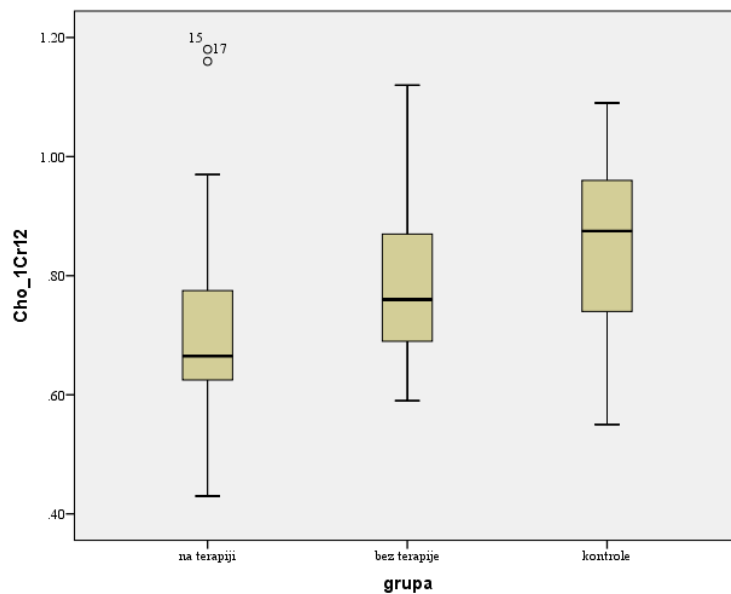
**Grafikon 22.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr dobijenih metodom kratkog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u supkortikalnoj beloj masi frontalno levo.



**Grafikon 23.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr dobijenih metodom kratkog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u sivoj masi desnog prednjeg cingularnog girusa (dorzalni deo).

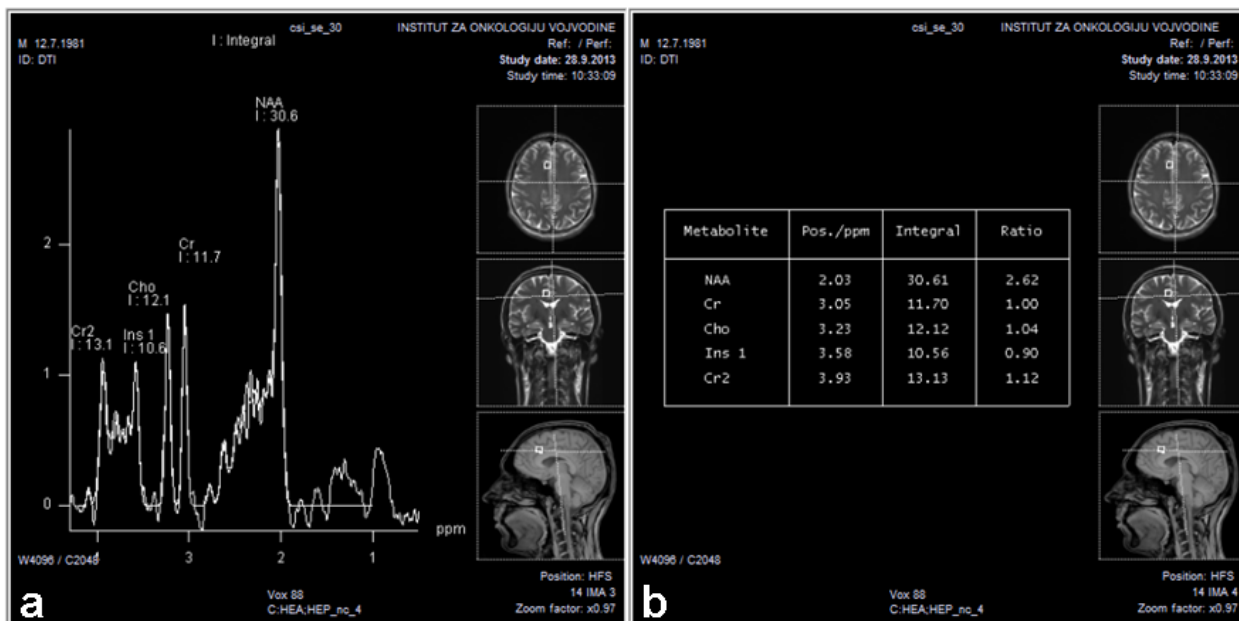


**Grafikon 24.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr dobijenih metodom kratkog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u svojoj masi desnog zadnjeg cingularnog girusa.



**Grafikon 25.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr dobijenih metodom kratkog eha između tri posmatrane grupe ispitanika u supkortikalnoj beloj masi parijetalno levo.

Univarijantnom analizom varijanse upoređene su vrednosti Cho/Cr među grupama ispitanika (Tabela 16.). Utvrđena je statistički značajna razlika u vrednostima holina između tri grupe ispitanika u vokselima 1, 4, 6, 10 i 12 (frontalni supkorteks obostrano, dorzalni deo prednjeg cingularnog girusa desno, zadnji cingulum desno i parijetalni supkorteks levo). Na vokselu 1 (frontalni supkorteks desno) uočava se da kontrolni subjekti imaju najniže vrednosti Cho/Cr a pacijenti na terapiji najviše ( $p=0.011$ ). U regiji frontalnog supkorteksa levo (voksel 4) situacija je upravo obrnuta (HIV+ pacijenti imaju najniže vrednosti Cho/Cr a kontrolni subjekti najviše,  $p<0.001$ ). Ista raspodela vrednosti se uočava i na vokselima 6 (dorzalni deo prednjeg cingularnog girusa desno,  $p=0.036$ ), 10 (posteriorni cingularni girus desno,  $p<0.001$ ) i 12 (parijetalni supkorteks levo,  $p<0.001$ ). Na slici 18. prikazan je spektar kratkog eha kod pacijenta bez cART u regiji desnog prednjeg cinguluma (ventralni deo) sa povišenim odnosom Cho/Cr.



**Slika 18.** MRS kratkog eha (a) kod pacijenta bez terapije u regiji ventralnog prednjeg cingularnog girusa desno (voksel 2), pokazuje povišenje odnosa Cho/Cr (1.03) i mI/Cr (0.9) kao i normalan odnos NAA/Cr (2.62) (b).

**Tabela 16.** Razlike u koncentracijama Cho/Cr po vokselima između tri grupe ispitanika, dobijene metodom MR spektroskopije kratkog eha, testirane pomoću ANOVA testa.

Kratki eho		Srednja vrednost	SD	Min	Max	F	p
Cho/Cr1	Na terapiji	1.044	0.253	0.71	1.63	4.708	<b>0.011</b>
	bez terapije	1.009	0.201	0.67	1.63		
	kontrole	0.913	0.159	0.52	1.22		
Cho/Cr2	Na terapiji	1.017	0.146	0.58	1.32	0.494	0.611
	bez terapije	1.032	0.148	0.69	1.33		
	kontrole	0.999	0.129	0.71	1.28		
Cho/Cr3	Na terapiji	0.948	0.217	0.34	1.57	0.447	0.640
	bez terapije	0.979	0.192	0.53	1.40		
	kontrole	0.995	0.232	0.64	1.78		
Cho/Cr4	Na terapiji	0.885	0.138	0.57	1.19	11.346	<b>&lt;0.001</b>
	bez terapije	0.996	0.153	0.73	1.28		
	kontrole	1.037	0.138	0.77	1.34		
Cho/Cr5	Na terapiji	0.802	0.203	0.38	1.47	0.664	0.517
	bez terapije	0.859	0.215	0.50	1.47		
	kontrole	0.832	0.167	0.38	1.32		
Cho/Cr6	Na terapiji	0.729	0.169	0.29	1.12	3.432	<b>0.036</b>
	bez terapije	0.813	0.163	0.59	1.22		
	kontrole	0.808	0.122	0.61	1.17		
Cho/Cr7	Na terapiji	1.001	0.213	0.66	1.42	0.873	0.421
	bez terapije	1.020	0.171	0.69	1.44		
	kontrole	0.961	0.211	0.57	1.59		
Cho/Cr8	Na terapiji	1.043	0.176	0.79	1.51	0.823	0.442
	bez terapije	1.003	0.151	0.71	1.36		
	kontrole	1.004	0.120	0.68	1.32		
Cho/Cr9	Na terapiji	0.951	0.159	0.62	1.34	1.127	0.328
	bez terapije	0.999	0.172	0.71	1.37		
	kontrole	1.005	0.169	0.68	1.49		
Cho/Cr10	Na terapiji	0.909	0.146	0.54	1.24	9.993	<b>&lt;0.001</b>
	bez terapije	0.956	0.153	0.69	1.35		
	kontrole	1.048	0.136	0.79	1.30		
Cho/Cr11	Na terapiji	0.767	0.194	0.49	1.27	1.149	0.321
	bez terapije	0.834	0.133	0.56	1.11		
	kontrole	0.807	0.181	0.43	1.27		
Cho/Cr12	Na terapiji	0.718	0.169	0.43	1.18	8.414	<b>&lt;0.001</b>
	bez terapije	0.796	0.137	0.59	1.12		
	kontrole	0.856	0.141	0.55	1.09		

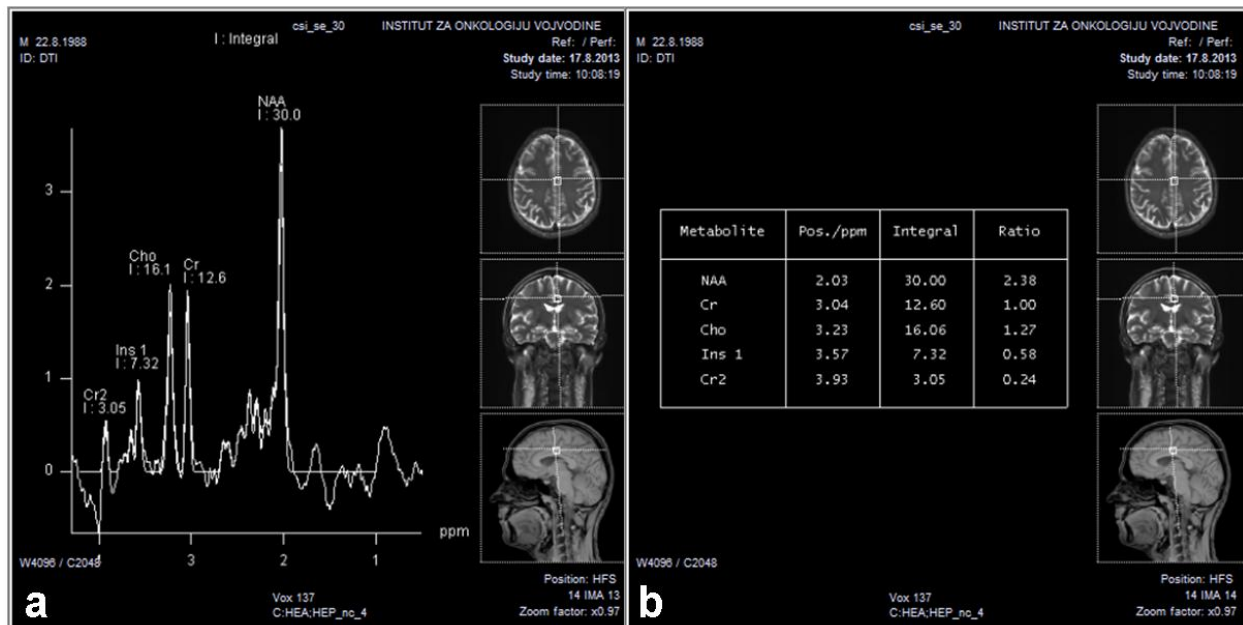
Naknadna poređenja uz pomoć *Tukey*-jevog HSD testa pokazuju da se na vokselima 1 i 12 (frontalni supkorteks desno i parijetalni supkorteks levo) značajno razlikuju grupe zdravih ispitanika i HIV+ pacijenata koji su na terapiji (niži su odnos Cho/Cr kod HIV+ pacijenata,  $p=0.016$ ). U vokselu 10 (zadnji cingulum desno) je zabeležen statistički značajno viši odnos Cho/Cr kod zdravih ispitanika u odnosu na obe grupe HIV+ pacijenata, kao i na vokselu 4 (frontalni supkorteks levo) i 6 (dorzalni prednji cingularni girus desno) (Tabela 17.).

**Tabela 17.** Rezultati naknadnih testiranja razlike u koncentracijama Cho/Cr metodom kratkog eha, između tri grupe ispitanika.

Post hoc Tukey HSD test	Kratki eho	HIV+ na terapiji / HIV+ bez terapije	Kontrole / HIV+ na terapiji	Kontrole / HIV+ bez terapije
	Cho/Cr1	0.842	<b>0.016</b>	0.393
	Cho/Cr2	0.055	0.622	0.225
	Cho/Cr3	0.519	0.567	0.080
	Cho/Cr4	0.622	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.015</b>
	Cho/Cr5	0.911	0.399	0.212
	Cho/Cr6	0.097	<b>0.036</b>	0.992
	Cho/Cr7	0.643	0.266	0.138
	Cho/Cr8	0.309	0.974	0.167
	Cho/Cr9	0.944	0.387	0.241
	Cho/Cr10	0.567	<b>0.001</b>	<b>0.045</b>
	Cho/Cr11	0.722	0.194	0.686
	Cho/Cr12	0.699	<b>0.018</b>	0.184

Na slici 19. prikazan je spektar mladog HIV+ pacijenta bez uvedene cART u regiji sive mase levog prednjeg cingularnog girusa, sa evidentnim značajno povišenim odnosom Cho/Cr.





**Slika 19.** Spektar (a) dobijen iz regije sive mase levog prednjeg cinguluma (dorzalni deo, vokal 7) metodom kratkog eha kod pacijenta bez uvedene terapije, pokazuje normalan odnos NAA/Cr (2.38), uz značajno povišen Cho/Cr (1.27) i umereno povišen mI/Cr odnos (0.58) (b).

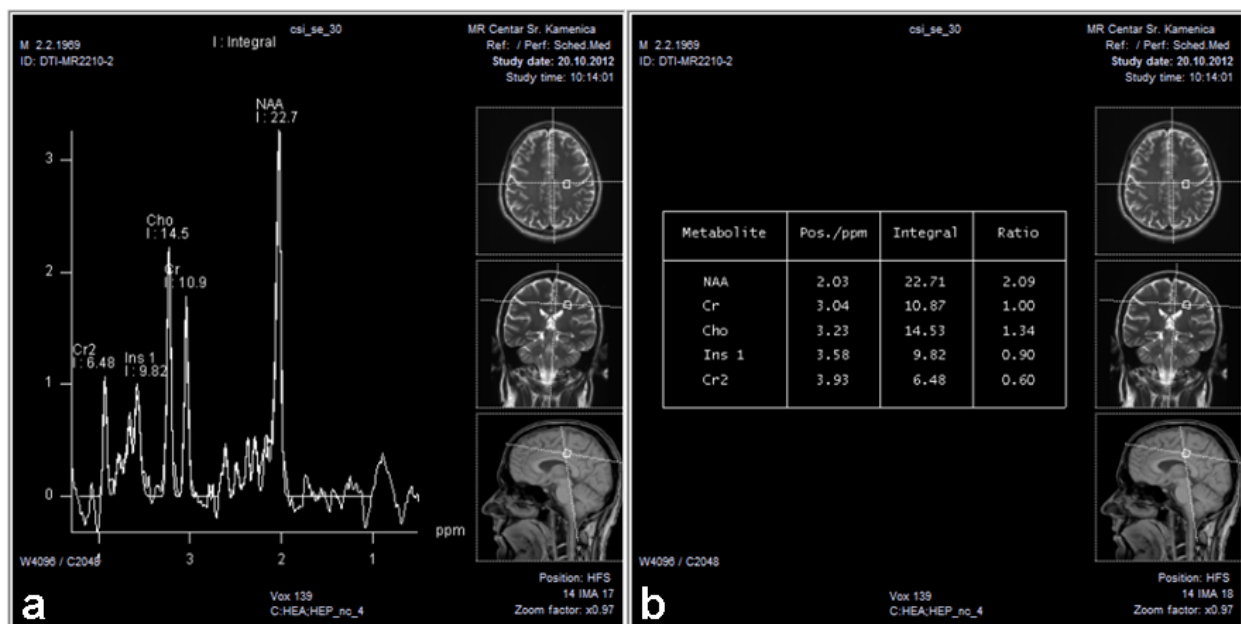
### 5.5.3. mI/Cr

Univarijantnom analizom varijanse (ANOVA) upoređene su vrednosti odnosa mI/Cr dobijenog na multivokselnoj MR spektroskopiji kratkog eha između tri posmatrane grupe ispitanika (Tabela 18). Utvrđena je statistički značajna razlika u vrednostima mioinozitola između tri grupe ispitanika u vokalima 2, 3, 4, 7, 8 i 9 (ventralni prednji cingulum obostrano, frontalni supkorteks levo, dorzalni prednji cingulum levo, duboka bela masa levo, parijetalni supkorteks desno). U regiji ventralnog cinguluma obostrano, značajno su više vrednosti mI/Cr kod obe grupe HIV+ pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike ( $p=0.001$  za vokal 2 i  $p=0.006$  za vokal 3). Na vokselu 4 razlika je na granici statističke značajnosti ( $p=0.045$ ) i prisutna je na račun razlike između HIV+ pacijenata bez terapije i zdravih kontrola. Na vokselima 7, 8 i 9 evidentna je značajna razlika između zdravih subjekata i obe grupe HIV+ pacijenata ( $p<0.001$ ,  $p=0.001$  i  $p=0.018$ , respektivno).

**Tabela 18.** Razlike u odnosima mI/Cr dobijene metodom kratkog eha, na posmatranim vokselima, kod ispitivanih subjekata.

Kratki eho		Srednja vrednost	SD	Min	Max	F	p
mI/Cr1	na terapiji	0.488	0.156	0.22	0.74	2.697	0.072
	bez terapije	0.515	0.206	0.17	1.18		
	Kontrole	0.432	0.132	0.21	0.73		
mI/Cr2	na terapiji	0.680	0.212	0.34	1.19	8.082	<b>0.001</b>
	bez terapije	0.625	0.185	0.34	1.06		
	Kontrole	0.530	0.125	0.28	0.82		
mI/Cr3	na terapiji	0.465	0.162	0.20	0.88	5.433	<b>0.006</b>
	bez terapije	0.540	0.140	0.29	0.94		
	Kontrole	0.436	0.113	0.20	0.74		
mI/Cr4	na terapiji	0.587	0.148	0.18	0.94	3.196	<b>0.045</b>
	bez terapije	0.667	0.181	0.39	1.14		
	Kontrole	0.578	0.147	0.26	0.97		
mI/Cr5	na terapiji	0.390	0.137	0.08	0.67	0.274	0.761
	bez terapije	0.419	0.180	0.13	0.90		
	Kontrole	0.407	0.147	0.15	0.83		
mI/Cr6	na terapiji	0.381	0.123	0.18	0.70	0.643	0.528
	bez terapije	0.411	0.109	0.24	0.70		
	Kontrole	0.407	0.120	0.23	0.70		
mI/Cr7	na terapiji	0.770	0.215	0.30	1.18	17.112	<b>&lt;0.001</b>
	bez terapije	0.646	0.180	0.35	0.99		
	Kontrole	0.515	0.187	0.07	1.05		
mI/Cr8	na terapiji	0.688	0.196	0.32	1.09	7.679	<b>0.001</b>
	bez terapije	0.637	0.196	0.32	1.07		
	Kontrole	0.540	0.143	0.24	0.83		
mI/Cr9	na terapiji	0.714	0.186	0.27	1.11	4.161	<b>0.018</b>
	bez terapije	0.706	0.223	0.34	1.15		
	Kontrole	0.606	0.173	0.27	0.91		
mI/Cr10	na terapiji	0.602	0.119	0.30	0.88	0.167	0.846
	bez terapije	0.615	0.157	0.32	0.99		
	Kontrole	0.594	0.166	0.22	1.03		
mI/Cr11	na terapiji	0.470	0.181	0.07	1.04	0.785	0.459
	bez terapije	0.514	0.195	0.27	1.00		
	Kontrole	0.464	0.156	0.25	0.97		
mI/Cr12	na terapiji	0.407	0.111	0.18	0.66	0.497	0.610
	bez terapije	0.432	0.109	0.26	0.66		
	Kontrole	0.406	0.112	0.18	0.63		

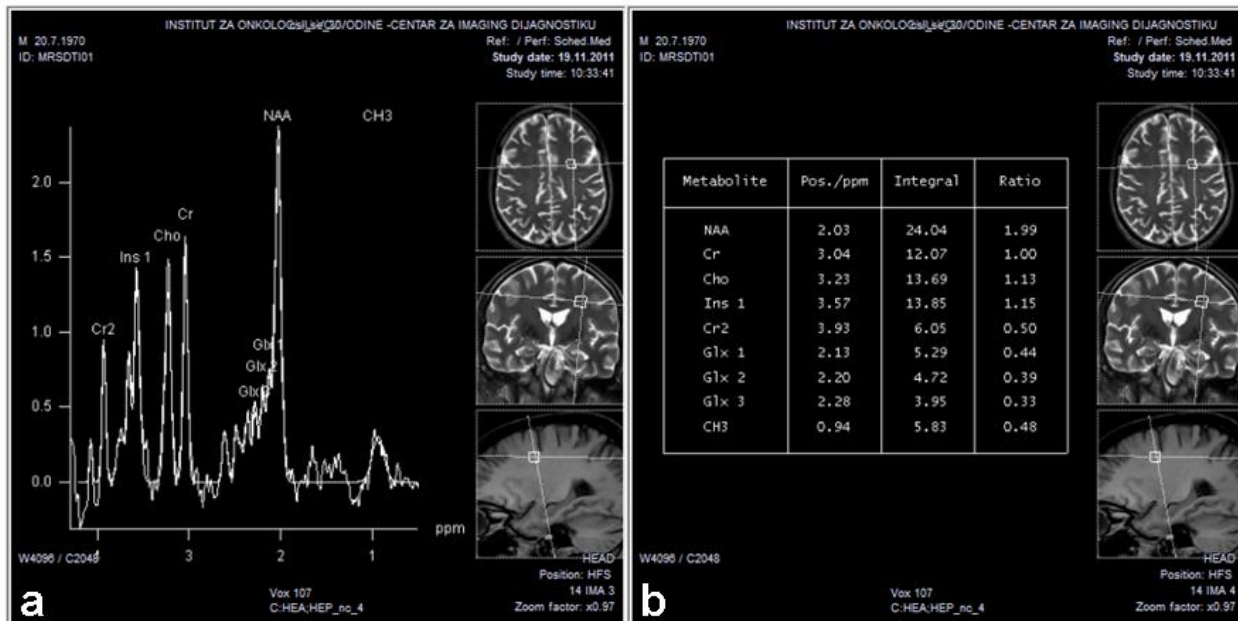
Naknadna poređenja uz pomoć *Tukey*-jevog HSD testa pokazuju da su na vokselima 2 i 8 (ventralni prednji cingulum desno, frontalni supkorteks levo) koncentracije mioinozitola statistički značajno niže kod kontrola u odnosu na obe grupe HIV+ pacijenata (na vokselu 2  $p < 0.001$  za HIV+ pacijente na terapiji i  $p = 0.05$  za HIV+ bez terapije; na vokselu 8  $p = 0.001$  za HIV+ pacijente na terapiji i  $p = 0.05$  za HIV+ pacijente bez terapije, Slika 20). Na vokselima 3 i 4 (ventralni prednji cingulum levo i frontalni supkorteks levo) zabeležene su najviše vrednosti mioinozitola kod pacijenata bez terapije, koje se statistički značajno razlikuju samo od zdravih ispitanika ( $p = 0.004$  na vokselu 3,  $p = 0.044$  na vokselu 4), dok se vrednosti mioinozitola kod pacijenata na terapiji ne razlikuju statistički značajno od druge dve grupe ispitanika (Slika 21). Jedino su na vokselu 7 (dorzalni prednji cingularni girus levo) zabeležene statistički značajne razlike među svim grupama ispitanika. Kod HIV+ pacijenata bez terapije su koncentracije najviše i statistički značajno više u odnosu na HIV+ subjekte na terapiji ( $p = 0.041$ ), kao i u odnosu na kontrolne  $p = 0.014$ ). Na vokselu 9 (parijetalna supkortikalna bela masa desno) zabeležena je razlika između pacijenata na terapiji i kontrolne grupe ( $p = 0.035$ ), dok se pacijenti bez terapije i zdravi subjekti na datom vokselu ne razlikuju (Tabela 19).



**Slika 20.** Spektar (a) dobijen iz regije duboke bele mase frontalno levo (voksel 8) metodom kratkog eha kod pacijenta bez uvedene terapije, pokazuje normalan/blago snižen odnos NAA/Cr (2.09), značajno povišene Cho/Cr (1.34) i mI/Cr odnose (0.9) (b).

**Tabela 19.** Razlike u odnosima mI/Cr dobijene naknadnim testiranjem (post-hoc analiza), po grupama ispitanika.

Post hoc Tukey HSD test	Kratki eho	HIV+ na terapiji / HIV+ bez terapije	Kontrole / HIV+ na terapiji	Kontrole / HIV+ bez terapije
	mI/Cr1	0.803	0.270	0.079
	mI/Cr2	0.430	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.050</b>
	mI/Cr3	0.081	0.615	<b>0.004</b>
	mI/Cr4	0.121	0.961	<b>0.044</b>
	mI/Cr5	0.748	0.869	0.947
	mI/Cr6	0.588	0.578	0.992
	mI/Cr7	<b>0.041</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.014</b>
	mI/Cr8	0.495	<b>0.001</b>	<b>0.050</b>
	mI/Cr9	0.986	<b>0.035</b>	0.069
	mI/Cr10	0.946	0.969	0.832
	mI/Cr11	0.593	0.989	0.451
	mI/Cr12	0.693	0.999	0.615



**Slika 21.** Spektar (a) dobijen iz regije supkortikalne bele mase frontalno levo (voksel 4), metodom kratkog eha, kod pacijenta bez terapije, pokazuje veoma izražene markere inflamacije ( $Cho/Cr=1.13$ ,  $mI/Cr=1.15$ ) (b).

#### 5.5.4. $(Glx+Gln)/Cr$

Odnose  $(Glx+Gln)/Cr$  smo upoređivali samo između dve podgrupe pacijenata sa HIV infekcijom, obzirom na literaturne podatke o povišenim nivoima u akutnoj HIV infekciji. Statistički je značajna razlika između HIV+ pacijenata bez terapije i HIV+ pacijenata na terapiji samo u regiji posteriornog cingularnog girusa desno (voksel 10), gde su kod pacijenata bez uvedene terapije zabeležene više vrednosti ovog odnosa metabolita ( $p=0.025$ ). Korišćenjem t-testa nezavisnih uzoraka, nije pokazana statistički značajna razlika među posmatranim grupama pacijenata ni na jednoj drugoj posmatranoj lokalizaciji (Tabela 20.).

**Tabela 20.** Razlike u odnosima (Glx+Gln)/Cr na posmatranim vokselima, između dve grupe HIV+ subjekata, dobijene pomoću t-testa.

Kratki eho		Srednja vrednost	SD	Min	Max	T	p
(Glx+Gln)/Cr1	na terapiji	0.3713	0.12943	0.11	0.65	-0.118	0.852
	bez terapije	0.3771	0.11118	0.16	0.61		
(Glx+Gln)/Cr2	na terapiji	0.4097	0.12558	0.21	0.73	-0.828	0.411
	bez terapije	0.4354	0.11273	0.23	0.67		
(Glx+Gln)/Cr3	na terapiji	0.3647	0.14695	0.10	0.77	-0.119	0.906
	bez terapije	0.3689	0.12574	0.16	0.61		
(Glx+Gln)/Cr4	na terapiji	0.4300	0.12976	0.12	0.75	0.384	0.702
	bez terapije	0.4175	0.12097	0.16	0.64		
(Glx+Gln)/Cr5	na terapiji	0.4447	0.16710	0.13	0.90	0.892	0.376
	bez terapije	0.4839	0.17338	0.11	0.80		
(Glx+Gln)/Cr6	na terapiji	0.4166	0.11485	0.16	0.63	0.664	0.509
	bez terapije	0.4382	0.13776	0.25	0.85		
(Glx+Gln)/Cr7	na terapiji	0.4878	0.16506	0.21	0.92	1.320	0.192
	bez terapije	0.4350	0.14154	0.20	0.79		
(Glx+Gln)/Cr8	na terapiji	0.3756	0.15709	0.13	0.69	0.233	0.817
	bez terapije	0.3671	0.11919	0.18	0.67		
(Glx+Gln)/Cr9	na terapiji	0.3869	0.15965	0.09	0.82	1.573	0.121
	bez terapije	0.3261	0.13666	0.12	0.64		
(Glx+Gln)/Cr10	na terapiji	0.4384	0.13905	0.12	0.67	2.304	<b>0.025</b>
	bez terapije	0.3629	0.11102	0.17	0.62		
(Glx+Gln)/Cr11	na terapiji	0.4913	0.19920	0.24	0.94	1.118	0.268
	bez terapije	0.4421	0.12758	0.21	0.73		
(Glx+Gln)/Cr12	na terapiji	0.3934	0.14610	0.10	0.78	-0.537	0.593
	bez terapije	0.4146	0.15978	0.11	0.68		

## 5.6. Značajnosti razlika u posmatranim odnosima metabolita prema lokalizacijama

U tabeli 21. su prikazane značajnosti odnosa metabolita koji su ispitivani metodom dugog i kratkog eha prema pregledanim lokalizacijama. Vokseli 4, 7 i 10 su dali najviše informacija (supkortikalna bela masa frontalno levo, dorzalni prednji cingulum levo te parijetalni supkorteks leve cerebralne hemisfere), sa prikazanim značajnim razlikama u bar 4 odnosa metabolita. Na vokselu 4 (frontalni supkorteks leve hemisfere) uočavaju se značajne razlike u nivoima NAA/Cr, Cho/Cr na dugom ehu te u odnosima Cho/Cr i mI/Cr na kratkom ehu, odnosno mogu se proceniti kako parametri neurodegeneracije, tako i inflamatornih promena koje se odvijaju u ovoj jedinici zapremine. Na vokselu 7 (dorzalni prednji cingularni girus levo) uočavaju se značajnosti u razlikama odnosa NAA/Cr i Cho/Cr na dugom ehu te NAA/Cr i mI/Cr na kratkom ehu, što takođe odražava odvijanje paralelnih procesa neurodegeneracije i neuroinflamacije u sivoj masi na ovoj lokalizaciji. Na vokselu 10 (posteriorni cingularni girus desno) prisutne su razlike u odnosima metabolita NAA/Cr i Cho/Cr na dugom ehu, Cho/Cr na kratkom ehu te (Glx+Gln)/Cr. Ovo je jedini voksel na kom su prikazane makar i minimalne razlike u odnosu (Glx+Gln)/Cr, te je jedino iz ovog vokselu dobijena informacija o poremećaju glutaminične ravnoteže u beloj masi.

**Tabela 21.** Značajnosti razlike u koncentracijama različitih metabolita prema lokalizaciji, između tri grupe ispitanika.

	NAA/Cr Dugi eho	Cho/Cr Dugi eho	NAA/Cr Kratki eho	Cho/Cr Kratki eho	mI/Cr kratki eho	(Glx+Gln)/Cr Kratki eho
1- supkorteks frontalno desno	+		+	+		
2-ventralni prednji cingulum desno	+				+	
3-ventralni prednji cingulum levo	+				+	
4-frontalni supkorteks levo	+	+		+	+	
5- duboka bela masa desno	+		+			
6- dorzalni prednji cingulum desno	+	+		+		
7- dorzalni prednji cingulum levo	+	+	+		+	
8- duboka bela masa levo	+				+	
9- parijetalni supkorteks desno	+				+	
10-zadnji cingulum desno	+	+		+		+
11-zadnji cingulum levo	+					
12-parijetalni supkorteks levo	+	+		+		



Vokseli koji su pružili informacije o tri metabolita su: 1- frontalni supkorteks desno, 6- dorzalni prednji cingulum desno i 12- parijetalni supkorteks levo. U supkorteksu frontalno desno uočavaju se razlike odnosima NAA/Cr na dugom ehu, te NAA/Cr i Cho/Cr na kratkom ehu, što korelira sa stepenom neurodegeneracije. Unutar druga dva vokseli (6 i 12) prikazane su promene u odnosima NAA/Cr, Cho/Cr na dugom i Cho/Cr na kratkom ehu, što pre govori u prilog neurodegenerativnim, nego inflamatornim promenama.

Unutar nekoliko vokseli prikazane su razlike u odnosima samo dva metabolita (2, 3, 5, 8 i 9). Na vokselima 2, 3, 8 i 9 (ventralni prednji cingulum obostrano, te duboka bela masa frontalno levo i parijetalni supkorteks desne hemisfere) prikazane su razlike u odnosima NAA/Cr na dugom ehu i mI/Cr na kratkom ehu, što bi odražavalo istovremene procese neurodegeneracije i inflamacije, najverovatnije posredovane astrocitnom proliferacijom. Na vokselu 5 (duboka bela masa frontalno desno) prikazane su razlike u odnosu NAA/Cr i na dugom i na kratkom ehu, što govori u prilog dominantnom procesu neurodegeneracije na ovoj zapreminskoj jedinici. Na vokselu 11 (zadnji cingulum levo) pokazana je značajna razlika samo u odnosu NAA/Cr na dugom ehu.

Na svim od 12 izabranih vokseli je prikazana statistički značajna razlika u odnosima metabolita, što implicira difuzno zahvatanje moždanog tkiva promenama u sklopu HIV infekcije.

### **5.7. Korelacija imunoloških parametara i odnosa metabolita na posmatranim lokalizacijama**

Korišćenjem Pirsonove linearne korelacije, ispitivali smo korelacije odnosa metabolita dobijenih metodom multivokselne MR spektroskopije sa imunološkim parametrima, dobijenim iz plazme pacijenata sa HIV-infekcijom. Imunološki parametri koji su posmatrani su broj nadir CD4+ T-limfocita (najniži nivo CD4+ T-limfocita koji je zabeležen u istoriji bolesti), te broj CD4+, CD3+ i CD8+ T-limfocita, Takođe, posmatran je i odnos CD4+/CD8+, koji predstavlja marker serokonverzije.

**Tabela 22.** Rezultati korelacije odnosa NAA/Cr dobijenih na MRS dugog eha sa parametrima T-limfocita.

Dugi eho		CD4	CD8	CD3	CD4/8	NADIR CD4
NAA/Cr1	r	-0.156	-0.094	-0.119	-0.017	0.166
	p	0.257	0.497	0.388	0.924	0.206
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr2	r	-0.323*	-0.266*	-0.305*	0.096	0.377**
	p	0.020	0.049	0.024	0.584	<b>0.003</b>
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr3	r	-0.087	-0.117	-0.117	0.048	-0.005
	p	0.526	0.393	0.394	0.785	0.970
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr4	r	-0.130	-0.128	-0.127	-0.028	0.394**
	p	0.346	0.352	0.356	0.874	<b>0.002</b>
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr5	r	0.291*	0.104	0.192	0.092	0.009
	p	0.032	0.450	0.161	0.601	0.948
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr6	r	0.115	0.127	0.108	-0.094	0.032
	p	0.401	0.355	0.432	0.591	0.815
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr7	r	-0.127	-0.132	-0.125	0.084	0.295*
	p	0.354	0.340	0.362	0.630	<b>0.022</b>
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr8	r	-0.262	-0.143	-0.203	0.025	0.507**
	p	0.053	0.299	0.137	0.885	<b>&lt;0.001</b>
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr9	r	-0.178	-0.212	-0.196	0.189	0.278*
	p	0.192	0.121	0.151	0.278	<b>0.032</b>
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr10	r	-0.122	-0.151	-0.161	0.069	0.460**
	p	0.377	0.271	0.239	0.693	<b>&lt;0.001</b>
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr11	r	-0.118	-0.076	-0.079	0.118	0.014
	p	0.389	0.583	0.568	0.498	0.915
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr12	r	0.284*	0.353**	0.345**	-0.025	0.014
	p	<b>0.036</b>	<b>0.008</b>	<b>0.010</b>	0.885	0.915
	N	55	55	55	35	60

Uočava se pozitivna korelacija nivoa NAA/Cr sa nadir CD4+ brojem T-limfocita na nekoliko voksela (2,  $p=0.002$ ; 4,  $p=0.003$ ; 7,  $p=0.022$ ; 8,  $p<0.001$ ; 9,  $p=0.032$ ; 10,  $p<0.001$ ). Ovaj je nalaz lako objasniti, obzirom da nivo nadir CD4+ T-limfocita direktno govori o dužini trajanja HIV infekcije. Dakle, što je duži period izloženosti organizma (i CNS-a) virusu HIV-a, niži je nadir CD4+ broj i niži su nivoi NAA/Cr, odnosno izraženije su neurodegenerativne promene. U tom smislu, nadir CD4+ broj se može koristiti kao dobar prediktor stepena neuronskog oštećenja u HIV infekciji. Takođe, na vokselu 12 (parijetalni supkorteks levo) evidentira se značajna pozitivna korelacija sa brojem CD4+, CD3+ i CD8+ T-limfocita u momentu snimanja ( $p=0.036$ ,  $p=0.008$ ,  $p=0.010$ , respektivno). Ovaj voksel pripada supkortikalnoj beloj masi parijetalno levo. I ovaj nalaz se može tumačiti na sličan način kao i prethodni: što je veći broj T-ćelija, bolji je imuni odgovor organizma i slabije su neurodegenerativne promene koje se pronalaze u mozgu.

Dobijena je negativna korelacija odnosa Cho/Cr sa brojem CD4+ T-limfocita samo na vokselu 2 (ventralni prednji cingularni girus desne hemisphere,  $p=0.032$ ). Ovo je očekivan rezultat, obzirom da odražava prisustvo inflamatornih/ degenerativnih promena u uslovima niskog broja CD4+ T-limfocita. Takođe se uočava pozitivna korelacija odnosa Cho/Cr sa nadir CD4+ T-ćelijama na vokselu 2 (siva masa ventralnog prednjeg cingularnog,  $p=0.044$ ) i 6 (siva masa dorzalnog prednjeg cingularnog girusa desno,  $p=0.047$ ). Ovaj se rezultat tumači kroz odnos nadir CD4+ T-limfocita i dužine trajanja infekcije. Duže trajanje infekcije odgovara nižem nadir CD4+ nivou i višem Cho/Cr odnosu na datom vokselu. Na ostalim vokselima, nije pokazana značajna korelacija ni sa jednim drugim parametrom imunološkog T-ćelijskog odgovora.

Nije dokazano postojanje signifikantnih korelacija ni na jednom ispitivanom vokselu korelacijom parametara T-limfocita sa odnosima NAA/Cr dobijenim na MRS kratkog eha.

Utvrđena je negativna korelacija odnosa Cho/Cr sa brojem CD4+ T-limfocita na vokselu 12 (supkorteks parijetalno levo,  $p=0.026$ ). Na vokselima 9 (supkorteks parijetalno desno,  $p=0.014$ ) i 11 (siva masa zadnjeg cingularnog girusa levo,  $p=0.018$ ) prikazana je pozitivna korelacija sa odnosom CD4+/CD8+.

**Tabela 23.** Rezultati testa korelacije odnosa Cho/Cr dobijenih na metodi MRS dugog eha sa parametrima T-ćelijskog odgovora.

Dugi eho		CD4	CD8	CD3	CD4/8	NADIR CD4
Cho/Cr1	r	0.061	0.026	0.036	0.040	-0.082
	p	0.658	0.848	0.796	0.818	0.531
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr2	r	-0.291*	-0.214	-0.243	-0.023	0.261
	p	<b>0.032</b>	0.118	0.074	0.896	<b>0.044</b>
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr3	r	0.034	0.038	0.037	0.294	0.196
	p	0.808	0.781	0.791	0.087	0.133
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr4	r	-0.196	-0.041	-0.102	-0.008	-0.063
	p	0.151	0.766	0.460	0.966	0.632
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr5	r	0.032	0.117	0.110	0.122	0.111
	p	0.815	0.396	0.422	0.486	0.400
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr6	r	-0.124	0.056	0.013	-0.032	0.258
	p	0.365	0.683	0.928	0.854	<b>0.047</b>
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr7	r	-0.093	0.010	-0.012	0.180	0.124
	p	0.501	0.941	0.933	0.300	0.347
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr8	r	-0.197	-0.148	-0.178	-0.075	0.037
	p	0.150	0.282	0.193	0.668	0.777
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr9	r	0.048	0.003	0.025	0.250	0.097
	p	0.729	0.980	0.855	0.147	0.461
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr10	r	-0.236	-0.108	-0.159	-0.026	-0.079
	p	0.083	0.432	0.248	0.880	0.549
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr11	r	-0.206	-0.013	-0.071	0.162	-0.101
	p	0.132	0.924	0.605	0.353	0.441
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr12	r	0.085	0.201	0.169	0.233	0.189
	p	0.537	0.142	0.217	0.178	0.148
	N	55	55	55	35	60

**Tabela 24.** Rezultati korelacija odnosa NAA/Cr dobijenih metodom MRS kratkog eha sa parametrima T-limfocita.

Kratki eho		CD4	CD8	CD3	CD4/8	NADIR CD4
NAA/Cr1	r	-0.138	-0.177	-0.212	0.089	0.014
	p	0.325	0.196	0.121	0.611	0.915
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr2	r	0.035	-0.034	0.014	-0.077	-0.054
	p	0.799	0.804	0.920	0.662	0.681
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr3	r	-0.128	-0.088	-0.126	0.049	0.075
	p	0.353	0.521	0.360	0.781	0.570
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr4	r	-0.187	-0.214	-0.234	-0.151	0.158
	p	0.173	0.117	0.086	0.388	0.227
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr5	r	0.133	0.249	0.242	0.048	0.006
	p	0.332	0.067	0.076	0.783	0.966
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr6	r	0.025	0.050	0.033	-0.086	0.030
	p	0.856	0.718	0.812	0.625	0.821
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr7	r	0.032	-0.043	-0.032	0.116	-0.056
	p	0.821	0.756	0.815	0.508	0.671
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr8	r	0.080	-0.093	-0.012	0.198	0.158
	p	0.564	0.500	0.932	0.253	0.228
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr9	r	-0.110	-0.193	-0.186	0.018	0.242
	p	0.423	0.157	0.173	0.917	0.062
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr10	r	-0.173	-0.156	-0.203	-0.151	0.207
	p	0.206	0.256	0.138	0.387	0.113
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr11	r	-0.124	-0.151	-0.133	-0.006	0.052
	p	0.368	0.270	0.333	0.972	0.695
	N	55	55	55	35	60
NAA/Cr12	r	0.062	0.134	0.124	-0.159	-0.040
	p	0.652	0.328	0.368	0.361	0.762
	N	55	55	55	35	60

**Tabela 25.** Rezultati testa korelacije odnosa Cho/Cr dobijenih na MRS kratkog eha, sa parametrima T-limfocita.

Kratki eho		CD4	CD8	CD3	CD4/8	NADIRCD4
Cho/Cr1	r	-0.016	0.084	0.093	0.188	-0.013
	p	0.909	0.544	0.499	0.281	0.924
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr2	r	0.102	0.090	0.071	0.089	0.194
	p	0.459	0.513	0.608	0.613	0.138
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr3	r	0.061	-0.049	-0.013	0.309	0.222
	P	0.659	0.721	0.926	0.071	0.088
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr4	r	-0.256	-0.111	-0.160	0.149	0.210
	p	0.059	0.421	0.243	0.393	0.107
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr5	r	-0.072	0.062	0.007	0.151	-0.019
	p	0.602	0.655	0.959	0.385	0.883
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr6	r	-0.241	-0.103	-0.118	0.076	0.113
	p	0.076	0.452	0.392	0.663	0.391
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr7	r	0.026	0.035	0.026	0.328	0.089
	p	0.853	0.801	0.853	0.054	0.498
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr8	r	0.198	0.169	0.185	0.085	0.034
	p	0.147	0.219	0.175	0.628	0.796
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr9	r	-0.107	-0.133	-0.126	0.412*	0.098
	p	0.435	0.332	0.359	<b>0.014</b>	0.456
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr10	r	-0.138	-0.103	-0.119	0.200	0.018
	p	0.324	0.452	0.388	0.248	0.894
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr11	r	-0.220	-0.122	-0.166	0.398*	0.191
	p	0.106	0.375	0.227	<b>0.018</b>	0.144
	N	55	55	55	35	60
Cho/Cr12	r	-0.299*	-0.178	-0.232	0.028	0.048
	p	<b>0.026</b>	0.193	0.090	0.874	0.716
	N	55	55	55	35	60

**Tabela 26.** Korelacija odnosa mI/Cr dobijenim metodom MRS kratkog eha sa parametrima T-ćelijskog odgovora.

Kratki eho		CD4	CD8	CD3	CD4/8	NADIR CD4
mI/Cr1	r	-0.009	0.032	0.006	0.026	-0.154
	p	0.949	0.816	0.968	0.884	0.240
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr2	r	0.159	0.029	0.076	0.018	-0.299*
	p	0.246	0.832	0.582	0.919	<b>0.020</b>
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr3	r	-0.260	-0.063	-0.148	0.161	0.066
	p	0.055	0.646	0.280	0.355	0.617
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr4	r	-0.220	-0.063	-0.110	-0.186	0.053
	p	0.107	0.648	0.425	0.285	0.689
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr5	r	-0.086	0.010	-0.038	0.119	0.032
	p	0.532	0.940	0.781	0.497	0.808
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr6	r	-0.070	-0.013	-0.019	0.003	0.122
	p	0.611	0.926	0.889	0.988	0.353
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr7	r	0.328*	0.221	0.259	0.188	-0.333**
	p	<b>0.018</b>	0.105	0.056	0.278	<b>0.009</b>
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr8	r	0.094	0.083	0.082	-0.115	-0.198
	p	0.494	0.545	0.551	0.512	0.130
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr9	r	-0.045	-0.056	-0.057	0.143	-0.349**
	p	0.743	0.687	0.681	0.413	<b>0.006</b>
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr10	r	-0.242	-0.119	-0.161	-0.094	-0.225
	p	0.074	0.388	0.241	0.591	0.083
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr11	r	-0.144	-0.028	-0.077	-0.009	-0.238
	p	0.295	0.839	0.577	0.958	0.067
	N	55	55	55	35	60
mI/Cr12	r	-0.137	0.037	0.011	-0.128	-0.237
	p	0.329	0.786	0.937	0.465	0.069
	N	55	55	55	35	60

**Tabela 27.** Korelacije odnosa (Glx+Gln)/Cr, dobijenih metodom kratkog eha, sa parametrima T-limfocita.

Kratki eho		CD4	CD8	CD3	CD4/8	NADIR CD4
(Glx+Gln)/Cr1	r	0.047	-0.075	-0.059	0.029	0.030
	p	0.734	0.587	0.668	0.869	0.818
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr2	r	-0.197	-0.085	-0.113	-0.179	0.192
	p	0.150	0.536	0.410	0.302	0.142
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr3	r	-0.020	0.045	0.050	-0.246	-0.045
	p	0.882	0.746	0.717	0.155	0.732
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr4	r	0.156	0.215	0.241	-0.161	-0.147
	p	0.254	0.115	0.077	0.355	0.261
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr5	r	-0.262	-0.321*	-0.327*	-0.007	0.228
	p	0.053	<b>0.021</b>	<b>0.018</b>	0.968	0.080
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr6	r	-0.016	-0.123	-0.096	0.074	0.193
	p	0.908	0.372	0.486	0.672	0.140
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr7	r	0.281*	0.180	0.225	0.026	0.057
	p	<b>0.038</b>	0.190	0.098	0.881	0.667
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr8	r	-0.025	-0.037	-0.014	-0.211	0.171
	p	0.855	0.787	0.917	0.223	0.191
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr9	r	0.207	0.134	0.158	0.117	-0.144
	p	0.129	0.328	0.249	0.503	0.273
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr10	r	0.245	0.366**	0.341*	0.015	-0.034
	p	0.071	<b>0.006</b>	<b>0.011</b>	0.932	0.795
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr11	r	0.015	0.032	0.019	-0.194	-0.068
	p	0.912	0.819	0.893	0.264	0.606
	N	55	55	55	35	60
(Glx+Gln)/Cr12	r	0.091	-0.035	0.009	-0.003	-0.023
	p	0.506	0.802	0.946	0.988	0.859
	N	55	55	55	35	60



Prisutna je negativna korelacija ovog odnosa sa nadir CD4- brojem na vokselima 2 (siva masa ventralnog prednjeg cinguluma desno,  $p=0.020$ ), 7 (siva masa dorzalnog prednjeg cinguluma levo,  $p=0.009$ ) i 9 (supkortikalna bela masa desno,  $p=0.006$ ). Pokazala se vrednost nadir CD4+ kao prediktora inflamatornih promena, obzirom da su više vrednosti odnosa mI/Cr povezane sa nižim brojem nadir CD4+ T-ćelija. Prikazana je pozitivna korelacija mI/Cr sa brojem CD4+ T-limfocita na vokselu 7 (dorzalni prednji cingularni girus levo,  $p=0.018$ ).

Uočava se pozitivna korelacija sa brojem CD4+ T-limfocita na vokselu 7 (dorzalni prednji cingulum levo,  $p=0.038$ ). Pozitivna korelacija odnosa mI/Cr sa CD3+ i CD8+ T-ćelijama uočava se na vokselu 10 (zadnji cingulum desno,  $p=0.006$  i  $p=0.011$ ), dok se na vokselu 5 (duboka bela masa frontalno desno) uočava negativna korelacija sa istim parametrima T-ćelija ( $p=0.021$  i  $p=0.018$ ).

### **5.8. Korelacija odnosa metabolita sa parametrima efikasnosti antiretroviralne terapije u centralnom nervnom sistemu**

Parametri penetracije antiretroviralnih lekova u centralni nervni sistem predstavljaju indeks efikasnosti penetracije u likvorski prostor (*CPE, CNS Penetration Efficacy*) i indeks monocitne efikasnosti (*ME, Monocyte Efficacy*). Korelacije odnosa metabolita sa parametrima penetracije lekova u centralni nervni sistem određene su korišćenjem Pirsonove linearne korelacije. Da bi se utvrdile korelacija odnosa NAA/Cr sa indeksima penetracije antiretroviralne terapije u CNS, statistički je isključen značaj godina života (Tabela 28). Ne postoje značajne korelacije odnosa NAA/Cr dobijenih na metodi dugog eha sa CPE indeksom ni na jednom posmatranom vokselu. Na vokselima 2 (ventralni prednji cingulum desno,  $p=0.020$ ), 7 (dorzalni prednji cingulum levo,  $p=0.047$ ) i 11 (zadnji cingulum levo,  $p=0.006$ ) uočava se značajna pozitivna korelacija odnosa NAA/Cr sa ME indeksom. Svi posmatrani vokseli pripadaju sivoj masi i pozitivno koreliraju sa indeksom ME, koji pokazuje penetraciju lekova u monocite (latentni rezervoar virusa u mozgu). Može se zaključiti da nivo neurodegeneracije u sivoj masi negativno korelira sa dobrom penetracijom lekova u monocite.

**Tabela 28.** Korelacije parametara penetracije antiretroviralnih lekova u centralni nervni sistem (CPE i ME indeks) sa odnosima svih metabolita dobijenih metodom MV MRS kratkog i dugog eha na svim posmatranim lokalizacijama.

KORELACIJA IZMEĐU		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
MV MRS kratkog eha													
CPE i NAA/Cr	r	-0.124	0.267	-0.221	-0.290	0.006	-0.088	0.330	-0.099	-0.304	0.084	-0.031	-0.133
	p	0.508	0.147	0.231	0.113	0.976	0.640	0.069	0.597	0.096	0.654	0.869	0.475
ME i NAA/Cr	r	-0.236	0.046	-0.172	0.251	-0.332	-0.424	0.010	0.079	0.372	0.013	0.521	0.485
	p	0.202	0.807	0.356	0.173	0.068	<b>0.018</b>	0.955	0.675	<b>0.039</b>	0.946	<b>0.003</b>	<b>0.006</b>
CPE i Cho/Cr	r	0.350	-0.046	0.091	0.224	-0.257	0.279	-0.125	0.098	0.295	0.041	0.120	0.446
	p	0.053	0.807	0.625	0.226	0.162	0.129	0.501	0.601	0.107	0.826	0.519	<b>0.012</b>
ME i Cho/Cr	r	0.044	-0.222	-0.087	-0.421	-0.374	-0.047	-0.264	-0.276	-0.378	-0.254	-0.220	-0.292
	p	0.813	0.231	0.641	<b>0.018</b>	<b>0.038</b>	0.801	0.151	0.133	<b>0.036</b>	0.167	0.233	0.111
CPE i ml/Cr	r	-0.019	0.150	-0.197	0.096	-0.079	-0.024	0.187	0.097	0.230	-0.187	0.189	0.046
	p	0.921	0.420	0.289	0.609	0.672	0.897	0.313	0.604	0.214	0.314	0.309	0.805
ME i ml/Cr	r	-0.401	0.006	-0.097	0.140	-0.152	-0.161	-0.096	0.071	0.107	-0.022	-0.154	0.201
	p	<b>0.025</b>	0.974	0.605	0.453	0.414	0.386	0.606	0.705	0.568	0.908	0.409	0.279
MV MRS dugog eha													
CPE i NAA/Cr	r	-0.208	0.064	-0.156	-0.009	0.084	-0.086	-0.056	-0.194	-0.138	0.023	-0.030	0.181
	p	0.260	0.732	0.402	0.962	0.653	0.644	0.763	0.296	0.459	0.902	0.871	0.329
ME i NAA/Cr	r	-0.274	-0.354	-0.070	-0.130	-0.043	-0.326	-0.255	-0.329	-0.046	-0.494	0.149	0.298
	p	0.135	<b>0.051</b>	0.707	0.484	0.820	0.074	0.166	0.071	0.804	<b>0.005</b>	0.425	0.103
CPE i Cho/Cr	r	0.037	0.494	-0.084	0.209	0.230	0.259	0.386	-0.176	0.202	0.129	0.255	0.557
	p	0.845	<b>0.005</b>	0.652	0.260	0.213	0.159	<b>0.032</b>	0.342	0.277	0.487	0.167	<b>0.001</b>
ME i Cho/Cr	r	-0.149	-0.183	-0.068	-0.336	-0.569	-0.056	-0.060	-0.193	-0.306	-0.447	-0.273	-0.074
	p	0.423	0.325	0.715	0.064	<b>0.001</b>	0.765	0.747	0.299	0.095	<b>0.012</b>	0.137	0.693

(Ljubaznošću dr Bojana Radovanovića)

Uočava se značajna pozitivna korelacija odnosa NAA/Cr sa ME indeksom na vokselima 2, 7 i 11, na metodi dugog eha. Korelacije odnosa NAA/Cr dobijenih metodom multivokselne MRS kratkog eha sa CPE indeksom ni na jednom posmatranom lokalitetu u mozgu nisu bile značajne. Međutim, pokazana je pozitivna korelacija odnosa NAA/Cr sa ME indeksom na vokselima 6 (dorzalni prednji cingulum desno,  $p=0.007$ ), 7 (dorzalni prednji cingulum levo,  $p=0.018$ ), 10 (posteriorni cingulum desno,  $p=0.045$ ) i 12 (parijetalni supkorteks levo,  $p=0.003$ ). Prva tri vokseli pripadaju sivoj, a poslednji voksel supkortikalnoj beloj masi. Ponovo se može zaključiti

da su parametri neurodegeneracije u sivoj masi u vezi sa nivoom penetracije antiretroviralne terapije u monocite.

Na vokselima 2 (ventralni prednji cingulum desno,  $p=0.005$ ), 6 (dorzalni prednji cingulum desno,  $p=0,001$ ) i 8 (bela masa centruma semiovale frontalno levo,  $p=0.032$ ) prisutna je pozitivna korelacija Cho/Cr odnosa sa CPE indeksom metodom dugog eha (penetracija lekova u likvor). Na vokselima 5 (bela masa centruma semiovale desno,  $p=0.001$ ) i 11 (zadnji cingulum levo,  $p=0.012$ ) uočava se negativna pozitivna korelacija sa ME indeksom (što su viši nivoi Cho/Cr, niži je indeks ME).

Uočava se značajna pozitivna korelacija Cho/Cr odnosa (metodom dugog eha) sa CPE indeksom na vokselima 2, 6 i 8, kao i negativna korelacija sa ME na vokselima 5 i 11.

Analizirajući indeks penetracije lekova u CNS i njihove korelacije sa odnosima Cho/Cr dobijenih metodom MR spektroskopije kratkog eha, pokazana je pozitivna korelacija sa CPE samo na vokselu 6 (dorzalni prednji cingulum desno,  $p=0.012$ ). Postoji negativna korelacija odnosa Cho/Cr dobijenog metodom kratkog eha sa indeksom ME unutar tri vokseli: 4 (frontalna supkortikalna bela masa levo,  $p=0.018$ ), 5 (duboka bela masa frontalno desno,  $p=0.038$ ) i 10 (zadnji cingulum desno,  $p=0.036$ ).

Ukoliko odnose NAA/Cr prihvatimo kao markere neurodegeneracije a odnose Cho/Cr shvatimo kao markere inflamacije i neurodegeneracije, zaključujemo da je ME indeks bolji marker neurodegenerativnog odgovora a CPE indeks bolji u monitoringu kontrole inflamacije.

Uočava se značajna pozitivna korelacija Cho/Cr na metodi kratkog eha sa CPE na vokselu 6 te negativna korelacija sa ME indeksom na vokselima 4, 5 i 10.

Pokazana je negativna korelacija odnosa mI/Cr sa ME indeksom na vokselu 1 (frontalni supkortex desno,  $p=0.025$ ), što ukazuje na pozitivne efekte lekova koji prodiru u monocite na kontrolu inflamacije, najverovatnije preko ograničavanja astrocitne proliferacije. Nije pokazana značajna korelacija ovog odnosa na ME indeksom na drugim lokalitetima, niti sa CPE indeksom.

## 6. DISKUSIJA

U našoj studiji, pokazana je statistički značajna razlika u godinama života između pacijenata kojima je inicirana cART i onih koji su u momentu snimanja bili bez iste. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima iz literature, gde su pacijenti na terapiji značajno stariji od onih koji su bez terapije. Ovo se objašnjava pre svega činjenicom da su pacijenti sa indikacijom za započinjanje cART duže vremena inficirani virusom HIV-a. U studiji Janga i saradnika, prosečna starost pacijenata na terapiji je 50 godina, a onih koji nisu na terapiji je bila 37 godina. I u toj studiji je kontrolna grupa zdravih subjekata po starosti bila sličnija pacijentima bez inicirane cART [135]. U studiji Sailasute i saradnika, grupa pacijenata sa hroničnom HIV-infekcijom je bila prosečne starosti 34 godine, grupa sa akutnom HIV-infekcijom 30 godina. U ovoj studiji svi pacijenti su bili bez primenjene antiretroviralne terapije u momentu ispitivanja [136]. U velikoj studiji Hitona i saradnika, na 436 pacijenata sa HIV infekcijom, fokus istraživanja je bio na neurokognitivnom statusu, tako da su grupe pacijenata formirane prema promenama u neurokognitivnim performansama, a ne prema administraciji antiretroviralne terapije. Prosečna starost učesnika u ovoj studiji je bila 43.9 godina, a ukupno ispod 20% pacijenata nije primalo cART. Za razliku od svih drugih, ova studija je pokazala da godine života pacijenata ne predstavljaju značajan prediktivni faktor za neurokognitivna oštećenja. Takođe, dob pacijenta u kojoj se desila infekcija HIV-om je predstavljala marginalni prediktor razvoja neurokognitivnih oštećenja. Pokazano je da je infekcija HIV-om u ranijem životnom dobu povezana sa bržim razvojem neurokognitivnih oštećenja, pre svega zbog povezanosti sa visokom verovatnoćom koinfekcije virusom hepatitisa C i zloupotrebe metamfetamina [137]. U studiji Harezlaka i saradnika, prosečna starost pacijenata iznosila je 46 godina, dok je u poslednjoj studiji Sailasute i saradnika, prosečna starost HIV inficiranih bila 35.0 a kontrolnih subjekata 34.3 godine [138, 139].

Prema stepenu obrazovanja, u našoj studiji nije postojala statistički značajna razlika između dve grupe HIV+ pacijenata, kao ni između HIV+ i zdravih kontrolnih subjekata. U studiji Janga i saradnika, takođe nije postojala signifikantna razlika u stepenu obrazovanja (iako je prosečan nivo bio visoka škola, za razliku od našeg uzorka, gde je dominirala osnovna i srednja škola) [135]. Studija Sailasute i saradnika je pokazala značajnu razliku u stepenu obrazovanja između

grupa HIV+ pacijenata sa akutnom i hroničnom HIV-infekcijom (pacijenti sa akutnom infekcijom su pripadali visoko-obrazovanima, a pacijenti sa hroničnom infekcijom su imali pretežno srednji stepen obrazovanja) [136]. Prosečan nivo obrazovanja u istraživanjima Sailasute, Hitona i Harezlaka je bio nivo srednjeg obrazovanja [137-139]. Ovaj podatak bi mogao biti od značaja u proceni koncentracija NAA, obzirom na studije koje govore o zavisnosti koncentracija ovog neurometabolita sa stepenom inteligencije, odnosno nivoom obrazovanja [137]. Smatra se da su stepen obrazovanja i premorbidni koeficijent inteligencije indikatori kognitivne rezerve [140], što je koncept koji se koristi za objašnjenje individualnih razlika u nivou oštećenja CNS-a koji je potreban za manifestni neurokognitivni deficit. Hiton je pokazao da je visok premorbidni koeficijent inteligencije jedinstveni prediktor neurokognitivnog oštećenja i akcentira pozitivni efekat kognitivne rezerve u neuroHIV infekciji [137]. Obzirom da su grupe u našoj studiji bile odgovarajuće po stepenu obrazovanja, smatrali smo da se uticaj ovog relativno značajnog faktora na statističke podatke, može zanemariti, posebno u svetlu kognitivnog skora naših ispitanika na neurokognitivnom testu.

Prosečna dužina trajanja terapije u našoj studiji je bila 5.6 godina (1-16 godina). U dostupnim studijama nije precizirano prosečno vreme dužine trajanja terapije, osim ako studije nisu bile prospektivne. U prospektivnoj studiji Janga i saradnika, prosečno vreme trajanja terapije je bilo 22 dana pre ulaska u studiju [135]. Obzirom na ovakvu razliku u trajanju terapije, smatramo da nije moguće načiniti adekvatnu komparaciju studija. Gongvatana i saradnici su u svojoj studiji definisali primenu jednog režima cART najmanje 1.5 godinu, bez preciznih podataka o prosečnoj dužini trajanja terapije [141]. U studiji Garvi i saradnika, prosečno trajanje terapije bilo je 9 godina (3-22) [61]. U skorašnjoj studiji Harezlaka, koja se bavila određivanjem prediktivnih faktora neuronskog oštećenja, nije navedeno prosečno trajanje terapije, iako je naznačeno da su svi ispitanici najmanje godinu dana bili na cART, u uslovima kontrolisane plazma viremije ( $\leq 50$  kopija HIV RNK u plazmi) [138]. U poslednjoj studiji Sailasute, vreme trajanja cART kod svih HIV-inficiranih bilo je 12 meseci (prospektivna studija) [139].

Prosečna dužina trajanja infekcije u našoj studiji bila je 4.6 godina. Prosečna dužina trajanja infekcije se u našoj studiji gotovo poklapa sa prosečnom dužinom trajanja terapije, što indirektno ukazuje na činjenicu da je kod većine pacijenata terapija započeta u optimalnom vremenu (prema važećim EACS smernicama). Ovaj je podatak od velike prediktivne važnosti, obzirom da govori

o dužini trajanja izloženosti organizma, a time i centralnog nervnog sistema, virusu HIV-a. Gongvatana je naveo prosečno vreme trajanja HIV infekcije od 11 godina u svojoj studiji [141]. U studijama je potvrđeno da se virus HIV-a ne može eradicirati iz perifernog kompartmana ni iz CNS-a, čak i kada nema detektabilnih kopija virusne RNK u likvoru [142]. Teorijski, dok god postoji izloženost ćelija centralnog nervnog sistema virusu ili viralnim proteinima, kaskada oštećenja neurona neprestano započinje i obnavlja se, te postoji progresivni proces neurodegeneracije.

Na našem uzorku uočena je negativna korelacija odnosa NAA/Cr sa godinama života. Na MRS dugog eha je prikazana negativna korelacija na 8/12 vokselu, a na kratkom ehu je prikazana negativna korelacija odnosa NAA/Cr sa godinama života na 3/12 vokselu, slabog do srednjeg intenziteta. Prednost dugog eha u prikazivanju korelacije je posledica pre svega kvaliteta dobijenih spektara, jasnijeg izdvajanja pika NAA i površine ispod krive, koja odgovara koncentraciji ovog metabolita, odnosno tehničkih aspekata studije. Zbog ovakvih rezultata, primenili smo analizu kovarijance pri ispitivanju razlike u odnosima NAA/Cr po pojedinačnim vokselnim jedinicama između grupa ispitanika. U našoj studiji, doprinos godina života razlici u odnosima NAA/Cr među grupama je slabog do srednjeg intenziteta, dok je doprinos pripadnosti grupi, odnosno postojanje HIV infekcije, jakog intenziteta. Drugom rečima, ne može se isključiti doprinos starenja neurodegenerativnim oštećenjima i neurokognitivnom deficitu, ali je on u svetlu postojanja HIV infekcije dodatni, a ne vodeći faktor. Nije uočena značajna korelacija drugih posmatranih odnosa metabolita sa godinama života (Cho/Cr nije korelirao sa godinama života ni na jednom posmatranom vokselu, dok je kod odnosa ml/Cr uočena korelacija vrlo slabog intenziteta na 2 posmatrane lokalizacije). Nekoliko studija se bavilo odnosom starenja i HIV infekcije mozga. Szik i saradnici su u svojoj studiji pokazali da kod starijih pacijenata sa hroničnom i stabilnom HIV infekcijom (sa dobro kontrolisanom viremijom u plazmi), HIV infekcija, kardio-vaskularne bolesti i starenje per se predstavljaju trodelni model koji vodi u inflamaciju CNS-a i rano oštećenje neurona, koje prethodi neurokognitivnoj deterioraciji [83]. Uočena je interakcija između starenja i hronične HIV infekcije, pre svega u regionu frontalne bele mase, u smislu ubrzanog neuropatološkog starenja [83, 143]. Čang je u svojoj multicentričnoj studiji pokazao da je značajnost razlika u odnosima metabolita u nivou bazalnih ganglija i beloj masi nakon unošenja godina života kao kovarijeteta, snižena ali i dalje prisutna.

Iznet je zaključak da normalno starenje i HIV infekcija deluju sinergistički na proces neurodegeneracija, odnosno da jedno drugo zapravo stimulišu i ubrzavaju [144]. U studiji Harezlaka iz 2014. godine, po prvi put postoji pokušaj da se odnos starenja i specifičnih šema neurometabolita u mozgu HIV+ pacijenata objasni multifaktorijalnim modelom, gde je kao najznačajniji faktor prikazan stadijum HIV demencije [138]. U preglednom članku Koena, postavlja se pitanje da li je neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV infekcijom (HAND) neurodegenerativno oboljenje, preuranjeno kognitivno starenje, ili pak mešavina ova dva entiteta [145].

Pokazana je statistički značajna redukcija nivoa NAA/Cr kod HIV+ pacijenata ( $p < 0.05$ ), u odnosu na zdrave kontrolne subjekte, na svim posmatranim lokalizacijama dobijenim multivokselom MR spektroskopijom dugog eha. Obzirom na pokazanu zavisnost ovog neuromarkera od procesa starenja mozga, analizu ovog neurometabolita smo vršili metodom kovarijanse, gde su godine živote uvrštene kao kovarijat. Statistička analiza je pokazala da je doprinos starenja mozga ovoj redukciji slabog do umerenog intenziteta, dok je doprinos pripadnosti grupi, odnosno HIV infekciji per se, jakog intenziteta. Naknadnim testiranjem razlika među pojedinačnim grupama HIV+ pacijenata, sa i bez uvedene terapije, pokazali smo da se oni u nivou NAA/Cr razlikuju značajno samo na jednom posmatranom vokselu (duboka bela masa centruma semiovale frontalno levo,  $p = 0.034$ ). Na tom vokselu, odnosi NAA/Cr su statistički značajno niži kod pacijenata kojima je uvedena cART. HIV+ pacijenti, bez i sa uvedenom antiretroviralnom terapijom, se od zdravih kontrolnih subjekata značajno razlikuju na po 10/12 posmatranih vokselu, u smislu značajne redukcije ovog neurobiohemijskog markera. Ovakvi rezultati su u skladu sa većinom studija, koje su prikazale znake neuronskog oštećenja u regiji korteksa i bazalnih ganglija [144, 146-151]. Skorije studije su pokazale da ove promene perzistiraju u hronično inficiranih pacijenata uprkos restituciji imunološkog sistema i efektivnoj viralnoj supresiji kao odgovoru na antiretroviralnu terapiju [108, 112, 138, 145]. Nekoliko studija je prikazalo vezu između starenja i povećanog rizika za razvoj neurološkog deficita povezanog sa HIV infekcijom [152-154]. Novije studije navode na zaključak da je povezanost između starenja i specifičnih šema izmene koncentracija neurometabolita kompleksnija nego što se ranije mislilo, te modifikovana brojnim faktorima, među kojima se kao jedan od glavnih izdvaja stadijum HAND-a [138]. Studija Janga i saradnika je zabeležila nesignifikantni pad NAA/Cr u sivoj masi

pacijenata sa primarnom HIV infekcijom (definisana kao infekcija koja traje do godinu dana) [135]. Sailasuta u svojoj studiji iz 2012. godine, na pacijentima sa akutnom HIV infekcijom, takođe nije pokazala postojanje značajne redukcije nivoa NAA/Cr u akutnoj HIV infekciji (unutar mesec dana nakon ekspozicije). U ovoj studiji su postojale dve kontrolne grupe: pacijenti sa hroničnom HIV infekcijom bez uvedene terapije i zdravi subjekti. U smislu nivoa NAA/Cr, nije pokazana statistički značajna razlika između akutne i hronične HIV infekcije. Sam autor je ovaj nalaz proglasio spekulativnim, obzirom da nije postojala razlika ni između HIV+ i zdravih subjekata [136]. Gongvatana je pokazao progresivnu redukciju nivoa NAA na godišnjem nivou od 2-6%, kako u kortikalnim tako i u supkortikalnim regijama. Prosečna starost ispitanika u ovoj studiji je bila 47 godina, dok je prosečno trajanje HIV infekcije bilo 11 godina. Ova redukcija je pokazana kod neurološki asimptomatskih HIV+ pacijenata sa postignutom virološkom supresijom [141]. U studiji Vinstona i saradnika posmatrani su HIV+, neurološki asimptomatski pacijenti bez uvedene antiretroviralne terapije u odnosu na zdrave kontrole. Međutim, u ovoj studiji, nisu pronađene statistički značajne razlike u odnosu NAA/Cr na posmatranim vokselima. Istraživanje je bazirano na jednovokselnoj MR spektroskopiji, koja je manje lokalizaciono specifična, te je teško izdvojiti samo sivu, odnosno samo belu masu u frontalnom lobusu [155]. Bladovska je pokazala u svojoj studiji na HIV+ pacijentima sa i bez uvedene terapije, snižen NAA/Cr odnos na svim posmatranim lokacijama. Kod pacijenata koji nisu bili na terapiji, to sniženje nigde nije dostiglo statističku značajnost (najizraženije je bilo u posteriornom cingulumu). Kod HIV+ pacijenata na cART, pokazano je signifikantno sniženje NAA/Cr u zadnjem i prednjem cingulumu te parijetalnoj beloj masi [156]. Studija Harezlaka o prediktorima oštećenja CNS-u u neuroHIV infekciji, je pokazala redukciju odnosa NAA/Cr na posmatranim lokalizacijama (frontalna siva masa, mid-frontalni korteks i bazalne ganglije). Pokazano je da je uticaj godina života značajan u regiji frontalnog korteksa i bele mase, što je u skladu sa našim rezultatima. Takođe je pokazano da u regiji korteksa značajan doprinos redukciji NAA/Cr ima i stepen obrazovanja (indirektno u vezi sa koeficijentom inteligencije). Na sva tri regiona posmatrana u ovoj studiji, značajno je bilo i trajanje HIV infekcije [138]. U našoj studiji, prikazana je redukcija NAA/Cr na svim posmatranim vokselima, odnosno u sivoj masi cingularnog girusa obe hemisfere, frontalnom i parijetalnom supkorteksu obostrano i dubokoj beloj masi frontalnog centra semiovale obostrano. Pacijenti u našoj studiji većinom imaju hroničnu HIV infekciju (više od 6 meseci nakon transmisije HIV virusa), što predstavlja faktor



dužine izloženosti HIV virusu. Dužina HIV infekcije se smatra jednim od najvažnijih faktora u izmeni odnosa NAA/Cr kod HIV+ pacijenata [156]. Redukcija NAA kao biohemijskog markera neuronske gustine, verovatno odražava kompleksnu neuropatogenezu neuronskog oštećenja, koja se sastoji u gubitku ali i disfunkciji neurona, delom posredovanu virusnim proteinima (gp120 i Tat, pre svega) a delom kompleksnim odgovorom imunološkog sistema. Uz to, rezultati skorije studije Harezlaka i saradnika su pokazali da su ove promene najverovatnije multifaktorijalnog porekla, uzrokovane faktorima od strane domaćina i faktorima udruženim sa oboljenjem kao i njihovim interakcijama [138].

Rezultati odnosa NAA/Cr i razlike među grupama, koji su prikazani na multivokselnoj MR spektroskopiji kratkog eha su manje impresivni. Korišćenjem ANCOVA testa, sa uključenim godinama života kao kovarijetetom, uočena je signifikantna razlika između grupa na svega 3/12 vokselu u sivoj i beloj masi obe hemisfere (vokselne lokacije 1- frontalni supkorteks desno, 5- duboka bela masa frontalno desno i 7- dorzalni deo prednjeg cingularnog girusa levo). Razlika među grupama je najznačajnija u supkortexu frontalno desno (voksel 1,  $p < 0.001$ ), nešto slabija u dubokoj beloj masi frontalno desno (voksel 5,  $p = 0.001$ ), a najslabija u regiji dorzalnog dela prednjeg cingulum levo (voksel 7;  $p = 0.033$ ). Doprinosa starenja ovim razlikama je obrnut, najveći je u regiji prednjeg cingulum levo, a u frontalnom supkortexu i dubokoj beloj masi desne hemisfere je slab. Na sve tri lokalizacije je dominantan izvor razlike među grupama ispitanike postojanje HIV infekcije, a ne starenje. Naknadna testiranja razlike između pojedinačnih grupa HIV+ pacijenata sa i bez uvedene antiretroviralne terapije, pokazala su da ne postoje signifikantne razlike između dve podgrupe HIV+ pacijenata, što je sličan rezultat kao kod ispitivanja korišćenjem MR spektroskopije dugog eha.

Na MR spektroskopiji dugog eha uočili smo postojanje signifikantnih razlika u odnosu Cho/Cr među grupama ispitanika na nekoliko vokselu u sivoj i beloj masi (vokselne pozicije 4- frontalni supkorteks levo, 6- dorzalni prednji cingulum desno, 7- dorzalni prednji cingulum levo, 10- posteriorni cingulum desno i 12- parijetalni supkorteks levo). Izuzev u dorzalnog segmentu prednjeg cingularnog girusa levo (voksel 7), na svim ostalim pozicijama zabeleženi su niži nivoi Cho/Cr kod HIV+ pacijenata u odnosu na zdrave kontrolne subjekte (supkortikalna masa frontalno levo, dorzalni deo prednjeg cingulum desno, zadnji cingularni girus desno i supkortikalna bela masa parijetalno levo). U regiji dorzalnog prednjeg cingulum levo uočava se

razlika u odnosu Cho/Cr na račun blagog povišenja kod pacijenata bez uvedene cART ( $p=0.038$ ). Ovaj se izdvojeni rezultat objašnjava pre svega postojanjem inflamatornih promena (influks monocitnih ćelija, narušena hematoencefalna barijera) kod pacijenata kod kojih nije uvedena antiretroviralna terapija. Na MR spektroskopiji kratkog eha pokazali smo postojanje signifikantnih razlika između grupa u odnosu Cho/Cr na vokselima u sivoj i beloj masi (vokselske pozicije 1- frontalni supkortex desno, 4- frontalni supkortex levo, 6- dorzalni prednji cingulum desno, 10- posteriorni cingulum desno i 12- parijetalni supkortex levo). U regiji zadnjeg cinguluma desne hemisfere i parijetalnom supkortexu levo (pozicija 10 i 12) uočen je pad u Cho/Cr odnosu kod HIV+ pacijenata sa i bez inicirane antiretroviralne terapije u odnosu na zdrave kontrole ( $p=0.001$  i  $p=0.0018$ , respektivno). U frontalnom supkortexu leve hemisfere i u dorzalnom segmentu prednjeg cinguluma desno (vokseli 4 i 6) evidentiran je značajno niži Cho/Cr odnos kod pacijenata na terapiji u odnosu na zdrave subjekte i HIV+ pacijente kod kojih nije uvedena cART ( $p<0.001$ ,  $p=0.036$ , respektivno). Samo u regiji frontalnog supkortexa desno (voksel 1) prikazano je povišenje odnosa Cho/Cr kod HIV+ pacijenata u odnosu na kontrole ( $p=0.011$ ). Klasično shvatanje promena u neuroHIV obuhvata difuzno povišenje odnosa Cho/Cr odnosa kao odraz kontinuiranih neuroinflamatornih promena, nezavisno od statusa kognicije [144, 151, 157, 158]. U studijama Suvanvele i Bladovske nije prikazana razlika u Cho/Cr odnosu između asimptomatskih HIV+ pacijenata i zdravih kontrola [156, 159], dok je Vinston među prvima pokazala snižene nivoe Cho/Cr kod HIV+ pacijenata u odnosu na kontrole [155]. Ovakav rezultat prikazan je i u studiji Navije i saradnika [160]. Povišeni odnosi Cho/Cr su prikazani u frontalnom korteksu u studiji Harezlaka i saradnika, vezani za klinički manifestne stadijume HAND-a, duže trajanje HIV infekcije i kompleksne odnose starenja i stadijuma HAND-a. Interesantno je da je prikazano opadanje Cho/Cr odnosa kod starijih pacijenata sa HIV infekcijom, nalaz koji je u skladu sa rezultatima naše studije, obzirom da su pacijenti sa uvedenom terapijom (kod kojih je na većini lokacija prikazan niži odnos Cho/Cr u odnosu na zdrave i HIV+ pacijente bez uvedene terapije) značajno stariji od druge dve grupe ispitanika [138]. Ovakvi nalazi najverovatnije odražavaju parcijalno suprimirani imuno-modulirani odgovor u toku starenja i kao efekat hronične terapije antiretroviralnim lekovima.

Mionizotol je prisutan u glijalnim ćelijama i smatra se značajnim moždanim osmolitom. U našoj studiji, pokazana je signifikantna razlika u odnosima mI/Cr na nekoliko lokacija u sivoj i beloj

masi (2- ventralni prednji cingulum desno, 3- ventralni prednji cingulum levo, 4- frontalni supkorteks levo, 7- dorzalni prednji cingulum levo, 8- duboka bela masa frontalno levo i 9- parijetalni supkorteks desno). Na svim lokalizacijama, mI/Cr odnosi su bili povišeni kod HIV+ pacijenata u odnosu na zdrave kontrolne subjekte. Ova je razlika vidljiva kako kod HIV+ pacijenata na terapiji, tako i kod pacijenata bez uvedene cART, u komparaciji sa zdravim subjektima. Jedino na vokselu 7 (dorzalni deo prednjeg cingularnog girusa levo) evidentiran je značajno viši nivo mI/Cr kod HIV+ pacijenata bez terapije u odnosu na HIV+ pacijente kod kojih je inicirana cART ( $p=0.041$ ). Klasično shvatanje patogeneze u infekciji centralnog nervnog sistema se sastoji u prikazu povišenih nivoa mI/Cr tokom rane faze infekcije CNS-a HIV-om, sa trendom normalizacije nakon 12 meseci od započinjanja terapije. Ova redukcija nivoa mI/Cr odražava stišavanje inflamatornih promena i restituciju mehanizama neuroprotekcije nakon započinjanja cART [139]. Bladovska nije pokazala značajne razlike u nivoima mI/Cr kod HIV+ pacijenata sa i bez terapije u odnosu na zdrave kontrole. Jedino u regiji prednjeg cinguluma postojali su povišeni nivoi mI/Cr kod pacijenata na terapiji u odnosu na kontrole, ali ti nivoi nisu dostigli statističku značajnost [156]. U našoj studiji, pak, pokazani su perzistentni visoki nivoi mI/Cr na nekoliko lokalizacija u sivoj i beloj masi i pored započete cART. Ovi rezultati su u skladu sa studijom Janga i saradnika, koji su prikazali povišene nivoe mI/Cr kod pacijenata kod kojih nije uvedena cART. Prikazali su progresivno smanjenje odnosa mI/Cr nakon uvođenja cART, ali se ti nivoi ne vraćaju na vrednosti kontrola [135]. Čang je prikazao povišene nivoe mI i mI/Cr odnose u beloj masi, koji i dalje rastu sa progresijom neurokognitivnih oštećenja [144].

Prednost multivokselne magnetno-rezonantne spektroskopije je u dobijanju informacije o neurometabolitima iz relativno velike zapremine jedinice (u našoj studiji veličina vokselne mreže je iznosila 8x8x1cm). Od 64 voksel, odabrano je 12, 6 u beloj masi (4 u supkortikalnoj regiji i 2 u regiji duboke bele mase) i 6 u sivoj masi (svih 6 voksel pripadaju cingularnom girusu). Pretpostavlja se da postoji regionalna varijabilnost u neurobiohemijskom profilu kao posledica različite osetljivosti na oštećenja posredovana monocitno-makrofagnom aktivnošću [135, 156, 161]. Ova varijabilnost je donekle objašnjena nejednakom raspodelom mikroglije u mozgu. Mikroglijalne ćelije su target ćelije za HIV virus u mozgu, a količina im je značajno različita u sivoj i beloj masi (sa razlikama u supkorteksu i dubokoj beloj masi) [162].

Posmatrajući značajnosti razlike u odnosima metabolita, nekoliko vokselskih lokacija se pokazalo veoma informativnim.

Postoje 3 vokselske lokacije sa značajnim razlikama među posmatranim grupama u 4 metabolita: vokseli 4, 7 i 10. Voksel 4 predstavlja supkortikalnu belu masu frontalno levo (mid-frontalni supkorteks). Na ovoj lokalizaciji, postoje statistički značajne razlike među grupama HIV+ pacijenata i zdravih kontrola u odnosima NAA/Cr na dugom ehu, Cho/Cr na dugom i kratkom ehu te mI/Cr na kratkom ehu. U dosadašnjim studijama, nismo pronašli merenja metabolita na ovoj lokalizaciji, pre svega zbog nedostatka studija na multivokselskoj MR spektroskopiji. Ova lokalizacija je problematična za merenje na jednovokselskoj MR spektroskopiji, zbog mnoštva artefakata na dodiru sredina (tkivo-voda, tkivo-pijalni krvni sudovi, tkivo-voda-kost). Obzirom na klasičnu postavku o HIV-indukovanoj demenciji kao supkortikalnoj demenciji, za očekivati je da se u supkortikalnoj beloj masi prvo pojave dokazi o izmeni šeme neurometabolita u pravcu neurodegeneracije (sniženje NAA/Cr i povišenje Cho/Cr). Na ovoj lokalizaciji evidentno je sniženje NAA/Cr odnosa na dugom ehu kod obe podgrupe HIV+ pacijenata u odnosu na kontrole. Nije pokazana statistički značajna razlika među HIV+ pacijentima koji su na cART i kod onih koji ne primaju antiretroviralne lekove, što ide u prilog aktuelnom shvatanju da se progresija neurokognitivnih poremećaja odvija bez obzira na administraciju terapije [108, 145]. Na ovoj lokalizaciji prikazana je signifikantna razlika u odnosu Cho/Cr između obe podgrupe HIV+ pacijenata i zdravih kontrola (pacijenti na terapiji imaju najniže vrednosti Cho/Cr, nešto su više kod HIV+ pacijenata bez terapije, dok su najviše kod zdravih kontrola). Gotovo identičan rezultat je dobijen i na MR spektroskopiji kratkog eha. Smatra se da akutni inflamatorni proces u određenom volumenu mozga rezultuje povišenjem nivoa Cho/Cr preko nekoliko mehanizama: proliferacija glijalnih ćelija, povećan metabolizam na ćeliji (obzirom da on odražava sadržaj lipidnih komponenti membrana) i promene u volumenu mozga. Nakon administracije cART, nekoliko studija pokazuje snižavanje odnosa Cho/Cr, koje može biti rezultat redukovanog virusnog titra i konkomitantnog redukovanog metabolizma na membrani nakon primenjene antiretroviralne terapije [163]. Studija Andersona je pokazala neočekivanu negativnu korelaciju nivoa CD14+ T-limfocita sa nivoom Cho/Cr u frontalnoj beloj masi (lokalizacija anatomski bliska vokselu 4) [161], što je objašnjeno pretpostavljenom neuroprotektivnom ulogom infiltracije mozga T-ćelijama na animalnim modelima [164]. Harezlak je pokazao progresivno

snižavanje odnosa Cho/Cr kod starijih neuroasimptomatskih HIV+ pacijenata i hronično inficiranih, što prema dizajnu studije odgovara našim grupama [138]. Međutim, ovaj nalaz takođe može biti i odraz razvoja moždane atrofije, odnosno redukcije volumena moždanog tkiva kod pacijenata sa dugotrajnom HIV infekcijom CNS-a. Na ovom vokselu postoji i signifikantna razlika u odnosu mI/Cr između kontrola i HIV+ pacijenata bez terapije (kod kojih su prikazane više vrednosti), nalaz koji je u skladu sa većinom studija i odražava neuroinflamatorne promene u supkortikalnoj belojoj masi pacijenata kod kojih nije uvedena antiretroviralna terapija.

Voksel 7 anatomski pripada dorzalnog delu prednjeg cingularnog girusa sa leve strane, odnosno korelira sa sivom masom frontalnog korteksa leve cerebralne hemisfere. Prednji cingularni girus predstavlja deo cingularnog korteksa a podeljen je na ventralni deo (vokseli 2 i 3) i dorzalni deo (vokseli 6 i 7). Dorzalni deo je povezan sa prefrontalnim i parijetalnim korteksom, motornim sistemom i vidnim korteksom. Ovo ga čini centralnom strukturom u procesuiranju stimulusa, sa značajnom kontrolnom funkcijom drugih zona u mozgu. Posebno je važna njegova uloga u izvođenju zadatah radnji, u ranom učenju i rešavanju problema. Na ovom vokselu prikazane su značajne razlike u odnosima NAA/Cr na dugom ( $p < 0.001$ ) i kratkom ehf ( $p = 0.033$ ), Cho/Cr na dugom ehf ( $p = 0.040$ ) i mI/Cr na kratkom ehf ( $p < 0.001$ ). Na dugom ehf su pokazani značajno niži nivoi NAA/Cr kod HIV+ pacijenata i na terapiji ( $p < 0.001$ ) i bez uvedene terapije ( $p = 0.001$ ) u odnosu na zdrave kontrole (veća je bila razlika između HIV+ pacijenata na terapiji i zdravih), dok je na kratkom ehf pokazana značajna razlika samo između HIV+ pacijenata na terapiji i zdravih kontrola ( $p = 0.024$ ). Ovaj nalaz se tumači u svetlu progresivne neurodegeneracije kod HIV+ pacijenata, koja napreduje određenim tempom i nakon uvođenja cART. Takođe se ne može zanemariti ni doprinos starenja redukciji odnosa NAA/Cr, koji je na ovoj lokaciji označen kao slab. Na ovoj lokalizaciji uočava se signifikantna razlika u odnosu Cho/Cr između HIV+ pacijenata koji nisu na antiretroviralnoj terapiji i zdravih kontrola ( $p = 0.038$ ) i to u smislu povišenog odnosa ovih metabolita kod HIV+ subjekata. Ovakav nalaz ide u prilog odvijanju inflamatornih promena kod pacijenata kojima nije uvedena antiretroviralna terapija i pre svega odražava glijalnu aktivaciju i povećan metabolizam na membrani. Nivoi Cho/Cr kod HIV+ pacijenata na terapiji su približno jednaki zdravim kontrolnim subjektima (sasvim blago povišeni, ali ne na nivou statističke značajnosti). Odnos mI/Cr na ovom vokselu pokazuje signifikantne razlike među sve tri grupe pacijenata i predstavlja jedini voksel na kome je zabeležena

signifikantna razlika u odnosu ovih metabolita između HIV+ pacijenata koji su na terapiji i onih koji nisu ( $p=0.041$ ). Drugim rečima, to je jedina anatomska lokalizacija na kojoj se detektuje signifikantno veća proliferacija astrocita/glijalnih ćelija kao odraz inflamatornih promena u neuroHIV-u, kod pacijenata kojima nije uvedena cART. Iz ovog razloga, upravo ovu lokalizaciju treba uvrstiti u protokol snimanja multivokselnom MRS, radi prepoznavanja potrebe za iniciranjem cART u neuroasimptomatskih HIV+ pacijenata.

Voksel 10 predstavlja sivu masu posteriornog cingularnog girusa desne cerebralne hemisfere. Posteriorni cingularni girus (vokseli 10, 11) predstavlja deo limbičkog sistema, koji ima konekcije sa medijalnim temporalnim lobusom i hipokampalnom formacijom. Zona zadnjeg cingularnog girusa i prekuneusa ima značajne funkcionalne veze sa talamusom, i naziva se talamokortikalnim delom Papezovog kruga, koji se odnosi na učenje i memorijske procese, koji su ugroženi u demenciji [165, 166]. Smatra se da metaboličke promene detektovane u ovoj regiji predstavljaju prediktore kognitivnog oštećenja u presimptomatskom periodu, indikujući da patološki procesi započinju dugo pre nego što blaga demencija postane klinički manifestna [165-167]. Na ovom vokselu postoje signifikantne razlike među posmatranim grupama u nivoima NAA/Cr i Cho/Cr na dugom ehf ( $p<0.001$ ,  $p=0.001$ ), Cho/Cr na kratkom ehf ( $p<0.001$ ) te (Glx+Gln)/Cr na kratkom ehf ( $p=0.025$ ). Prisutna je razlika u NAA/Cr kako između HIV+ pacijenata na terapiji i kontrola ( $p<0.001$ ), tako i između HIV+ pacijenata bez terapije i zdravih subjekata ( $p=0.016$ ). Najniže vrednosti NAA/Cr su zabeležene kod HIV+ pacijenata na terapiji, nešto više kod HIV+ pacijenata, ali i dalje su obe vrednosti statistički značajno niže nego kod kontrolnih subjekata. Ovaj se rezultat tumači kao posledica progresivnih neuronskih oštećenja, ali se ne može isključiti ni doprinos starenja redukciji nivoa NAA/Cr, koji ima slab do umeren doprinos ovoj razlici. Postoji signifikantna razlika u odnosu Cho/Cr takođe i između HIV+ pacijenata na terapiji i zdravih kontrola ( $p=0.001$ ), kao i između HIV+ pacijenata bez uvedene terapije i zdravih kontrola ( $p=0.045$ ). Nivoi Cho/Cr su značajno niži kod HIV+ pacijenata na terapiji u odnosu na kontrolne subjekte. Takođe, HIV+ pacijenti bez uvedene cART pokazuju niže vrednosti Cho/Cr od kontrolnih subjekata na ovom vokselu, ali je rezultat na granici statističke značajnosti. Posteriorni cingularni girus je temeljno ispitivan u studijama na jednovokselnoj MR spektroskopiji. U poslednjoj studiji Sailasute i saradnika, na jednovokselnoj spektroskopiji, uočeno je značajno povišenje Cho i granično značajno sniženje

NAA u posteriornom cingulumu, nalaz koji se nije promenio nakon 12 meseci primenjene cART [139]. Ovaj je rezultat u potpunosti u skladu sa našim nalazom, gde postoji sniženje NAA/Cr kod HIV+ pacijenata bez terapije i kod HIV+ pacijenata na terapiji, koje je značajnije izraženo. Sličan rezultat prikazala je i Bladovska, u čijoj je studiji postojalo signifikantno sniženje jedino NAA/Cr od svih posmatranih metabolita na ovom vokselu, i to kod HIV+ pacijenata na cART [156]. Ovaj je voksel jedini na kom je prikazana statistička značajnost u razlici (Glx+Gln)/Cr između HIV+ pacijenata na terapiji i HIV+ pacijenata bez terapije ( $p=0.025$ ), koji imaju niže vrednosti ovog odnosa metabolita u regiji posteriornog cingularnog girusa. Više vrednosti ovog odnosa su prikazane kod starijih pacijenata, pacijenata sa dužim trajanjem HIV infekcije i nižim nadir CD4+ brojem u regiji bazalnih ganglija i mid-frontalnom korteksu u studiji Harezlaka [138]. Kod kognitivno normalnih hroničnih HIV+ pacijenata je primećena redukcija glutamata u nekoliko studija. Povišeni nivou Glu/Cr su detektovani pre uvođenja cART i značajno redukovani nakon inicijacije terapije. Ovi povišeni nivou su objašnjeni ekscitotoksičnošću zbog povećane stimulacije NMDA receptora, kao i otpuštanjem glutamata iz HIV-inficiranih makrofaga i mikroglije, uz poremećeno preuzimanje glutamata od strane astrocita. Dodatni razlog niskog nivoa (Glx+Gln)/Cr kod pacijenata na terapiji se objašnjava primenom nukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze, koji uzrokuju mitohondrijalni oksidativni stres. Mitohondrijalni oksidativni stres rezultuje sniženom sintezom glutamata kroz ciklus trikarboksilne kiseline [168]. U nekim studijama koje su posmatrale posteriorni cingularni girus kroz metodu jednovokselne MRS, nije određivan odnos glutamata/Cr, te nije moguće dati uporednu analizu [144, 156].

Za razliku od zadnjeg cingularnog girusa sa desne strane, zadnji cingularni girus na levoj strani (voksel 11) pokazuje značajnosti samo u odnosima NAA/Cr na dugom ehu ( $p<0.001$ ) i to u očekivanoj distribuciji: najveće vrednosti pokazuju zdrave kontrole, nešto niže pacijenti koji nemaju uvedenu cART i najniže vrednosti su kod pacijenata sa cART. Uticaj starenja na ovom vokselu je okarakterisan kao vrlo slab (ispod 1% varijanse).

Voksel 1 anatomski pripada supkortikalnoj beloj masi frontalnog lobusa desne cerebralne hemisfere. Na ovoj lokalizaciji evidentne su razlike u odnosima NAA/Cr na dugom ( $p<0.001$ ) i kratkom ehu ( $p<0.001$ ), te Cho/Cr na kratkom ehu ( $p=0.011$ ). Obzirom na klasičnu definiciju HIV-demencije kao supkortikalne, očekivano je bilo da se na ovoj lokalizaciji izdvoje razlike u markerima neurodegeneracije, što su pre svih NAA/Cr i Cho/Cr. Što se tiče odnosa NAA/Cr,

najniže vrednosti ovih odnosa su evidentirane kod HIV+ pacijenata na terapiji, nešto više kod pacijenata kod kojih nije uvedena cART, a najviše vrednosti su zabeležene kod kontrola. Na ovaj rezultat, pored neurodegenerativnih procesa uzrokovanih infekcijom HIV-om, utiču i godine života ispitanika, doduše sa doprinosom slabog do umerenog intenziteta ovoj razlici (oko 10% varijanse). Odnosi Cho/Cr se značajno razlikuju između HIV+ pacijenata i zdravih kontrola. Kod HIV+ pacijenata na terapiji, odnosi Cho/Cr su najviši, nešto su niži kod HIV+ pacijenata bez uvedene terapije, dok su kod zdravih kontrola najviši. Ne postoje studije kod kojih je posmatrana ova anatomaska lokalizacija, ali su ovi rezultati odraz pre svega neurodegenerativnih promena u sklopu neurokognitivnog poremećaja udruženog sa HIV-infekcijom, posebno u svetlu slabog uticaja starenja na vrednosti NAA/Cr na ovom vokselu.

Ventralni deo prednjeg cingularnog girusa je deo emocionalnog kruga, u vezi je sa amigdaloidnim jedrom, nukleusom akumbensom, hipotalamusom i prednjom inzulom. Funkcionalno, ova komponenta prednjeg cingularnog girusa je odgovorna za procesuiranje emocionalnih i motivacionih zadataka. Na vokselima 2 i 3, koji pripadaju sivoj masi ventralnog dela prednjeg cingularnog girusa (desne i leve cerebralne hemisfere), uočene su signifikantne razlike u istim odnosima metabolita: NAA/Cr na dugom ehu (voksel 2,  $p < 0.001$ ; voksel 3,  $p = 0.003$ ) i mI/Cr na kratkom ehu (voksel 2,  $p = 0.001$ ; voksel 3,  $p = 0.006$ ). Vrednosti odnosa NAA/Cr su najniže kod HIV+ pacijenata na terapiji, nešto više kod HIV+ pacijenata bez uvedene terapije a najviše kod zdravih kontrola. Uticaj starenja na ove razlike je na oba opisana vokselu slab (doprinos starenja na vokselu 2 je oko 10% a na vokselu 3 oko 5%). Što se tiče odnosa mI/Cr, u regiji prednjeg cingularnog girusa desno uočavaju se signifikantne razlike kako između HIV+ pacijenata na terapiji ( $p < 0.001$ ), tako i između HIV+ pacijenata bez terapije i zdravih kontrola ( $p = 0.050$ ). Iznenadjuće je da su najviše vrednosti ovog odnosa prikazane kod pacijenata koji su na terapiji. Moguće objašnjenje za ovakav rezultat bi bilo u perzistentnoj inflamaciji perivaskularnih regiona, koja se održava i u uslovima dobro kontrolisane viremije [169]. U regiji ventralnog prednjeg cingularnog girusa levo, uočavaju se značajne razlike između zdravih kontrola HIV+ pacijenata bez uvedene terapije ( $p = 0.004$ ), što je očekivani rezultat. U poslednje vreme se sve više govori o nemotivisanosti i emocionalnoj tuposti kod HIV+ pacijenata, bez obzira na primenjenu cART [170, 171].



Voksel 5 anatomski pripada dubokoj beloj masi centra semiovale frontalno levo. Na ovoj lokalizaciji uočavaju se signifikantne razlike samo u odnosu NAA/Cr i to na obe metode MV MRS, i na dugom ( $p < 0.001$ ) i na kratkom eh (p=0.001). Uticaj godina je na ovom vokselu okarakterisan kao slab (doprinos starenja varijansi je oko 1%). Iz ovog zaključujemo da je ispitivanje ovog vokselu korisno samo u svetlu neuronskog oštećenja, odnosno za potvrdu prisustva neurodegeneracije u neuroasimptomatskih pacijenata, obzirom da ne daje značajne informacije o drugim, paralelnim procesima, koji se odvijaju u neuroHIV infekciji.

Voksel 6 odgovara sivoj masi dorzalnog dela prednjeg cingularnog girusa desne cerebralne hemisfere. Na ovoj lokalizaciji uočene su signifikantne razlike u odnosima NAA/Cr na dugom eh (p=0.002) i Cho/Cr na dugom (p=0.032) i kratkom eh (p=0.036). Postoji signifikantna razlika u NAA/Cr kod HIV+ pacijenata bez terapije i zdravih kontrola (p=0.002), dok je uticaj starenja na razliku u ovom markeru označen kao slab (doprinos varijansi oko 1%, ove dve grupe pacijenata su praktično idealno odabrane što se tiče uzrasta). Ovaj se rezultat može objasniti značajnim neuronskim oštećenjem preko nekoliko različitih mehanizama, koji se dešava u HIV infekciji nedomuliranoj terapijom. Obzirom da nije potvrđena signifikantna razlika između HIV+ pacijenata na terapiji i zdravih kontrola, ovaj se voksel može smatrati skrining vokselom (uz kontralateralni voksel 7) za neurodegenerativne procese kod neuroasimptomatskih pacijenata bez uvedene cART, u svetlu razmatranja uvođenja terapije. Odnos Cho/Cr je statistički značajno niži kod pacijenata na terapiji u odnosu na kontrole (p=0.038). Ovde do izražaja verovatno dolaze efekti terapije u supresiji influksa ćelija imunološkog sistema.

Voksel 8 anatomski odgovara dubokoj beloj masi frontalnog centra semiovale leve cerebralne hemisfere. Na ovoj lokalizaciji uočava se postojanje razlike u odnosima NAA/Cr na dugom eh (p=0.001) i mI/Cr na kratkom eh između grupa ispitanika (p=0.001). Doprinos starenja razlici u nivou NAA/Cr u ovom regionu je slab (oko 4% varijanse). Uočena je signifikantna razlika u odnosima NAA/Cr između HIV+ pacijenata na terapiji i zdravih (p<0.001). Takođe, primećena je i razlika između HIV+ pacijenata na terapiji i HIV+ pacijenata kod kojih terapija nije uvedena (p=0.034). Ovaj je rezultat interesantan, jer govori upravo u prilog odvijanju neurodegenerativnih procesa uprkos administraciji cART. Što se tiče razlike u odnosima mI/Cr, evidentna je značajna razlika između kontrola i HIV+ pacijenata bez terapije (p=0.050) i između zdravih subjekata i HIV+ pacijenata koji su na cART (p=0.001).

Vokselu 9 pripada parijetalna supkortikalna bela masa desne cerebralne hemisfere. Identično kao na prethodnom, i ovde se izdvajaju razlike u odnosima NAA/Cr na dugom ehu ( $p=0.022$ ) i mI/Cr na kratkom ehu između grupa ispitanika ( $p=0.018$ ). Doprinos starenja razlici u odnosu NAA/Cr na ovom vokselu je slab (oko 6% varijanse). Prisutna je značajna razlika između HIV+ pacijenata na terapiji i zdravih kontrola ( $p=0.002$ ). Uočena je značajna razlika u odnosima mI/Cr između zdravih kontrola i HIV+ pacijenata na terapiji ( $p=0.035$ ), što je pomalo neočekivan nalaz, koji je u suprotnosti sa do sada objavljenim studijama, koje navode sniženje mI/Cr nakon uvođenja terapije [136, 138].

Voksel 12 pripada parijetalnom supkorteksu leve cerebralne hemisfere. Na ovom vokselu izdvojene su signifikantne razlike u odnosima NAA/Cr na dugom ehu ( $p=0.012$ ) i Cho/Cr na dugom ( $p=0.018$ ) i kratkom ehu ( $p<0.001$ ). Doprinos starenja razlici u NAA/Cr na ovoj lokalizaciji je vrlo slab (ispod 1% varijanse). Naknadnim testovima je pokazana razlika u nivoima NAA/Cr između zdravih kontrola i HIV+ pacijenata bez terapije ( $p=0.010$ ). Signifikantna je razlika između kontrola i HIV+ pacijenata na terapiji na ovom vokselu u odnosima Cho/Cr na dugom ( $p=0.018$ ) i kratkom ( $p<0.001$ ) ehu. Obzirom da sniženje NAA/Cr ne prati promenu u nivou odnosa Cho/Cr kod pacijenata na terapiji, moguće je da se na ovom vokselu zapravo evidentiraju pozitivni uticaji antiretroviralne terapije u supresiji neuronskog oštećenja.

U literaturi do danas nisu objavljene studije sa korišćenjem 3D multivokselne MR spektroskopije u ispitivanju neurometaboličkih promena u sivoj i beloju masi velikog mozga. Wu i saradnici su objavili studiju na multivokselnoj MR spektroskopiji velikog mozga rezus majmuna inficiranih SIV virusom (model za HIV infekciju kod rezus makaki majmuna). Ispitali su regionalne promene u neurometabolitima u akutnoj fazi infekcije (4-6 nedelja nakon infekcije). U regiji cerebralnog korteksa je detektovana povišena koncentracija mI, glija-specifičnog markera, Cho i Cr, što odgovara glijalnoj aktivaciji. Nije pronađena razlika u nivoima NAA, kao posledica pošteđe tela neurona u ranoj fazi infekcije [172]. Ovaj je rezultat protumačen kao povišena glijalna aktivnost bez značajnog oštećenja neurona, i u potpunosti odgovara rezultatima jednovokselne MR spektroskopije na humanom mozgu [136, 138, 144]. Najverovatniji patofiziološki supstrat ovakvih promena jeste astrocitna i mikroglijalna aktivacija koja prethodi neuronskim oštećenjima, obzirom da je sniženje NAA pokazano u beloju masi (aksonska

oštećenja) ali ne i u regijama sive mase (gde su locirana tela neurona) [172]. Postavljena je hipoteza da lezije bele mase koje prethode oštećenjima kortikalnih neurona mogu biti u vezi sa usporavanjem finih motornih i psihomotornih funkcija te deficitom egzekutivne funkcije u HIV-inficiranih pacijenata [150]. U ovoj studiji na animalnom modelu, posmatran je medijalni parafalcini cerebralni korteks, koji zapravo odgovara regiji posteriornog cingularnog girusa. Znajući da je posteriorni cingularni girus deo Papezovog kruga odgovoran za učenje i memoriju, promene u ovom regionu se mogu povezati sa deficitom memorijskih procesa, koji je pokazan u HIV- pacijenata. U ovoj studiji nije obuhvaćen frontalni korteks, gde su zabeležene promene u NAA na humanoj populaciji, zbog problema tehničke izvodljivosti (artefakti na dodiru površina vazduh –tkivo, hemijski pomeraj vode i masti). Iz istog tehničkog razloga, ni u našoj studiji nisu uzeti u obzir vokseli u regiji frontalnog korteksa, iako su bili pokriveni vokselskom mrežom.

Primena antiretroviralne terapije najčešće dovodi do značajnog oporavka imunog sistema kod HIV+ individua, koje se odražava povećanim brojem CD4+ T-limfocita u odnosu na nadir CD4+ broj T-limfocita. Nadir CD4+ predstavlja najniži broj CD4+ T-limfocita u istoriji bolesti pojedinačnog pacijenta. Američki vodič za antiretroviralnu terapiju je do oktobra 2015. godine nalagao započinjanje cART kada broj CD4+ T-limfocita padne ispod 350ć/µl, preporučivao je kod onih kod kojih je broj CD4+ između 350-500 µl i ostavljao kliničaru na izbor davanje terapije kod pacijenata kod kojih je broj CD4+ T-limfocita iznad 500 µl. Od oktobra 2015. godine, pak, data je preporuka da se cART uvodi odmah nakon otkrivanja HIV infekcije bez obzira na broj CD4+ limfocita [133]. Nekoliko studija je pokazalo da su neurokognitivni poremećaji u vezi sa nadir CD4+ pre nego sa aktuelnim brojem CD4+ T-limfocita [124, 173, 174]. Međutim, ove studije su bile ili na malom broju ispitanika, ili u kohortama sa ograničenim neurokognitivnim ili kliničkim podacima, te faktori kovarijanse nisu bili adekvatno ispraćeni. Elis je na velikoj prospektivnoj, multicentričnoj studiji na 1525 HIV+ pacijenata pokazao jasnu vezu između niskog nadir CD4+ i razvoja neurokognitivnog poremećaja udruženog sa HIV infekcijom. Ova veza ostaje i kod pacijenata kod kojih je postignuta adekvatna kontrola viremije (sa nedetektabilnim virusnim titrom HIV-a u plazmi) [134]. U studiji Šutena i saradnika je takođe prikazana veza između kognitivnog poremećaja i niskog nadir CD4+ [79]. U našoj studiji pokazana je pozitivna korelacija nadir CD4+ sa odnosom NAA/Cr na multivokselskoj MR spektroskopiji dugog eha na vokselima 2 (ventralni prednji cingularni girus desno, p=0.003), 4

(frontalni supkorteks levo,  $p=0.002$ ), 7 (dorzalni prednji cingularni girus levo,  $p=0.022$ ), 8 (duboka bela masa centra semiovale frontalno levo,  $p<0.001$ ), 9 (parijetalni supkorteks desno,  $p=0.032$ ) i 10 (posteriorni cingularni girus desno,  $p<0.001$ ). Najznačajnija razlika ( $p<0.001$ ) prikazana je u regiji zadnjeg cingulum desno i dubokoj beloj masi frontalno levo (vokseli 10 i 8). Obzirom da je nizak NAA/Cr odnos povezan sa neuronskim gubitkom i disfunkcijom, odnosno sa sledstvenim neurokognitivnim poremećajem, zaključujemo da je nizak nadir CD4+ i u našoj studiji pokazao svojstvo indikatora, pa čak i prediktora neurodegenerativnih promena. Uočava se pozitivna korelacija nadir CD4+ sa odnosom Cho/Cr dobijenim na MRS dugog eha na vokselima 2 (ventralni prednji cingulum desno,  $p=0.044$ ) i na vokselu 6 (dorzalni prednji cingulum desno,  $p=0.047$ ). Niski nivoi Cho/Cr pronađeni su u frontalnoj kori i bazalnim ganglijama kod HIV+ pacijenata koji su hronično inficirani, stariji i neuroasimptomatski [138]. Obzirom da se ova dva vokseli nalaze u sivoj masi frontalnog lobusa, moguće je smatrati ove rezultate sličnim sa našom studijom, posebno imajući u vidu da niži nadir CD4+ govori o dugotrajnosti HIV infekcije. Na MRS kratkog eha nisu dobijene značajne korelacije odnosa metabolita NAA/Cr i Cho/Cr sa nadir CD4+ ni ne jednoj posmatranoj lokalizaciji. Na vokselima 2 (ventralni prednji cingulum desno,  $p=0.020$ ), 7 (dorzalni prednji cingulum levo,  $p=0.009$ ) i 9 (parijetalni supkorteks desno,  $p=0.006$ ) uočena je negativna korelacija mI/Cr dobijenog na MRS kratkog eha sa nadir CD4+ (što je niži bio nadir CD4+, viši je bio odnos mI/Cr). U studiji Harezlaka iz 2014. godine, nije pokazana korelacija odnosa mI/Cr sa nadir CD4+ brojem [138]. Hiton je takođe povezo nizak nadir CD4+ ( $<200$ ) sa neurokognitivnim poremećajima u sklopu HAND-a [137]. Bladovska je pak pokazala pozitivnu korelaciju NAA/Cr sa nadir CD4+ u posteriornom cingularnom girusu, koji odgovara vokselima 10 i 11 u našoj studiji, odnosno rezultati su slični sa našom studijom. Takođe je prikazala negativnu korelaciju Cho/Cr sa nadir CD4+ u regiji frontalne bele mase, dok mi nismo obuhvatili taj region u našoj studiji [156].

Odnosi NAA/Cr dobijeni na MRS dugog eha su pokazali korelaciju sa aktuelnim brojem CD4+ T-limfocita na vokselima 2 (ventralni prednji cingulum desno,  $p=0.020$ ), 5 (duboka frontalna bela masa desno,  $p=0.031$ ), 8 (duboka bela masa frontalno levo,  $p=0.053$ ). U regiji ventralnog cingulum desno (voksel 2) prisutna je negativna korelacija Cho/Cr dobijenog na MRS dugog eha sa aktuelnim brojem CD4+ T-limfocita ( $p=0.031$ ). Na MRS kratkog eha pokazana je negativna korelacija sa Cho/Cr na vokselu 12 (parijetalni supkorteks levo,  $p=0.026$ ). Na vokselu

7 (dorzalni prednji cingularni girus levo,  $p=0.018$ ) uočava se pozitivna korelacija mI/Cr sa aktuelnim brojem CD4+ T-limfocita. Bladovska nije pokazala signifikantne korelacije odnosa posmatranih metabolita sa aktuelnim brojem CD4+ T-limfocita, ali u njenoj studiji je posmatran ograničen broj lokalizacija, od kojih ove na kojima smo mi pokazali značajnosti korelacija nisu bile uključene [156]. Čang je u studiji iz 2002. godine prikazao negativnu korelaciju aktuelnog broja CD4+ T-limfocita sa nivoom mI [150]. U studiji iz 2004. godine, koja je sprovedena na pacijentima koji su primali antiretroviralne lekove, nije pokazao značajne korelacije ovog imunološkog parametra sa koncentracijama neurometabolita, niti njihovim odnosima [144]. Slične rezultate prikazao je i Harezlak u svojoj studiji [138].

Broj CD8+ i CD3+ T-limfocita pokazuju korelaciju sa odnosom NAA/Cr na vokselima 2 (ventralni prednji cingularni girus desno,  $p=0.049$  i  $p=0.024$  respektivno) i 12 (parijetalni supkorteks levo,  $p=0.008$  i  $p=0.010$  respektivno).

Odnos CD4/CD8 pokazuje pozitivnu korelaciju sa odnosom Cho/Cr na kratkom ehf na vokselima 9 (parijetalni supkorteks desno,  $p=0.014$ ) i 11 (posteriorni cingulum levo,  $p=0.018$ ). Nije pokazana korelacija ovog imunološkog parametra ni sa jednim drugim odnosom metabolita (NAA/Cr, mI/Cr, (Glx+Gln)/Cr).

Obzirom da se neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV-om javlja među pacijentima koji nemaju prepoznate riziko-faktore za razvoj kognitivnog oštećenja, u mnogim studijama je zaključeno da je antiretroviralna terapija nedovoljno efikasna u sprečavanju negativnog efekta virusa HIV-a na centralni nervni sistem [175, 176]. Nedostatak antiretroviralne terapije je povezan sa različitim potencijalnom antiretroviralnih lekova za penetraciju u centralni nervni sistem. Indeks penetracije lekova u CNS (CPE), koji rangira režime cART prema penetraciji u CNS, se često koristi u studijama kao surogat marker za koncentracije antiretroviralnih lekova u mozgu [126]. Studije koje su se bavile prediktivnom vrednošću ovog indeksa su prikazale nekonzistentan spektar rezultata. Pojedine studije su pokazale vezu između visokog CPE i niže stope HAND-a kao i nižeg nivoa virusnog titra u likvoru [126, 177, 178], dok neke nisu pokazale nikakve uzročno-posledične veze [179, 180]. Garvi je nedavno objavila vezu između različitog kliničkog statusa u momentu započinjanja terapije i kasnijih rezultata [181]. Mara i saradnici su

sproveli studiju sa povećavanjem CPE i prikazali bolji učinak penetrantnije terapije na sniženje virusnog titra u likvoru, ali i slabije kognitivne performanse [182].

Imajući u vidu ovako različite rezultate studija na CPE indeksu, postaje jasnija činjenica da se penetracija antiretroviralnih lekova u CNS ne izjednačava sa njihovom sposobnošću da suprimiraju virus unutar cirkulišućih monocita i moždanih makrofaga, koji predstavljaju latentni rezervoar ovog virusa. Za razliku od CD4+ T-limfocita, koji podležu apoptozi brzo nakon infekcije virusom HIV-a, ćelije monocitno-makrofagne linije su prilično rezistentne na citopatske efekte virusa [183]. Nakon infekcije HIV-om (koja se dešava na nivou kostne srži ili u krvi), monociti se aktiviraju, odlaze put mozga gde, kao makrofazi proizvode inflamatorne citokine i održavaju *circulus vitiosus* imune aktivacije i inflamacije [126]. Obzirom na vladajući stav da je rezervoar HIV-a u inficiranim monocitima/makrofazima jedna od ključnih stvari u razvoju HAND-a, za očekivati je da lekovi sa boljom penetracijom u ovu ćelijsku liniju pokažu pozitivne efekte na kognitivnu funkciju. Za svrhe procene prodora antiretroviralnih lekova u monocitno/makrofagnu ćelijsku liniju, *in vitro* je konstruisan indeks monocitne efikasnosti (ME).

Ispitali smo povezanost indeksa penetrantnosti lekova u CNS (CPE) i ćelija monocitno/makrofagne linije (ME) sa odnosima metabolita koje smo dobili metodom multivokselne MR spektroskopije. Pokazali smo negativnu korelaciju odnosa NAA/Cr (na dugom ehu) sa ME na vokselima 11 (posteriorni cingulum levo,  $p=0.005$ ) i graničnu na vokselu 2 (ventralni prednji cingulum desno,  $p=0.051$ ). Na kratkom ehu, pak, prikazana je korelacija odnosa NAA/Cr sa ME indeksom na vokselima 6 (dorzalni prednji cingulum desno,  $p=0.006$ ), 7 (dorzalni prednji cingulum levo,  $p=0.018$ ), 10 (dorzalni posteriorni cingulum desno,  $p=0.039$ ) i 12 (parijetalni supkorteks levo,  $p=0.003$ ). Uočena je negativna korelacija sa Cho/Cr odnosom dobijenim na MRS dugog eha sa ME indeksom na vokselu 5 (duboka bela masa frontalno desno,  $p=0.001$ ) i 11 (posteriorni cingulum levo,  $p=0.012$ ). Na kratkom ehu se uočava negativna korelacija Cho/Cr odnosa sa ME indeksom na vokselima 4 (frontalna supkortikalna bela masa levo,  $p=0.018$ ), 5 (duboka frontalna bela masa desno,  $p=0.038$ ) i 10 (posteriorni cingulum desno,  $p=0.036$ ). Pokazana je negativna korelacija sa mI/Cr odnosom na vokselu 1 (supkortikalna bela masa frontalno desno,  $p=0.025$ ). Na vokselima 3 (ventralni prednji cingularni girus levo,  $p=0.020$ ) i 5 (duboka bela masa frontalno desno,  $p=0.007$ ) uočava se pozitivna korelacija ME indeksa i odnosa (Glx+Gln)/Cr na MRS kratkog eha.

Nije utvrđena korelacija CPE indeksa sa odnosima NAA/Cr ni na jednom posmatranom vokselu ni na metodi kratkog, ni na metodi dugog eha. Uočena je pozitivna korelacija odnosa Cho/Cr dobijenog metodom MRS dugog eha na vokselima 2 (ventralni prednji cingularni girus desno,  $p=0.005$ ), 6 (dorzalni prednji cingularni girus desno,  $p=0.001$ ) i 8 (duboka frontalna bela masa levo,  $p=0.032$ ). Što se tiče metode kratkog eha uočena je pozitivna korelacija CPE indeksa i odnosa Cho/Cr na vokselu 6 (prednji cingularni girus desno,  $p=0.012$ ) i granična pozitivna korelacija na vokselu 1 (supkortikalna bela masa frontalno desno,  $p=0.053$ ). Ne postoji povezanost odnosa mI/Cr sa CPE indeksom ni na jednom posmatranom vokselu. Nekoliko skorijih studija je pokazalo vezu između režima antiretroviralne terapije sa visokom penetrantnošću u CNS (visokim CPE indeksom) i niže stope incidence kognitivnih oštećenja [183, 184]. Harezlak nije pokazao signifikantnu korelaciju između stope neurokognitivnog oštećenja i CPE indeksa [138]. Studija Sizik i saradnika je pokazala povezanost CPE indeksa sa blagom redukcijom mI u posteriornom cingulumu. Njihova kohorta je primala terapiju sa visokim CPE indeksima (većina  $>7$ ) [83]. Nijedan od aktuelno dostupnih indeksa za procenu efikasnosti režima antiretroviralne terapije ne odražava adekvatno uticaj terapije na oba rezervoara HIV virusa u mozgu. CPE indeks pretpostavlja da antiretroviralni lekovi moraju biti prisutni likvoru u koncentracijama koje prevazilaze srednju inhibitornu koncentraciju definisanu u plazmi ili na *in vitro* modelima [126]. ME indeks je usmeren na procenu efikasnosti terapije preko monocita/makrofaga u krvotoku ili mozgu, obzirom na pretpostavku da su ove ćelije primarni konstantni izvor proinflamatornih citokina i virusne replikacije [185]. Lako je zaključiti da je najefikasnija ona terapija koja će minimizovati intracelularne rezervoare HIV-a i dobro penetrirati u CNS. Kako je više nego očigledno da nijedan od postojećih indeksa ne daje prave i sveobuhvatne informacije o delotvornosti lekova unutar CNS-a, u budućnosti je potrebno ili kombinovati elemente dobijanja CPE i ME skorova u jedinstveni indeks ili iznaći nove indekse sa pouzdanijom prediktivnom vrednosti.

Značajno ograničenje naše studije je korišćenje odnosa metabolita sa Cr umesto njihovih apsolutnih vrednosti. Cr se u našoj studiji koristio kao referentni marker, obzirom da je pretpostavljena njegova konstantnost u brojnim patološkim stanjima moždanog parenhima. Jang je u studiji iz 2014. postavio pitanje nepromenljivosti koncentracije Cr u akutnoj fazi infekcije HIV-om i shvatio potrebu za studijama koje će pokazati ponašanje Cr tokom različitih faza HIV

infekcije [135]. Skorija studija Sailasute i saradnika je prikazala pad Cr tokom vremena u brojnim regionima mozga kod pacijenata koji su na cART [136]. Nivo Cr u mozgu je u ravnoteži sa fosfokreatinom preko aktivnosti enzima kreatin-kinaze. Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze su povezane sa sniženom aktivnošću kreatin-kinaze i moguće je da utiču na pad Cr na MRS studijama. Drugo objašnjenje za promene u nivoima Cr je povezano sa intenzivnom neuronskom aktivnošću i nedovoljnom produkcijom energije. Visoki zahtevi za proizvodnjom energije od strane inficiranih monocita tokom ranih faza infekcije HIV-om, mogu perzistirati i u hroničnoj HIV-infekciji [186-188]. Anderson je u svojoj studiji pokazao da nivoi Cr u frontalnoj beloj masi pokazuju pozitivnu korelaciju sa biomarkerima monocitno-makrofagne aktivacije u likvoru (interferon indukovani protein IP-10 i monocitni hemotaktični protein MCP-1), te sa brojem kopija HIV RNK u likvoru (kod pacijenata kod kojih nije postignuta zadovoljavajuća kontrola viremije ili postoji tzv. „virusni beg”) [161]. Iz svega navedenog, može biti problematično što se nivo Cr posmatra kao stabilan. Dodatne studije su neophodne da objasne mehanizme koji doprinose ovim promenama.

Drugi značajni limit studije je razlika u godinama života između posmatranih grupa ispitanika, pri čemu je grupa hronično inficiranih HIV+ pacijenata na antiretroviralnoj terapiji značajno starija od druge dve grupe ispitanika (HIV+ pacijenti bez terapije i zdrave kontrole). Obzirom na pokazan diskutabilan odnos i međusobnu interakciju fiziološkog starenja mozga i neurokognitivnog poremećaja udruženog sa HIV infekcijom, teško je tumačiti promene u odnosima metabolita i njihove korelacije sa imunološkim parametrima, bez uzimanja u obzir multifaktorijalnosti nastanka ovih promena.

Konačno, ograničenje studije je i nedostatak detaljnije i obimnije baterije neurokognitivnih testova, ali je u kliničkoj praksi tesko motivisati pacijente da rade dugotrajne i iscrpljujuće testove. Dodatno, aktuelno ne raspolažemo dovoljnim brojem kvalifikovanih kliničkih psihologa koji bi to mogli izvesti na kvalitetan način, te su zbog toga razvijeni jednostavniji testovi koje može raditi i drugo medicinsko osoblje.

Multivokselska MR spektroskopija je moćna metoda za prikaz i evaluaciju regionalno-zavisnih promena u odnosima metabolita, koji odražavaju uporedne procese neuroinflamacije i neurodegeneracije u mozgu, pre nego što oni postanu klinički manifestni. Identifikovali smo



pojedine voksele u sivoj i supkortikalnoj belojoj masi koji pružaju sveobuhvatne informacije o patološkom supstratu neurokognitivnog poremećaja udruženog sa HIV infekcijom. Važne korelacije odnosa metabolita sa nadir CD4+ brojem T-limfocita i praktično odsustvo značajnijih zavisnosti odnosa neurometabolita sa imunološkim parametrima T-ćelija u momentu snimanja doprinose boljem razumevanju patogeneze oštećenja mozga virusom HIV-a i razvoju tog oštećenja. Pokazali smo da, iako je ME indeks efikasnosti antiretroviralne terapije superiorniji u odražavanju zavisnosti promena odnosa metabolita od primenjene terapije, nijedan od važno dostupnih indeksa (CPE i ME) nije u stanju da sveobuhvatno proceni efikasnost terapije u kontroli postojećih i sprečavanju daljih oštećenja moždanog parenhima.

## 7. ZAKLJUČCI

Smatra se da HIV virus uzrokuje prerano starenje mozga, pre svega u domenu kognicije, pažnje, radne memorije i egzekutivne funkcije. Ovi efekti su prvenstveno posledica direktnog oštećenja nervnih ćelija samim virusom (preko viralnih proteina, indukovanih citokina i hemokina), ali i indirektnog, preko povećanog rizika od kardiovaskularnih oboljenja, hronične zloupotrebe narkotika i potencijalnog toksičnog efekta dugotrajne antiretroviralne terapije. Postoji izvesna kontroverza oko toga da li HIV uzrokuje neurodegeneraciju i da li se neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV infekcijom može smatrati neurodegenerativnim oboljenjem. Rezultati dosadašnjih studija na humanoj populaciji i animalnim modelima su pokazali ranu, globalnu glijalnu aktivaciju nakon infekcije HIV-om i SIV-om, koja zahvata ne samo supkortikalne strukture, kako se ranije mislilo, već i sam korteks mozga. Ova aktivacija odgovara procesu neuroinflamacije koji najverovatnije prethodi neurodegeneraciji a sigurno je makar delom i uzrokuje. Longitudinalne studije pokazuju da se tokom vremena dešavaju oštećenja kognitivne funkcije i memorije, odnosno prelazak iz asimptomatske u simptomatsku fazu HAND-a, čak i kod onih HIV+ pacijenata koji imaju dobro kontrolisanu plazma viremiju i nedetektabilne nivoe HIV RNK u plazmi i likvoru. Pomenuti rezultati usmeravaju dalja istraživanja na tzv. prozor za potencijalnu ranu terapijsku intervenciju antiinflamatornim lekovima ili onim lekovima koji redukuju ćelijsku aktivaciju. Režimi terapije koji bi potencijalno redukovali ranu gliozu bi mogli dati doprinos u prevenciji sledstvene neurodegeneracije i kognitivnih oštećenja. Jedna od mogućih terapijskih opcija u ranoj terapiji HAND-a su i antiinflamatorni lekovi, koji se još uvek ispituju samo na animalnim modelima [172].

Visoka senzitivnost multivokselne  $^1\text{H}$ -MRS sa korišćenjem senzitivnih površinskih kalemova omogućava mapiranje metabolita sa prostornom rezolucijom, sličnoj onoj u funkcionalnom MRI (u smislu određivanja razlika između sive i bele mase). MRS može dati ključni uvid u promene koncentracija metabolita mozga tokom razvoja infekcije od akutne (u prvih 4-6 nedelja nakon transmisije), primarne (do 6, odnosno 12 meseci nakon transmisije) do hronične (više od godinu dana nakon transmisije). Vrlo brzo nakon serokonverzije, dolazi do detektabilnih promena u metabolitima mozga u smislu neuronskog oštećenja i inflamacije [189-191]. Ove promene su u

dosadašnjim studijama najčešće uočene u supkortikalnoj beloj masi te frontalnoj i parijetalnoj sivoj masi, a ogledaju se pre svega u sniženom NAA i povišenom Cho i mI u hroničnoj infekciji [138, 151, 157, 192]. Međutim, u fokusu dosadašnjih MRS studija su bili specifični regioni od interesa koji su obuhvatali frontalnu i parijetalnu belu masu, bazalne ganglije i cingularni girus. U našem istraživanju su po prvi put analizirani rezultati protonske multivokselne MRS bele i sive mase velikog mozga u suprakalozalnom regionu, metodom protonske multivokselne magnetno-rezonantne spektroskopije. Utvrđeno je da postoje difuzne, ali ipak visoko regionalno-zavisne promene u odnosima neurometabolita kod pacijenata koji dobijaju antiretroviralnu terapiju i kod pacijenata koji nisu dobijali terapiju u poređenju sa zdravim kontrolnim ispitanicima (odgovarajućim po polu i starosti). Pokazana je i relativna nadmoć metode MV MRS dugog eha u prikazivanju difuznog procesa neurodegeneracije i regionalno-zavisnih procesa atrofije (dominantnog u regionima supkortikalne bele mase) i inflamacije (dominantnog u regionima sive mase cingularnih girusa). Dodatne studije sa posmatranjem apsolutnih koncentracija neurometabolita, kao i longitudinalne studije u koje su uključeni HIV+ pacijenti u različitim fazama bolesti, su neophodne za dalje i bolje razumevanje neuropatogeneze HAND-a.

Dosadašnje studije su pokazale da cART može dovesti do značajnih poboljšanja, ali nikad do normalizacije nivoa metabolita. Magnetno-rezonantna spektroskopija se pokazala uspešnom u detekciji efikasnosti određenih terapijskih opcija. Primena terapije u ranim stadijumima bolesti bi mogla imati neuroprotektivni efekat, ali su takođe utvrđeni i potencijalni toksični neželjeni efekti terapije, pre svega u vidu mitohondrijalne toksičnosti i pogoršanja funkcije neurona [173, 182]. Moguće je da određeni lekovi, u prvom redu nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze, doprinose neurodegeneraciji u malom procentu [193]. Dva postojeća indeksa za procenu efikasnosti antiretroviralne terapije (CPE, ME) odvojeno pogađaju dva puta neuropatogeneze kognitivnog poremećaja, sa različitim uspehom u sveobuhvatnoj proceni efekta i efikasnosti terapije. U budućnosti je potrebna njihova pojedinačna modulacija ili kreiranje jedinstvenog indeksa, koji bi obuhvatio i efikasnost prolaza leka kroz hematoencefalnu barijeru i dejstvo na latentni rezervoar HIV-a u ćelijama monocitno-makrofagne loze.

## 8. REFERENCE

1. Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, McCutchan JA, Letendre SL, Leblanc S, Corkran SH, Darte NA, Clifford DB, Woods SP, Collier AC, Marra CM, Morgello S, Mindt MR, Taylor MJ, Marcotte TD, Atkinson JH, Wolfson T, Gelman BB, McArthur JC, Simpson DM, Abramson I, Gamst A, Fennema-Notestine C, Jernigan TL, Wong J, Grant I, Group C, Group H. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in race, nature and predictors. *J Neurovirol* 2011; 17(1):3-16.
2. Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, Cherner M, Clifford DB, Cinque P, Epstein LG, Goodkin K, Gisslen M, Grant I, Heaton RK, Joseph J, Marder K, Marra CM, McArthur JC, Nunn M, Price RW, Pulliam L, Robertson KR, Sacktor N, Valcour V, Wojna VE. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 2007;69(18):1789–1799.
3. Canizares S, Cherner M, Ellis RJ. HIV and Aging: Effects on the Central Nervous System. *Semin Neurol* 2014; 34(1):27–34.
4. Airoidi M, Bandera A, Trabattoni D, Tagliabue B, Arosio B, Soria A, Rainone V, Lapadula G, Annoni G, Clerici M, Gori A. Neurocognitive impairment in HIV-infected naive patients with advanced disease: the role of virus and intrathecal immune activation. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012:467154.
5. Gendelman HE, Orenstein JM, Baca LM, Weiser B, Burger H, Kalter DC, Meltzer MS. The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS* 1989; 3(8):475–495.
6. Canestri A, Lescure FX, Jaureguiberry S, Moulignier A, Amiel C, Marcelin AG, Peytavin G, Tubiana R, Pialoux G, Katlama C. Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2010; 50(5):773-8.
7. Peluso MJ, Ferretti F, Peterson J, Lee E, Fuchs D, Boschini A, Gisslen M, Angoff N, Price RW, Cinque P, Spudich S. Cerebrospinal fluid HIV escape associated with progressive neurologic dysfunction in patients on antiretroviral therapy with well controlled plasma viral load. *AIDS* 2010; 26(14):1765-74.

8. Everall I, Vaida F, Khaniou N, Lazzaretto D, Achim C, Letendre S, Moore D, Ellis R, Cherner M, Gelman B, Morgello S, Singer E, Grant I, Masliah E: National NeuroAIDS Tissue Consortium (NNTC). Cliniconeuropathologic correlates of human immunodeficiency virus in the era of antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 2009; 15(5-6):360-70.
9. Price RW, Brew B. The AIDS dementia complex. *J Infect Dis* 1988;158:1079–83.
10. Ho WZ, Cherukuri R, Douglas SD. The macrophage and HIV-1. *Immunol Ser* 1994; 60:569–87.
11. Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1614(1):36–50.
12. Wu L, KewalRamani VN. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(11):859–68.
13. Ellery PJ, Tippett E, Chiu YL, Paukovics G, Cameron PU, Solomon A, Lewin SR, Gorry PR, Jaworowski A, Greene WC, Sonza S, Crowe SM. The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol* 2007; 178(10):6581–9.
14. Williams DW, Calderon TM, Lopez L, Carvallo-Torres L, Gaskill PJ, Eugenin EA, Morgello S, Berman JW. Mechanisms of HIV entry into the CNS: increased sensitivity of HIV infected CD14 + CD16+ monocytes to CCL2 and key roles of CCR2, JAM-A, and ALCAM in diapedesis. *PLoS One* 2013; 8(7): e69270.
15. Schnell G, Spudich S, Harrington P, Price RW, Swanstrom R. Compartmentalized human immunodeficiency virus type 1 originates from long-lived cells in some subjects with HIV-1-associated dementia. *PLoS Pathog* 2009; 5(4):e1000395.
16. Zlokovic BV: Neurodegeneration and the neurovascular unit. *Nat Med* 2010; 16(12):1370–1.
17. Aguilera KY, Brekken RA. Recruitment and retention: factors that affect pericyte migration. *Cell Mol Life Sci: CMLS* 2014; 71(2):299–309.
18. An SF, Groves M, Gray F, Scaravilli F. Early entry and widespread cellular involvement of HIV-1 DNA in brains of HIV-1 positive asymptomatic individuals. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58(11):1156–62.

19. Meltzer MS, Skillman DR, Gomatos PJ, Kalter DC, Gendelman HE. Role of mononuclear phagocytes in the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:169–94.
20. Nottet HS, Persidky Y, Sasseville VG, Nukuna AN, Bock P, Zhai QH, Sharer LR, McComb RD, Swindells S, Soderland C, Gendelman HE. Mechanisms for the transendothelial migration of HIV-1-infected monocytes into brain. *J Immunol* 1996; 156(3):1284-95.
21. Toborek M, Lee YW, Pu H, Malecki A, Flora G, Garrido R, Hennig B, Bauer HC, Nath A. HIV-Tat protein induces oxidative and inflammatory pathways in brain endothelium. *J Neurochem* 2003; 84(1):169–79.
22. Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, Morgan RA, Wingfield P, Gallo RC. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol* 1993; 67(1):277–87.
23. Hudson L, Liu J, Nath A, Jones M, Raghavan R, Narayan O, Male D, Everall I. Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues. *J Neurovirol* 2000; 6(2):145–55.
24. Johnson TP, Patel K, Johnson KR, Maric D, Calabresi PA, Hasbun R, Nath A. Induction of IL-17 and nonclassical T-cell activation by HIV-Tat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(33):13588–93.
25. Bachani M, Sacktor N, McArthur JC, Nath A, Rumbaugh J. Detection of anti-tat antibodies in CSF of individuals with HIV-associated neurocognitive disorders. *J Neurovirol* 2013; 19(1):82–8.
26. Andras IE, Pu H, Deli MA, Nath A, Hennig B, Toborek M. HIV-1 Tat protein alters tight junction protein expression and distribution in cultured brain endothelial cells. *J Neurosci Res* 2003; 74(2):255–65.
27. Xu R, Feng X, Xie X, Zhang J, Wu D, Xu L. HIV-1 Tat protein increases the permeability of brain endothelial cells by both inhibiting occludin expression and cleaving occludin via matrix metalloproteinase-9. *Brain Res* 2012; 1436:13–9.
28. Kim TA, Avraham HK, Koh YH, Jiang S, Park IW, Avraham S. HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. *J Immunol* 2003; 170(5):2629–37.
29. Eugenin EA, Osiecki K, Lopez L, Goldstein H, Calderon TM, Berman JW. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus

(HIV)-infected leukocytes across the blood–brain barrier: a potential mechanism of HIV-CNS invasion and NeuroAIDS. *J Neurosci* 2006; 26(4):1098–106.

30. Moore JP, McKeating JA, Weiss RA, Sattentau QJ. Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* 1990; 250(4984):1139–42.

31. Toneatto S, Finco O, van der Putten H, Abrignani S, Annunziata P. Evidence of blood–brain barrier alteration and activation in HIV-1 gp120 transgenic mice. *AIDS* 1999; 13(17):2343–48.

32. Chaudhuri A, Duan F, Morsey B, Persidsky Y, Kanmogne GD. HIV-1 activates proinflammatory and interferon-inducible genes in human brain microvascular endothelial cells: putative mechanisms of blood–brain barrier dysfunction. *J Cerebr Blood Flow Metabol* 2008; 28(4):697–711.

33. Kanmogne GD, Schall K, Leibhart J, Knipe B, Gendelman HE, Persidsky Y. HIV-1 gp120 compromises blood–brain barrier integrity and enhances monocyte migration across blood–brain barrier: implication for viral neuropathogenesis. *J Cerebr Blood Flow Metab: Official J Int Soc Cerebr Blood Flow Metab* 2007; 27(1):123–34.

34. Stins MF, Shen Y, Huang SH, Gilles F, Kalra VK, Kim KS. Gp120 activates children’s brain endothelial cells via CD4. *J Neurovirol* 2001; 7(2):125–34.

35. Khan NA, Di Cello F, Stins M, Kim KS. Gp120-mediated cytotoxicity of human brain microvascular endothelial cells is dependent on p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurovirol* 2007; 13(3):242–51.

36. Everall IP, Luthert PJ, Lantos PL. Neuronal number and volume alterations in the neocortex of HIV infected individuals. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56(5):481–86.

37. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11(3):327–35.

38. Hayashi H, Campenot RB, Vance DE, Vance JE. Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1. *J Neurosci* 2007; 27(8):1933–41.

39. Girault JA, Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* 2004; 61(5):641–644.

40. Chang L, Wang GJ, Volkow ND, Ernst T, Telang F, Logan J, Fowler JS. Decreased brain dopamine transporters are related to cognitive deficits in HIV patients with or without cocaine abuse. *Neuroimage* 2008; 42(2):869–78.

41. Toggas SM, Masliah E, Rockenstein EM, Rall GF, Abraham CR, Mucke L. Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature* 1994; 367(6459):188–93.
42. Lannuzel A, Lledo PM, Lamghitnia HO, Vincent JD, Tardieu M. HIV-1 envelope proteins gp120 and gp160 potentiate NMDA-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase, alter  $[Ca^{2+}]_i$  homeostasis and induce neurotoxicity in human embryonic neurons. *Eur J Neurosci* 1995; 7(11):2285–93.
43. Bardi G, Sengupta R, Khan MZ, Patel JP, Meucci O. Human immunodeficiency virus gp120-induced apoptosis of human neuroblastoma cells in the absence of CXCR4 internalization. *J Neurovirol* 2006; 12(3):211-8.
44. Catani MV, Corasaniti MT, Navarra M, Nistico G, Finazzi-Agro A, Melino G. gp120 induces cell death in human neuroblastoma cells through the CXCR4 and CCR5 chemokine receptors. *J Neurochem* 2000; 74(6):2373–79.
45. D’Hooge R, Franck F, Mucke L, De Deyn PP. Age-related behavioural deficits in transgenic mice expressing the HIV-1 coat protein gp120. *Eur J Neurosci* 1999; 11(12):4398–402.
46. Chalasani SH, Baribaud F, Coughlan CM, Sunshine MJ, Lee VM, Doms RW, Littman DR, Raper JA. The chemokine stromal cell-derived factor-1 promotes the survival of embryonic retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2003; 23(11):4601–12.
47. Khan MZ, Brandimarti R, Musser BJ, Resue DM, Fatatis A, Meucci O. The chemokine receptor CXCR4 regulates cell-cycle proteins in neurons. *J Neurovirol* 2003; 9(3):300–14.
48. Ballester LY, Capo-Velez CM, Garcia-Beltran WF, Ramos FM, Vazquez-Rosa E, Rios R, Mercado JR, Melendez RI, Lasalde-Dominicci JA. Up-regulation of the neuronal nicotinic receptor  $\alpha 7$  by HIV glycoprotein 120: potential implications for HIV-associated neurocognitive disorder. *J Biol Chem* 2012; 287(5):3079–86.
49. Haughey NJ, Holden CP, Nath A, Geiger JD. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-regulated stores of intracellular calcium in calcium dysregulation and neuron cell death caused by HIV-1 protein tat. *J Neurochem* 1999; 73(4):1363–74.
50. Liu Y, Jones M, Hingtgen CM, Bu G, Larabee N, Tanzi RE, Moir RD, Nath A, He JJ. Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med* 2000; 6(12):1380–7.
51. Trillo-Pazos G, McFarlane-Abdulla E, Campbell IC, Pilkington GJ, Everall IP. Recombinant nef HIV-IIIB protein is toxic to human neurons in culture. *Brain Res* 2000; 864(2):315–26.



52. Ewart GD, Sutherland T, Gage PW, Cox GB. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J Virol* 1996; 70(10):7108–15.
53. Akay C, Lindl KA, Shyam N, Nabet B, Goenaga-Vazquez Y, Ruzbarsky J, Wang Y, Kolson DL, Jordan-Sciutto KL. Activation status of integrated stress response pathways in neurones and astrocytes of HIV-associated neurocognitive disorders (HAND) cortex. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012; 38(2):175–200.
54. Achim CL, Adame A, Dumaop W, Everall IP, Masliah E, Neurobehavioral Research C. Increased accumulation of intraneuronal amyloid beta in HIV-infected patients. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009; 4(2):190–9.
55. Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S, Gelbard HA. Tumor necrosis factor alpha inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J Biol Chem* 1996; 271(26):15303–6.
56. Cheung R, Ravyn V, Wang L, Ptasznik A, Collman RG. Signaling mechanism of HIV-1 gp120 and virion-induced IL-1beta release in primary human macrophages. *J Immunol* 2008; 180(10):6675–84.
57. Ye L, Huang Y, Zhao L, Li Y, Sun L, Zhou Y, Qian G, Zheng JC. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J Neurochem* 2013; 125(6):897–908.
58. Kerr SJ, Armati PJ, Guillemin GJ, Brew BJ. Chronic exposure of human neurons to quinolinic acid results in neuronal changes consistent with AIDS dementia complex. *AIDS* 1998; 12(4):355–63.
59. Gelbard HA, Nottet HS, Swindells S, Jett M, Dzenko KA, Genis P, White R, Wang L, Choi YB, Zhang D. Platelet-activating factor: a candidate human immunodeficiency virus type 1-induced neurotoxin. *J Virol* 1994; 68(7):4628–35.
60. Huang Y, Zhao L, Jia B, Wu L, Li Y, Curthoys N, Zheng JC. Glutaminase dysregulation in HIV-1-infected human microglia mediates neurotoxicity: relevant to HIV-1-associated neurocognitive disorders. *J Neurosci* 2011; 31(42):15195–204.
61. Garvey LJ, Pavese N, Politis M, Ramlackhansingh A, Brooks DJ, Taylor-Robinson SD, Winston A. Increased microglia activation in neurologically asymptomatic HIV-infected patients receiving effective ART. *Aids* 2014; 28(1):67–72.

62. Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Miller RJ. Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(14):8075–80.
63. Perez-Alvarez A, Araque A. Astrocyte-neuron interaction at tripartite synapses. *Curr Drug Targets* 2013; 14(11):1220–4.
64. Navarrete M, Perea G, Maglio L, Pastor J, Garcia de Sola R, Araque A. Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. *Cereb Cortex* 2013; 23(5):1240–6.
65. Churchill MJ, Wesselingh SL, Cowley D, Pardo CA, McArthur JC, Brew BJ, Gorry PR. Extensive astrocyte infection is prominent in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol* 2009; 66(2):253–8.
66. Conant K, Garzino-Demo A, Nath A, McArthur JC, Halliday W, Power C, Gallo RC, Major EO. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(6):3117–21.
67. Ju SM, Song HY, Lee JA, Lee SJ, Choi SY, Park J. Extracellular HIV-1Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via a MAPK-NF-kappaB dependent pathway in human astrocytes. *Exp Mol Med* 2009; 41(2):86–93.
68. Holden CP, Haughey NJ, Nath A, Geiger JD. Role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers, excitatory amino acid receptors and voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels in human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> in human neurons and astrocytes. *Neuroscience* 1999; 91(4):1369–78.
69. Fernandes SP, Edwards TM, Ng KT, Robinson SR. HIV-1 protein gp120 rapidly impairs memory in chicks by interrupting the glutamate-glutamine cycle. *Neurobiol Learn Mem* 2007; 87(1):1–8.
70. Ashutosh, Chao C, Borgmann K, Brew K, Ghorpade A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 protects human neurons from staurosporine and HIV-1-induced apoptosis: mechanisms and relevance to HIV-1-associated dementia. *Cell Death Dis* 2012; 3:e332.
71. Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Bushell TJ, Gray PW, Miller RJ. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(24):14500–5.
72. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-

1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort. *Sci* (New York, NY) 1997; 277(5328):959–65.

73. Quasney MW, Zhang Q, Sargent S, Mynatt M, Glass J, McArthur J. Increased frequency of the tumor necrosis factor-alpha-308 A allele in adults with human immunodeficiency virus dementia. *Ann Neurol* 2001; 50(2):157–62.

74. Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhanda R, Mummidi S, Kulkarni H, Bamshad MJ, Telles V, Anderson SA, Walter EA, Stephan KT, Deucher M, Mangano A, Bologna R, Ahuja SS, Dolan MJ, Ahuja SK. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(21):13795–800.

75. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Isolation W-UNfH, Characterisation: Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *Aids* 2011; 25(5):679–89.

76. Langford TD, Letendre SL, Larrea GJ, Masliah E. Changing patterns in the neuropathogenesis of HIV during the HAART era. *Brain Pathol* 2003; 13(2):195–210.

77. Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, Miller EN, Becker JT, Cohen B, McArthur JC. HIV-associated neurologic disease incidence changes: multicenter AIDS Cohort Study, 1990–1998. *Neurology* 2001, 56(2):257–60.

78. Mind Exchange Working Group. Assessment, diagnosis, and treatment of HIV-associated neurocognitive disorder: a consensus report of the mind exchange program. *Clin Infect Dis* 2013; 56(7):1004-17.

79. Shouten J, Su T, Wit FW, Kootstra NA, Caan MWA, Geurtsen GJ, Schmand BA, Stolte IG, Prins M, Majoie CB, Portegies P, Reiss P. Determinants of reduced cognitive performance in HIV-1-infected middle-aged men on combination antiretroviral therapy. *AIDS* 2016; 30:1027-38.

80. Aberg JA, Kaplan JE, Libman H, Emmanuel P, Anderson JR, Stone VE, Oleske JM, Currier JS, Gallant JE. Primary care guidelines for the management of persons infected with human immunodeficiency virus: 2009 update by the HIV medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009; 49:651–81.

81. Hagberg L, Cinque P, Gisslen M, Brew BJ, Spudich S, Bestetti A, Price RW, Fuchs D. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. *AIDS Res Ther* 2010; 7:15.
82. Ances BM, Hammoud DA. Neuroimaging of HIV associated neurocognitive disorders (HAND). *Curr Opin HIV AIDS* 2014; 9(6):545-51.
83. Cysique LA, Moffat K, Moore DM, Lane TA, Davies NW, Carr A, Brew BJ, Rae C. HIV, vascular and aging injuries in the brain of clinically stable HIV-infected adults: a (1)H MRS study. *PloS one* 2013; 8:e61738.
84. Posse S, Otazo R, Dager SR, Alger J. MR Spectroscopic imaging: principles and recent advances. *J Magn Reson Imag* 2013; 37:1301-25.
85. Brown TR, Kincaid BM, Ugurbil K. NMR chemical shift imaging in three dimensions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79: 3523–6.
86. Horska A, Barker P. Imaging of brain tumors: MR spectroscopy and metabolic imaging. *Neuroimaging Clin N Am* 2010; 20(3):293-310.
87. Alger JR. Quantitative proton magnetic resonance spectroscopy and spectroscopic imaging of the brain: a didactic review. *Top Magn Reson Imaging* 2011;21:115–28.
88. Mansfield P. Spatial mapping of the chemical shift in NMR. *Magn Reson Med* 1984;1:370–86.
89. Posse S, DeCarli C, Le Bihan D. Three-dimensional echo-planar MR spectroscopic imaging at short echo times in the human brain. *Radiology* 1994;192:733–38.
90. Guimaraes AR, Baker JR, Jenkins BG, et al. Echoplanar chemical shift imaging. *Magn Reson Med* 1999;41:877–82.
91. Norris DG, Dreher W. Fast proton spectroscopic imaging using the sliced k-space method. *Magn Reson Med* 1993;30:641–45.
92. Lin FH, Tsai SY, Otazo R, et al. Sensitivity-encoded (SENSE) proton echo-planar spectroscopic imaging (PEPSI) in the human brain. *Magn Reson Med* 2007;57:249–57.
93. Otazo R, Tsai SY, Lin FH, Posse S. Accelerated short-TE 3D proton echo-planar spectroscopic imaging using 2D-SENSE with a 32-channel array coil. *Magn Reson Med* 2007;58:1107–16.
94. Posse S, Otazo R, Tsai SY, Yoshimoto AE, Lin FH. Single-shot magnetic resonance spectroscopic imaging with partial parallel imaging. *Magn Reson Med* 2009;61:541–7.

95. Otazo R, Sodickson D, Yoshimoto A, Posse S. Accelerated proton echo-planar spectroscopic imaging using parallel imaging and compressed sensing. In: Proceedings of the 18th Annual Meeting of ISMRM, Honolulu, Hawaii, 2009.
96. Dreher W, Geppert C, Althaus M, Leibfritz D. Fast proton spectroscopic imaging using steady-state free precession methods. *Magn Reson Med* 2003;50:453–60.
97. Schuster C, Dreher W, Geppert C, Leibfritz D. Fast 3D 1H spectroscopic imaging at 3 Tesla using spectroscopic missing-pulse SSFP with 3D spatial preselection. *Magn Reson Med* 2007;57:82–9.
98. Dreher W, Erhard P, Leibfritz D. Fast three-dimensional proton spectroscopic imaging of the human brain at 3 T by combining spectroscopic missing pulse steady-state free precession and echo planar spectroscopic imaging. *Magn Reson Med* 2011;66:1518–25.
99. Hu X, Levin DN, Lauterbur PC, Spraggins T. SLIM: spectral localization by imaging. *Magn Reson Med* 1988;8:314–22.
100. Gonen O, Hu J, Stoyanova R, Leigh JS, Goelman G, Brown TR. Hybrid three dimensional (1D-Hadamard, 2D-chemical shift imaging) phosphorus localized spectroscopy of phantom and human brain. *Magn Reson Med* 1995;33:300–8.
101. Barker PB, Bizzi A, De Stefano N, Gullapalli R., Lin D. *Clinical MR Spectroscopy*. Cambridge University Press, New York, 2010.
102. Heindel WC, Jernigan TL, Archibald SL, Achim CL, Masliah E, Wiley CA. The relationship of quantitative brain magnetic resonance imaging measures to neuropathologic indexes of human immunodeficiency virus infection. *Arch neurol* 1994; 51:1129–35.
103. Aylward EH, Henderer JD, McArthur JC, Brettschneider PD, Harris GJ, Barta PE, Pearlson GD. Reduced basal ganglia volume in HIV-1-associated dementia: results from quantitative neuroimaging. *Neurology* 1993; 43:2099–104.
104. Aylward EH, Brettschneider PD, McArthur JC, Harris GJ, Schlaepfer TE, Henderer JD, Barta PE, Tien AY, Pearlson GD. Magnetic resonance imaging measurement of gray matter volume reductions in HIV dementia. *Am J Psychiatry* 1995; 152:987–94.
105. Heaps JM, Joska J, Hoare J, Ortega M, Agrawal A, Seedat S, Ances BM, Stein DJ, Paul R. Neuroimaging markers of human immunodeficiency virus infection in South Africa. *J Neurovirol* 2012; 18:151–6.

106. Thompson PM, Dutton RA, Hayashi KM, Toga AW, Lopez OL, Aizenstein HJ, Becker JT. Thinning of the cerebral cortex visualized in HIV/AIDS reflects CD4+ T lymphocyte decline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102:15647–52.
107. Jernigan TL, Archibald SL, Fennema-Notestine C, Taylor MJ, Theilmann RJ, Julaton MD, Notestine RJ, Wolfson T, Letendre SL, Ellis RJ, et al. Clinical factors related to brain structure in HIV: the CHARTER study. *J Neurovirol* 2011; 17:248–257.
108. Cohen RA, Harezlak J, Schifitto G, Hana G, Clark U, Gongvatana A, Paul R, Taylor M, Thompson P, Alger J, et al. Effects of nadir CD4 count and duration of human immunodeficiency virus infection on brain volumes in the highly active antiretroviral therapy era. *J Neurovirol* 2010; 16:25–32.
109. Pfefferbaum A, Rosenbloom MJ, Sassoos SA, Kemper CA, Deresinski S, Rohlfing T, Sullivan EV. Regional brain structural dysmorphology in human immunodeficiency virus infection: effects of acquired immune deficiency syndrome, alcoholism, and age. *Biol psychiatry*. 2012; 72:361–70.
110. Li C, Zhang X, Komery A, Li Y, Novembre FJ, Herndon JG. Longitudinal diffusion tensor imaging and perfusion MRI investigation in a macaque model of neuro-AIDS: a preliminary study. *NeuroImage* 2011; 58:286–92.
111. Ragin AB, Du H, Ochs R, Wu Y, Sammet CL, Shoukry A, Epstein LG. Structural brain alterations can be detected early in HIV infection. *Neurology* 2012; 79:2328–34.
112. Tate DF, Sampat M, Harezlak J, Fiecas M, Hogan J, Dewey J, McCaffrey D, Branson D, Russell T, Conley J, et al. Regional areas and widths of the midsagittal corpus callosum among HIV-infected patients on stable antiretroviral therapies. *J Neurovirol* 2011; 17:368–79.
113. Christensen A, Russ S, Rambaran N, Wright SW. Patient perspectives on opt-out HIV screening in a Guyanese emergency department. *International health* 2012; 4:185–91.
114. Hoare J, Westgarth-Taylor J, Fouche JP, Spottiswoode B, Paul R, Thomas K, Stein D, Joska J. A diffusion tensor imaging and neuropsychological study of prospective memory impairment in South African HIV positive individuals. *Metabolic brain disease* 2012; 27:289–97.
115. Stubbe-Drger B, Deppe M, Mohammadi S, Keller SS, Kugel H, Gregor N, Evers S, Young P, Ringelstein EB, Arendt G, et al. Early microstructural white matter changes in patients with HIV: a diffusion tensor imaging study. *BMC Neurol* 2012; 12:23.

116. Du H, Wu Y, Ochs R, Edelman RR, Epstein LG, McArthur J, Ragin AB. A comparative evaluation of quantitative neuroimaging measurements of brain status in HIV infection. *Psychiatry research* 2012; 203:95–9.
117. Zhu T, Zhong J, Hu R, Tivarus M, Ekholm S, Harezlak J, Ombao H, Navia B, Cohen R, Schifitto G. Patterns of white matter injury in HIV infection after partial immune reconstitution: a DTI tract-based spatial statistics study. *J Neurovirol* 2013; 19:10–23.
118. Rauch A, Rainer G, Logothetis NK. The effect of a serotonin-induced dissociation between spiking and perisynaptic activity on BOLD functional MRI. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:6759–64.
119. Zhang D, Raichle ME. Disease and the brain's dark energy. *Nat Rev Neurol* 2010; 6:15–28.
120. Chang L, Speck O, Miller EN, Braun J, Jovicich J, Koch C, Itti L, Ernst T. Neural correlates of attention and working memory deficits in HIV patients. *Neurology* 2001; 57:1001–7.
121. Pascal S, Resnick L, Barker WW, Loewenstein D, Yoshii F, Chang JY, Boothe T, Sheldon J, Duara R. Metabolic asymmetries in asymptomatic HIV-1 seropositive subjects: relationship to disease onset and MRI findings. *J Nucl Med* 1991; 32:1725–29.
122. Hinkin CH, van Gorp WG, Mandelkern MA, Gee M, Satz P, Holston S, Marcotte TD, Evans G, Paz DH, Ropchan JR, et al. Cerebral metabolic change in patients with AIDS: report of a six-month follow-up using positron-emission tomography. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1995; 7:180–7.
123. Rottenberg DA, Sidtis JJ, Strother SC, Schaper KA, Anderson JR, Nelson MJ, Price RW. Abnormal cerebral glucose metabolism in HIV-1 seropositive subjects with and without dementia. *J Nucl Med*. 1996; 37:1133–41.
124. Munoz-Moreno JA, Fumaz CR, Ferrer MJ, Prats A, Negro E, Garolera M, et al. Nadir CD4 cell count predicts neurocognitive impairment in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retro-viruses* 2008; 24:1301–7.
125. Brouillette MJ, Mayo N, Felows LK, Lebedeva E, Higgins J, Overton ET, Ances BM, Koski L. A better screening tool for HIV-associated neurocognitive disorders: is it what clinicians need? *AIDS* 2015; 29(8):895-902.
126. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, Best B, Clifford D, Collier AC, et al. CHARTER Group. Validation of the CNS penetration-effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol* 2008; 65:65–70.

127. Cusini A, Vernazza PL, Yerly S, Decosterd LA, Ledergerber B, Fux CA, Rohrbach J, Widmer N, Hirschel B, Gaudenz R, Cavassini M, Klimkait T, Zenger F, Gutmann C, Opravil M, Gunthard HF: Swiss HIV Cohort Study. Higher CNS penetration-effectiveness of long-term combination antiretroviral therapy is associated with better HIV-1 viral suppression in cerebrospinal fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 62(1):28-35.
128. Vassallo M, Durant J, Biscay V, Lebrun-Frenay C, Dunais B, Laffon M, Harvey-Langton A, Cottalorda J, Ticchioni M, Carsenti H, Pradier C, Dellamonica P. Can high central nervous system penetrating antiretroviral regimens protect against the onset of HIV-associated neurocognitive disorders? *AIDS* 2014; 28(4):493-501.
129. Gavegnano C, Schinazi RF. Antiretroviral therapy in macrophages: implication for HIV eradication. *Antivir Chem Chemother.* 2009; 20:63–78.
130. Shikuma CM, Nakamoto B, Shiramizu B, Liang CY, DeGruttola V, Benett K, Paul R, Kallianpur K, Chow D, Gavegnano C, Hurwitz SJ, Schinazi RF, Valcour VG. Antiretroviral monocyte efficacy score linked to cognitive impairment in HIV. *Antivir Ther* 2012; 17(7):1233-42.
131. Simioni S, Cavassini M, Annoni JM, Metral M, Iglesias K, Rimbault Abraham A, Jilek S, Calmy A, Muller H, Fayet-Mello A, Giacobini E, Hirschel B, Du Pasquier RA. Rivastigmine for HIV-associated neurocognitive disorders: a randomized crossover pilot study. *Neurology* 2013; 80(6):553-60.
132. hivbook.com [homepage on the internet]. Hamburg: Hoffmann C, Rockstroh JK. HIV 2015/2016; c2011 [updated 2015; cited 2016 Apr 14]. Available from: <https://hivbook.com/>.
133. eacsociety.org [homepage on the internet]. Brussels: European AIDS Clinical Society; c2001 [updated 2016 June; cited 2016 July 10]. Available from: <http://http://www.eacsociety.org/guidelines/eacs-guidelines/eacs-guidelines.html/>.
134. Ellis RJ, Badiee J, Vaida F, Letendre S, Heaton RK, Clifford D, Collier A, Gelman B, McArthur J, Morgello S, McCutchan JA, Grant I: CHARTER Group. CD4 nadir is a predictor of HIV neurocognitive impairment in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 2011; 25(14): 1747-51.
135. Young AC, Yiannoutsos CT, Hegde M, Lee M, Peterson J, Walter R, Price RW, Meyerhoff DJ, Spudich S. Cerebral metabolite changes prior to and after antiretroviral therapy in primary HIV infection. *Neurology* 2014; 83(18):1592-600.



136. Sailasuta N, Ross W, Ananworanich J, Chalermchai T, DeGruttola V, Lerdlum S, Pothisri M, Busovaca E, Ratto-Kim S, Jagodzinski L, Spudich S, Michael N, Kim JH, Valcour V: RV254/SEARCH 010 protocol teams. Change in brain magnetic resonance spectroscopy after treatment during acute HIV infection. *PloS One* 2012; 7(11):e49272.
137. Heaton RK, Franklin DR Jr, Deutsch R, Letendre S, Ellis RJ, Casaletto K, Marquine MJ, Woods SP, Vaida F, Atkinson JH, Marcotte TD, McCutchan JA, Collier AC, Marra CM, Clifford DB, Gelman BB, Sacktor N, Morgello S, Simpson DM, Abramson I, Gamst AC, Fennema-Notestine C, Smith DM, Grant I; CHARTER Group. Neurocognitive change in the era of HIV combination antiretroviral therapy: the longitudinal CHARTER study. *Clin Infect Dis* 2015; 60(3):473-80.
138. Harezlak J, Cohen R, Gongvatana A, Taylor M, Buchthal S, Schifitto G, Zhong J, Daar ES, Alger JR, Brown M, Singer EJ, Campbell TB, McMahan D, So YT, Yiannoutsos CT, Navia BA; HIV Neuroimaging Consortium. Predictors of CNS injury as measured by proton magnetic resonance spectroscopy in the setting of chronic HIV infection and CART. *J Neurovirol* 2014; 20(3):294-303.
139. Sailasuta N, Ananworanich J, Lerdlum S, Sithinamsuwan P, Fletcher JL, Tipsuk S, Pothisri M, Jadwattanakul T, Jirajariyavej S, Chalermchai T, Catella S, Busovaca E, Desai A, Paul R, Valcour V; SEARCH 011 Study Group. Neuronal-Glia Markers by Magnetic Resonance Spectroscopy in HIV Before and After Combination Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2016; 71(1):24-30.
140. Stern Y. Cognitive reserve. *Neuropsychologia* 2009; 47:2015–28.
141. Gongvatana A, Harezlak J, Buchthal S, et al. Progressive cerebral injury in the setting of chronic HIV infection and antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 2013;19:209–18.
142. Clifford DB, Ances BM. HIV-associated neurocognitive disorder. *Lancet Infect Dis* 2013; 13(11):976-86.
143. Ho DD, Rota TR, Hirsch MS. Infection of monocyte/ macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J Clin Invest* 1986; 77:1712–15.
144. Chang L, Lee PL, Yiannoutsos CT, et al. A multicenter in vivo proton-MRS study of HIV-associated dementia and its relationship to age. *Neuroimage* 2004;23:1336–47.
145. Cohen RA, Seider TR, Navia B. HIV effects on age-associated neurocognitive dysfunction: premature cognitive aging or neurodegenerative disease? *Alzheimers Res Ther* 2015; 7(1):37.

146. Meyerhoff DJ, MacKay S, Poole N, Dillon WP, Weiner MW, Fein G. N-acetylaspartate reductions measured by 1H MRSI in cognitively impaired HIVseropositive individuals. *Magn Reson Imaging* 1994; 12:653–9.
147. Tracey I, Carr CA, Guimaraes AR, et al. Brain choline-containing compounds are elevated in HIV-positive patients before the onset of AIDS dementia complex: a proton magnetic resonance spectroscopic study. *Neurology* 1996;46:783–8.
148. Lopez-Villegas D, Lenkinski RE, Frank I. Biochemical changes in the frontal lobe of HIV-infected individuals detected by magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9854–9.
149. Salvan AM, Vion-Dury J, Confort-Gouny S, et al. Brain proton magnetic resonance spectroscopy in HIV-related encephalopathy: identification of evolving metabolic patterns in relation to dementia and therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:1055–66.
150. Chang L, Ernst T, Witt MD, et al. Relationships among brain metabolites, cognitive function, and viral loads in antiretroviral-naive HIV patients. *Neuroimage* 2002;17:1638–48.
151. Yiannoutsos CT, Ernst T, Chang L, et al. Regional patterns of brain metabolites in AIDS dementia complex. *Neuroimage* 2004;23:928–35.
152. Valcour V, Shikuma C, Shiramizu B, et al. Higher frequency of dementia in older HIV-1 individuals: the Hawaii Aging with HIV-1 Cohort. *Neurology* 2004; 63:822–827.
153. Baker JV, Duprez D. Biomarkers and HIV-associated cardiovascular disease. *Curr Opin HIV AIDS* 2010; 5(6):511-6.
154. Ances BM, Vaida F, Yeh MJ, Liang CL, Buxton RB, Letendre S, McCutchan JA, Ellis RJ. HIV infection and aging independently affect brain function as measured by functional magnetic resonance imaging. *J Infect Dis* 2010; 201(3):336-40.
155. Winston A, Duncombe C, Li PC, et al. Two patterns of cerebral metabolite abnormalities are detected on proton magnetic resonance spectroscopy in HIV-infected subjects commencing antiretroviral therapy. *Neuroradiology* 2012;54:1331–9.
156. Bladowska J, Zimny A, Koltowska A, Szewczyk P, Knysz B, Gasiorowski J, Furdal M, Sasiadek MJ. Evaluation of metabolic changes within the normal appearing gray and white matters in neurologically asymptomatic HIV-1-positive and HCV-positive patients: magnetic resonance spectroscopy and immunologic correlation. *Eur J Radiol* 2013;82:686–92.

157. Mohamed MA, Lentz MR, Lee V, et al. Factor analysis of proton MR spectroscopic imaging data in HIV infection: metabolite-derived factors help identify infection and dementia. *Radiology* 2010;254:577–86.
158. Paul JE. Themes in world health. *World Health Popul* 2007; 9(2):3-4.
159. Suwanwela N, Phanuphak P, Phanthumchinda K, Suwanwela NC, Tantivatana J, Ruxrungtham K, Suttipan J, Wangsuphachart S, Hanvanich M. Magnetic resonance spectroscopy of the brain in neurologically asymptomatic HIV-infected patients. *Magn Reson Imaging* 2000; 18(7):859-65.
160. Gongvatana A, Cohen RA, Correia S, Devlin KN, Miles J, Kang H, Ombao H, Navia B, Laidlaw DH, Tashima KT. Clinical contributors to cerebral white matter integrity in HIV-infected individuals. *J Neurovirol* 2011; 17(5):477-86.
161. Anderson AM, Harezlak J, Bharti A, Mi D, Taylor MJ, Daar ES, Schifitto G, Zhong J, Alger JR, Brown MS, Singer EJ, Campbell TB, McMahon DD, Buchthal S, Cohen R, Yiannoutsos C, Letendre SL, Navia BA; HIV Neuroimaging Consortium. Plasma and cerebrospinal fluid biomarkers predict cerebral injury in HIV-infected individuals on stable combination antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2015; 69(1):29-35.
162. Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 2001; 101(3):249-55.
163. Lindback S, Karlsson AC, Mittler J, et al. Viral dynamics in primary HIV-1 infection: Karolinska Institute primary HIV infection study group. *AIDS* 2000;14:2283–91.
164. Vivithanaporn P, Maingat F, Lin LT, Na H, Richardson CD, Agrawal B, Cohen EA, Jhamandas JH, Power C. Hepatitis C virus core protein induces neuroimmune activation and potentiates Human Immunodeficiency Virus -1 neurotoxicity. *PloS One* 2010; 5(9):e12856.
165. Zimny A, Szewczyk P, Trypka E, et al. Multimodal imaging in diagnosis of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment – value of magnetic resonance spectroscopy, perfusion and diffusion tensor imaging of the posterior cingulate region. *J Alz Dis* 2011;27:591–601.
166. Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, et al. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000;97:6037–42.

167. Desgranges B, Baron JC, de la Sayette V, et al. The neural substrates of memory systems impairment in Alzheimer's disease. A PET study of resting brain glucose utilization. *Brain* 1998;121:611–31.
168. Kohler JJ, Lewis W. A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ Mol Mutagen* 2007;48:166–72.
169. Gellman, Current AIDS Opinion Gelman BB. Neuropathology of HAND With Suppressive Antiretroviral Therapy: Encephalitis and Neurodegeneration Reconsidered. *Curr HIV/AIDS Rep* 2015; 12(2): 272–9.
170. Rueda S, Mitra S, Chen S, Gogolishvili D, Globerman J, Chambers L, Wilson M, Logie CH, Shi Q, Morassaei S, Rourke SB. Examining the associations between HIV-related stigma and health outcomes in people living with HIV/AIDS: a series of meta-analyses. *BMJ Open* 2016; 6(7):e011453.
171. Heggeness LF, Brandt CP, Paulus DJ, Lemaire C, Zvolensky MJ. Stigma and disease disclosure among HIV+ individuals: the moderating role of emotion dysregulation. *AIDS Care* 2016; 13:1-9.
172. Wu WE, Tal A, Kirov II, Rusinek H, Charytonowicz D, Babb JS, Ratai EM, Gilberto Gonzalez R, Gonen O. Global gray and white matter metabolic changes after simian immunodeficiency virus infection in CD8-depleted rhesus macaques: proton MRS imaging at 3T. *NMR Biomed* 2013; 26(4):480-8.
173. Robertson KR, Smurzynski M, Parsons TD, Wu K, Bosch RJ, Wu J, et al. The prevalence and incidence of neurocognitive impairment in the HAART era. *AIDS* 2007; 21:1915–21.
174. Tozzi V, Balestra P, Lorenzini P, Bellagamba R, Galgani S, Corpolongo A, et al. Prevalence and risk factors for human immunodeficiency virus-associated neurocognitive impairment, 1996 to 2002: results from an urban observational cohort. *J Neurovirol* 2005; 11:265–73.
175. McArthur JC, Steiner J, Sacktor N, Nath A. Human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders: mind the gap. *Ann Neurol* 2010; 67:699–714.
176. Simioni S, Cavassini M, Annoni JM, et al. Cognitive dysfunction in HIV patients despite longstanding suppression of viremia. *AIDS*. 2010; 24:1243–50.
177. Cysique LA, Vaida F, Letendre S, et al. Dynamics of cognitive change in impaired HIV-positive patients initiating antiretroviral therapy. *Neurology* 2009; 73:342–48.
178. Tozzi V, Balestra P, Salvatori MF, et al. Changes in cognition during antiretroviral therapy:

comparison of 2 different ranking systems to measure antiretroviral drug efficacy on HIV-associated neurocognitive disorders. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009; 52:56–63.

179. Giancola ML, Lorenzini P, Balestra P, et al. Neuroactive antiretroviral drugs do not influence neurocognitive performance in less advanced HIV-infected patients responding to highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006; 41:332–337.

180. Tozzi V, Balestra P, Bellagamba R, et al. Persistence of neuropsychologic deficits despite long-term highly active antiretroviral therapy in patients with HIV-related neurocognitive impairment: prevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45:174–82.

181. Garvey L, Winston A, Walsh J, et al. Antiretroviral therapy CNS penetration and HIV-1-associated CNS disease. *Neurology* 2011; 76:693–700.

182. Marra CM, Zhao Y, Clifford DB, et al. Impact of combination antiretroviral therapy on cerebrospinal fluid HIV RNA and neurocognitive performance. *AIDS*. 2009; 23:1359–66.

183. Smurzynski M, Wu K, Letendre S, et al. Effects of central nervous system antiretroviral penetration on cognitive functioning in the ALLRT cohort. *AIDS*. 2011; 25:357–65.

184. Casado JL, Bañón S, Rodriguez MA, Moreno A, Moreno S. Efficacy and pharmacokinetics of the combination of etravirine plus raltegravir as novel dual antiretroviral maintenance regimen in HIV-infected patients. *Antiviral Res* 2015; 113:103-6.

185. Gonzalez-Scarano F, Martin-Garcia J. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:69–81.

186. Schweinsburg BC, Taylor MJ, Alhassoon OM, et al. Brain mitochondrial injury in human immunodeficiency virus-seropositive (HIV+) individuals taking nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Neurovirol* 2005;11:356–64.

187. Ratai EM, Annamalai L, Burdo T, et al. Brain creatine elevation and n-acetylaspartate reduction indicates neuronal dysfunction in the setting of enhanced glial energy metabolism in a macaque model of neuroAIDS. *Magn Reson Med* 2011;66:625–34.

188. Williams KC, Hickey WF. Central nervous system damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:537–62.

189. Lentz MR, Kim WK, Kim H, Soulas C, Lee V, Venna N, Halpern EF, Rosenberg ES, Williams K, Gonzalez RG. Alterations in brain metabolism during the first year of HIV infection. *J Neurovirol* 2011; 17:220–229.

190. Descamps M, Hyare H, Stebbing J, Winston A. Magnetic resonance imaging and spectroscopy of the brain in HIV disease. *J HIV Ther* 2008; 13:55–58.
191. Valcour V, Chalermchai T, Sailasuta N, Marovich M, Lerdlum S, Suttichom D, Suwanwela NC, Jagodzinski L, Michael N, Spudich S, et al. Central nervous system viral invasion and inflammation during acute HIV infection. *J Infect Dis* 2012; 206:275–282.
192. Cardenas VA, Meyerhoff DJ, Studholme C, Kornak J, Rothlind J, Lampiris H, Neuhaus J, Grant RM, Chao LL, Truran D, et al. Evidence for ongoing brain injury in human immunodeficiency virus-positive patients treated with antiretroviral therapy. *J Neurovirol* 2009; 15:324–333.
193. Vidal F, Gutierrez F, Gutierrez M, Olona M, Sanchez V, Mateo G, et al. Pharmacogenetics of adverse effects due to antiretroviral drugs. *AIDS Rev* 2010;12:15–30.

## **Prilog I**

### **LISTA SKRAĆENICA**

HIV- humani virus imunodeficijencije  
HAND- neurokognitivni poremećaj udružen sa HIV infekcijom  
ANI- asimptomatski neurokognitivni poremećaj  
MND- blagi neurokognitivni deficit  
HAD- demencija udružena sa HIV infekcijom  
cART- kombinovana antiretroviralna terapija  
CNS- centralni nervni sistem  
SD- standardna devijacija  
ASŽ- aktivnosti svakodnevnog života  
MDM- makrofagi porekla monocita  
HEB- hematoencefalna barijera  
TNF $\alpha$ - faktor tumorske nekroze  $\alpha$   
HBMEC- humane moždane mikrovaskularne endotelne ćelije  
RNK- ribonukleinska kiselina  
MMP-9- matriks metaloproteinaza- 9  
MAPK- mitogen aktivirana protein kinaza  
NMDAR- N-metil-D-aspartat receptor  
LRP- receptorski lipoprotein niske gustine  
ISR- integrisani odgovor na stres  
IL- interleukin  
PAF- faktor aktivacije trombocita  
PDGF- faktor rasta dobijen iz trombocita  
IMP-1- inhibitor metaloproteinaze-1  
NRF-2- *nuclear factor eothyroid derived- related factor-2*  
FKN- fraktalkin  
CREB- *cAMP response element binding protein*  
AIDS- sindrom stečene akutne imunodeficijencije  
CRF- cirkulišuće rekombinantne forme  
MNC- multivarijantna normativna komparacija  
MRI- magnetno-rezonantni imidžing  
CT- kompjuterizovana tomografija  
CSF- cerebrospinalna tečnost  
EEG- elektroencefalogram  
MRS- magnetno-rezonantna spektroskopija

DTI- difuzioni tenzorski imidžing  
fMRI- funkcionalni magnetno-rezonantni imidžing  
PET- pozitronska emisiona tomografija  
MR- magnetna rezonanca  
SV- jednovokselska  
MV- multivokselska  
PRESS- *Point RESolved Spectroscopy*  
STEAM- *Stimulation Echo Acquisition Mode*  
CSI- imidžing hemijskog pomeraja  
2D- dvodimenzionalna  
3D- trodimenzionalna  
TE- vreme eha  
TR- vreme repeticije  
VOI- volumen od interesa  
PSF- širenje prostorne tačke  
SNR- odnos signala i šuma  
PPM- *part per million*  
RF- radiofrekventni  
STIR- *Short T1 Inversion Recovery*  
FOV- vidno polje  
CPSY- korelaciona spektroskopija  
EPSI- ehoplanarni spektroskopski imidžing  
SSFP- *Steady State Free Precession*  
SLIM- *Spectral Localization by Imaging*  
NAA- N-acetil aspartat  
Cho- holin  
Cr- kreatin  
mI- mioinozitol  
Gln+Glx- glutamin + glutamat  
Lac- laktat  
ATP- adenzin-3-fosfat  
MD- srednja difuzivnost  
FA- frakciona anizotropija  
BOLD- *Blood Oxygen Level Dependent*  
CBF- cerebralni protok krvi  
FDG- fluoro-deoksi-glukoza  
MoCA- *Montreal Cognitive Assessment*



GPCOG- *General Practitioner COGNitive assessment*  
CPE- indeks penetracije u likvor  
ME- indeks penetracije u ćelije monocitno/ makrofagne loze  
EC<sub>50</sub>- efektivna koncentracija na 50% doze  
IGF- faktor rasta sličan insulinu  
MCP-1- *monocyte chemoattractant protein – 1*  
MOG- *myelin oligodendrocyte glycoprotein*  
EACS- Evropsko kliničko udruženje za AIDS  
PCR- lančana reakcija polimeraze  
IHDS- Internacionalna skala HIV demencije  
FLAIR- *FLuid Attenuation Inversion Recovery*  
DWI- *Diffusion Weighted Imaging*  
MPR- *MultiPlanar Reconstruction*  
ANOVA- jednofaktorska analiza varijanse  
ANCOVA- jednofaktorska analiza kovarijanse  
Df- stepen slobode  
IP-10- interferonom indukovani protein - 10