

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Ena Bukić

UTICAJ ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA I
GENSKIH VARIJANTI TERT I MTHFR GENA
NA DUŽINU TELOMERA KOD PACIJENATA
SA HIV INFEKCIJOM

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Ena Bukić

INFLUENCE OF ANTIRETROVIRAL DRUGS
AND GENE VARIANTS OF TERT AND
MTHFR GENES ON TELOMERE LENGTH IN
PATIENTS WITH HIV INFECTION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

Mentori:

Prof. dr Gordana Dragović Lukić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija

Prof. dr Jelena Milašin, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija

Članovi Komisije za ocenu završene teze:

1. *Prof. dr Ljiljana Gojković Bukarica*, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija

2. *Prof. dr Ivana Novaković*, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija

3. *Prof. dr Jovan Ranin*, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija

4. *Prof. dr Marija B. Stanojević*, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Srbija

5. *Prof. dr Saša Vukmirović*, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Srbija

Datum odbrane:

Zahvalnica:

Želim da izrazim svoju najiskreniju zahvalnost svima koji su mi pružili pomoć i podršku tokom izrade ove doktorske disertacije.

Neizmernu zahvanost dugujem svom mentoru prof. dr Gordani Dragović na njenom izvanrednom vođenju i bezrezervnoj podršci. Želim da izrazim naročitu zahvalnost svom drugom mentoru, prof. dr Jeleni Milašin na nesebičnoj saradnji i beskrajnom strpljenju.

Veliku zahvalnost upućujem svojim kolegama, novostečenim prijateljima, sa Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i iz Laboratorije za humanu genetiku, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Stručnost članova komisije za odbranu i njihova spremnost da podele svoje znanje i upute konstruktivne kritike bili su od izuzetnog značaja i uticaja na oblikovanje moje doktorske disertacije.

Želim da se zahvalim i koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze jer su učestvovali u kreiranju koncepta: prof. dr Gordani Dragović i prof. dr Jeleni Milašin; prikupljanju podataka: doc. dr Bošku Toljiću, ass. dr Božani Obradović, dr Jeleni Jadžić; formalnoj analizi: prof. dr Gordani Dragović, prof. dr Jeleni Milašin, doc. dr Bošku Toljiću i dr Jeleni Jadžić; istraživanju: prof. dr Gordani Dragović, prof. dr Jeleni Milašin i doc. dr Bošku Toljiću; metodologiji: doc. dr Bošku Toljiću, ass. dr Božani Obradović i dr Jeleni Jadžić; superviziji: prof. dr Gordani Dragović i prof. dr Jeleni Milašin i uređivanju rukopisa: prof. dr Gordani Dragović, prof. dr Jeleni Milašin i doc. dr Bošku Toljiću.

Takođe, želim da izrazim iskrenu zahvalnost pacijentima i osoblju Klinike za infektivne i tropske bolesti „Dr Kosta Todorović“, UKCS, a posebno prof. dr Đorđu Jevtoviću i prof. dr Jovanu Raninu koji su obezbedili pristup resursima.

Želim da izrazim najdublju zahvalnost svojoj porodici. Njihova nepokolebljiva ljubav, razumevanje i ohrabrenje bili su temelj mojih dostignuća. Njihove žrtve, strpljenje i vera u mene podstakli su moju odlučnost da istrajem.

Hvala vam svima još jednom na istrajnoj podršci, neiscrpnim savetima i verovanju u naš zajednički rad. Ova teza jeste kruna našeg zajedničkog rada i zauvek ću biti zahvalna na prilikama koje su mi pružene, značajnim iskustvima koja sam stekla i novim prijateljstvima koja su neprocenjiva.

S poštovanjem,

Ena Bukić

UTICAJ ANTIRETROVIRUSNIH LEKOVA I GENSKIH VARIJANTI TERT I MTHFR GENA NA DUŽINU TELOMERA KOD PACIJENATA SA HIV INFEKCIJOM

Sažetak

Uvod: Uprkos efikasnoj kombinovanoj antiretrovirusnoj terapiji (*combined antiretroviral therapy*, cART), u organizmu pacijenata koji su inficirani humanim virusom imunodeficijencije (*human immunodeficiency virus*, HIV), formiraju se anatomske rezervoari u kojima se virus i dalje replikuje, te je na ovaj način uticaj HIV virusa na organizam hronično prisutan. Inflamacija i kumulativna toksičnost usled kontinuirane primene cART su potencijalno povezani sa ubrzanim procesom starenja. Biološka starost HIV-om inficiranih pacijenata može odstupati od njihove hronološke starosti. Biološka starost pacijenata se može pratiti promenama vrednosti biomarkera starenja. Pouzdanim, savremenim molekularnim biomarkerom starenja organizma smatra se promena dužine telomera. Telomere su DNK sekvence na krajevima hromozoma koje štite hromozome od gubitka genetičkog materijala. Tokom života, telomere se skraćuju prilikom svake ćelijske deobe. Kada se dostigne kritično skraćivanje telomera, deobe ćelija se zaustavljaju i dolazi do programirane ćelijske smrti. Na dužinu telomera negativno mogu uticati primena cART i hronična inflamacija. Takođe, potencijalnu asocijaciju sa promenom dužine telomera pokazuju polimorfizmi rs2736100 i rs2736098 u TERT (*telomerase reverse transcriptase*) genu i polimorfizmi rs1801133 i rs1801131 u MTHFR (*methylenetetrahydrofolate reductase*) genu.

Cilj: Ispitati povezanost dužine telomera kod HIV-om inficiranih pacijenata sa dužinom trajanja infekcije HIV-om, dužinom trajanja cART-a, mehanizmom delovanja primenjenih lekova u sklopu cART-a, genskim varijantama rs2736100 i rs2736098 TERT gena i genskim varijantama rs1801133 i rs1801131 MTHFR gena. Ispitati dijagnostički potencijal dužine telomera kao relevantnog parametra koji bi mogao uticati na odabir terapije HIV-om inficiranih pacijenata.

Metode: U ovu studiju preseka je uključeno 176 pacijenata muškog pola, starosti iznad 18 godina, koji primaju cART u trajanju od minimum 16 nedelja i imaju manje od 50 kopija HIV RNK/ml krvi. Venepunkcijom se od pacijenata sa dijagnostikovanom HIV infekcijom, koji se leče u Centru za HIV/AIDS Klinike za infektivne i tropske bolesti u Beogradu, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, uzimalo po 4 ml uzorka krvi za farmakogenetsko ispitivanje. Po izvršenoj inaktivaciji virusa, iz uzoraka krvi, su izdvojene mononuklearne ćelije iz kojih je metodom izolovanja izolovana DNK. RTL je određena metodom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (*real-time PCR*), u odnosu na referentnu sekvencu. Utvrđivanje genotipova TERT i MTHFR polimorfizama je određeno metodom lančane reakcije polimeraze (PCR), praćene enzimskom digestijom PCR produkata (*restriction fragment length polymorphisms-RFLP*). Zdravstveni podaci relevantni za istraživanje su prikupljeni iz zdravstvenih kartona i istorije bolesti pacijenata. Klasifikacija individualnih parametara, dobijenih kliničkim i laboratorijskim ispitivanjima, njihova statistička obrada i grafički prikaz rezultata izvršeni su pomoću specijalizovanih R-softverskih paketa. Mašinskim učenjem pomoću softverskih paketa “*randomForest*” i “*Boruta*” izdvojene su varijable za inferencijalno statističko testiranje asocijacije sa RTL. Inferencijalna statistika je obuhvatila testove prema vrsti varijabli: Man-Vitnijev U test i *Kruskal-Wallis* test za obradu podataka u slučajevima odsustva normalne raspodele. Odnos kategorijalnih i neprekidno promenljivih varijabli testiran je Spirmanovim ili Kendalovim testom sa određivanjem koeficijenta korelacije. Za sva statistička testiranja, prag značajnosti je bio na konvencionalnom nivou od 0.05, a snaga statističkog testa iznosila je 0.8.

Rezultati: Srednja vrednost RTL pacijenata je iznosila 2.50 ± 1.87 . Nijedna od opštih karakteristika pacijenata nije bila u korelaciji sa RTL (starost, BMI, broj CD4+ T-ćelija, CRP, dužina trajanja infekcije, dužina trajanja lečenja, mehanizam transmisije infekcije). Nijedan komorbiditet, niti lekovi kojima se komorbiditeti leče nisu bili povezani sa RTL (hiperlipidemija, dijabetes, hipertenzija). Nije bilo razlike ($p = 0,761$) u RTL između terapijskih grupa: dva nukleozidna inhibitora reverzne transkriptaze (NIRT) kao glavni tretman, u kombinaciji sa inhibitorom integraze (II), inhibitorom proteaze (PI) ili nenukleozidnim inhibitorom reverzne transkriptaze (NNIRT). Nije bilo značajne razlike u RTL između različitih režima unutar cART grupa NIRT, PI i II. U sklopu cART režima koji je sadržao NNIRT, postojao je uticaj na RTL ($p = 0,018$). Ovo je bila prva studija koja je pokazala da pacijenti koji koriste efavirenz u okviru cART-a imaju značajno kraće telomere od pacijenata koji koriste nevirapin. Genotip TERT rs2736100 nije pokazao povezanost sa RTL. Međutim, TERT rs2736098 heterozigoti (GA) su imali značajno duže telomere ($p = 0,049$) od oba homozigota (GG i AA). Genotipovi MTHFR rs1801131 i rs1801133 nisu pokazali povezanost sa RTL.

Zaključci: Mehanizam delovanja cART nema presudan uticaj na dužinu telomera, iako je zapažen izvestan negativan efekat inhibitora integraze na RTL. Različiti terapijski režim je uticao na dužinu telomera samo unutar NNIRT grupe pacijenata. Polimorfizam TERT rs2736098 je povezan sa dužinom telomera. Doslednija povezanost između RTL i HIV-a možda bi se mogla naći testiranjem dodatnih polimorfizama ili korišćenjem većih kohorti.

Ključne reči: HIV, starenje, cART, telomere, RTL

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Medicinska farmakologija

UDK broj: _____

INFLUENCE OF ANTIRETROVIRAL DRUGS AND GENE VARIANTS OF TERT AND MTHFR GENES ON TELOMERE LENGTH IN PATIENTS WITH HIV INFECTION

Abstract

Introduction: Despite effective combined antiretroviral therapy (cART), in the body of patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV), anatomical reservoirs are formed in which the virus continues to replicate, and in this way the influence of the HIV virus on the body is chronically present. Inflammation and cumulative toxicity from continuous cART administration are potentially associated with an accelerated aging process. The biological age of HIV-infected patients may differ from their chronological age. The biological age of patients can be monitored by changes in the values of aging biomarkers. Change in the length of telomeres is considered a reliable, modern molecular biomarker of the aging of the organism. Telomeres are DNA sequences at the ends of chromosomes that protect chromosomes from loss of genetic material. During life, telomeres shorten with each cell division. When a critical telomere shortening is reached, cell divisions stop and programmed cell death occurs. Telomere length can be negatively affected by cART administration and chronic inflammation. Also, polymorphisms rs2736100 and rs2736098 in the TERT (telomerase reverse transcriptase) gene and polymorphisms rs1801133 and rs1801131 in the MTHFR (methylene tetrahydrofolate reductase) gene show a potential association with the change in telomere length.

Objective: To examine the association of telomere length in HIV-infected patients with the duration of HIV infection, the duration of cART, the mechanism of action of the drugs administered as part of cART, gene variants rs2736100 and rs2736098 of the TERT gene and gene variants rs1801133 and rs1801131 MTHFR gene. To examine the diagnostic potential of telomere length as a relevant parameter that could influence the choice of therapy for HIV-infected patients.

Methods: This cross-sectional study included 176 male patients, aged over 18 years, receiving cART for a minimum of 16 weeks and having less than 50 copies of HIV RNA/ml blood. A 4 ml blood sample for pharmacogenetic testing was taken by venipuncture from patients diagnosed with HIV infection, who are being treated at the Center for HIV/AIDS, Clinic for Infectious and Tropical Diseases in Belgrade, University Clinical Center of Serbia. After the inactivation of the virus, mononuclear cells were isolated from the blood samples, from which DNA was isolated using the salting method. The RTL was determined by the polymerase chain reaction method in real time (real-time PCR), in relation to the reference sequence. Determining the genotypes of TERT and MTHFR polymorphisms was determined by the method of polymerase chain reaction (PCR), followed by enzymatic digestion of PCR products (restriction fragment length polymorphisms-RFLP). Health data relevant to the study were collected from patients' medical records and medical histories. The classification of individual parameters obtained from clinical and laboratory tests, their statistical processing and graphical presentation of the results were performed using specialized R-software packages. Using machine learning, i.e. "randomForest" and "Boruta" software packages, variables were extracted for inferential statistical testing of association with RTL. Inferential statistics included tests according to the type of variables: Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test for data processing in cases of absence of normal distribution. The relationship between categorical and continuously changing variables was tested by Spearman's or Kendall's test with the determination of the correlation coefficient. For all statistical tests, the significance threshold was at the conventional level of 0.05, and the power of the statistical test was 0.8.

Results: The mean RTL value of the patients was 2.50 ± 1.87 . None of the general patient characteristics were correlated with RTL (age, BMI, CD4+ T-cell count, CRP, duration of infection, duration of treatment, mechanism of infection transmission). No comorbidities, nor medications used to treat comorbidities, were associated with RTL (hyperlipidemia, diabetes, hypertension). There was no difference ($p = 0.761$) in RTL between treatment groups: two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) as the main treatment, in combination with an integrase inhibitor (II), a protease inhibitor (PI) or a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI). There was no significant difference in RTL between different regimens within cART groups NRTI, PI and II. Within the cART regimen containing NNRTI, there was an effect on RTL ($p = 0.018$). This was the first study to show that patients using efavirenz as part of cART had significantly shorter telomeres than patients using nevirapine. TERT rs2736100 genotype showed no association with RTL. However, TERT rs2736098 heterozygotes (GA) had significantly longer telomeres ($p = 0.049$) than both homozygotes (GG and AA). MTHFR rs1801131 and rs1801133 genotypes did not show association with RTL.

Conclusions: The mechanism of action of cART has no decisive influence on telomere length, although a certain negative effect of integrase inhibitors on RTL was observed. The different therapeutic regimen affected telomere length only within the NNRTI group of patients. TERT rs2736098 polymorphism is associated with telomere length. A more consistent association between RTL and HIV might be found by testing additional polymorphisms or using larger cohorts.

Key words: HIV, aging, cART, telomeres, RTL

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Medical pharmacology

UDK number: _____

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Virus humane imunodeficijencije	1
1.1.1. Statistički podaci	1
1.1.2. Strategija borbe protiv širenja infekcije	2
1.1.3. Transmisija HIV infekcije	3
1.1.4. HIV genom	3
1.1.5. Životni ciklus HIV-a	5
1.1.6. Dijagnostika	6
1.2. Antiretrovirusni lekovi za lečenje HIV infekcije	6
1.2.1. Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze	7
1.2.1.1. Zidovudin	8
1.2.1.2. Didanozin	8
1.2.1.3. Stavudin	9
1.2.1.4. Lamivudin	9
1.2.1.5. Abakavir	9
1.2.1.6. Tenofovir	10
1.2.1.7. Emtricitabin	11
1.2.2. Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze	11
1.2.2.1. Nevirapin	12
1.2.2.2. Efavirenz	12
1.2.2.3. Etravirin	13
1.2.2.4. Rilpivirin	13
1.2.2.5. Doravirin	13
1.2.3. Proteazni inhibitori	14
1.2.3.1. Sakvinavir	15
1.2.3.2. Ritonavir	15
1.2.3.3. Lopinavir	15
1.2.3.4. Fosamprenavir	16
1.2.3.5. Atazanavir	16
1.2.3.6. Tipranavir	16
1.2.3.7. Darunavir	17
1.2.4. Integrazni inhibitori	17
1.2.4.1. Raltegravir	18
1.2.4.2. Dolutegravir	18
1.2.4.3. Elvitegravir	18
1.2.4.4. Biktegravir	19
1.2.4.5. Kabotegravir	19
1.2.5. Inhibitori fuzije	20
1.2.5.1. Enfuvirtid	20
1.2.5.2. Fostemsavir	21
1.2.6. Antagonisti CCR5 receptora	21
1.2.7. Farmakokinetički pojačivači	22
1.2.8. Strategije lečenja i profilaksa	23
1.3. Komorbiditeti i multimorbiditeti kod pacijenata sa HIV infekcijom	24
1.3.1. Lipodistrofija	25
1.3.2. Dijabetes	25
1.3.3. Hipertenzija	25
1.3.4. Kardiovaskularne bolesti	26

1.3.5. Metabolički sindrom	26
1.3.6. Neurokognicija	26
1.3.7. Bolesti bubrega	27
1.3.8. Osetljivost kostiju	27
1.4. Starenje i HIV	27
1.5. Telomere	29
1.5.1. Telomeraza	30
1.5.2. Skraćivanje telomera	32
1.6. Uticaj TERT gena na dužinu telomera	34
1.7. Uticaj MTHFR gena na dužinu telomera	35
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	37
3. MATERIJAL I METODE	38
3.1. Studijska grupa	38
3.2. Odabir tkiva za ispitivanje	38
3.3. Inaktivacija virusa	39
3.4. Izdvajanje mononukleara	40
3.5. Izolacija DNK	41
3.6. Određivanje koncentracije DNK i čistoće uzorka	42
3.7. Utvrđivanje genotipova TERT i MTHFR gena	43
3.7.1. Lančana reakcija polimeraze	43
3.7.2. Genotipizacija polimorfizama. Elektroforeza na akrilamidnom gelu	44
3.8. Određivanje relativne dužine telomera	46
3.9. Statistička obrada rezultata ispitivanja	47
4. REZULTATI	49
4.1. Opšte karakteristike pacijenata	49
4.2. Uticaj hiperlipidemije na RTL	51
4.3. Uticaj nivoa glukoze u krvi na RTL	52
4.4. Uticaj hipertenzije na RTL	52
4.5. Uticaj transmisije HIV-a na RTL	53
4.6. Uticaj terapijskog režima na RTL	54
4.7. Uticaj polimorfizama TERT gena na RTL	55
4.8. Uticaj polimorfizama MTHFR gena na RTL	58
4.9. Varijable od značajnog uticaja na RTL	61
5. DISKUSIJA	62
6. ZAKLJUČCI	73
7. LITERATURA	74

1. UVOD

1.1. Virus humane imunodeficijencije

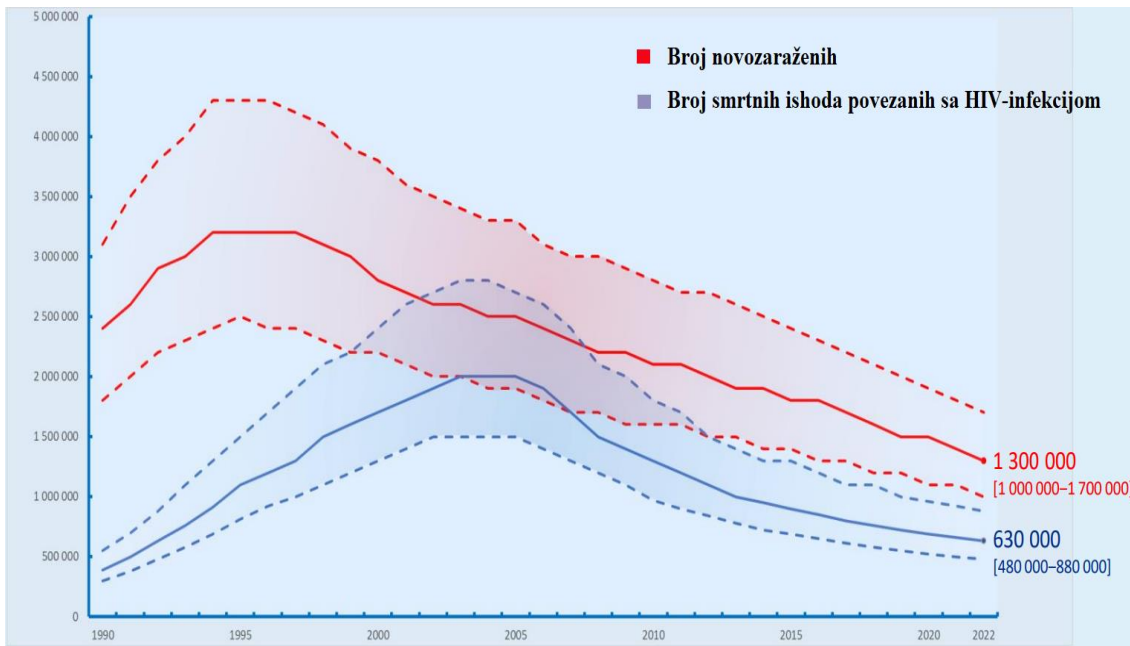
Virus humane imunodeficijencije (HIV) je jedan od vodećih globalnih zdravstvenih izazova budući da je do sada odneo oko 40,5 miliona života (1). HIV se najefikasnije replicira u aktiviranim CD4+ T ćelijama, čime se one iscrpljuju. Ovo posledično dovodi do toga da pacijenti podležu oportunističkim infekcijama, što karakteriše sindrom stečene imunodeficijencije (SIDA), ili na engleskom *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) (2). Replikacija HIV-a se najbolje drži pod kontrolom primenom kombinovane antiretrovirusne terapije (engl. *combined antiretroviral therapy* - cART), koja zaustavlja progresiju bolesti do njenog terminalnog stadijuma, odnosno AIDS-a i omogućava HIV-om inficiranim pacijentima da žive životni vek očekivan kao kod zdrave populacije (3).

HIV spada u rod *Lentivirus*, familiju *Retroviridae*, podfamiliju *Orthoretrovirinae* (4). Rezultati trenutno dostupnih epidemioloških i filogenetskih analiza ukazuju na to da se HIV pojavio u humanoj populaciji u periodu od 1920. do 1940. godine (5). Postoje dva tipa HIV-a. HIV-1 je rasprostranjen širom sveta, dok je HIV-2 manje prenosiv, manje virulentan i uglavnom ograničen na region zapadne Afrike. HIV-1 je verovatno evoluirao od virusa koji prirodno inficiraju šimpanze u centralnoj Africi (6). AIDS je prvi put prepoznat kao nova bolest 1981. godine kada je sve veći broj mladih muškaraca, homoseksualnog opredeljenja, počeo da podleže do tada neuobičajenim oportunističkim infekcijama i do tada retko uočavanim malignitetima (7). Dve godine kasnije je HIV izolovan kao uzročnik AIDS-a (8). Ubrzo zatim, 1987. godine, pokazalo se da antiretrovirusni agens zidovudin, inhibitor nukleozidne reverzne transkriptaze, ima pozitivan uticaj na kliničku progresiju bolesti (9).

1.1.1. Statistički podaci

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (u daljem tekstu: SZO), na globalnom nivou, 2022. godine je bilo registrovano ukupno 39 miliona HIV-om inficiranih osoba, što je za 24 % više u odnosu na podatke iz 2010. godine. Međutim, broj novozaraženih je u 2022. godini bio 38 % manji, a smrtnost je bila preko 50 % manja nego u 2010. godini (Slika 1). Po regionima gledano, poredeći statističke podatke iz 2010. i 2022. godine, najveći godišnji porast broja novozaraženih (za 98 %) zabeležen je u oblasti istočnog Mediterana, dok je najveći pad u broju novozaraženih (za 55 %) zabeležen u Africi. Najveći pad (od 63 %) u broju smrtnih ishoda beleži severoistočna Azija, dok je najveći porast (72 %) zabeležen u istočnom Mediteranu (10).

U 2022. godini u svetu je 29,8 miliona osoba sa HIV infekcijom bilo lečeno antiretrovirusnom terapijom. Procena je da oko 86 % zaraženih u Americi zna svoj status (u Evropi 72%), da oko 76 % zaraženih u Americi prima antiretrovirusnu terapiju (u Evropi 63 %), a da je virus suprimiran kod oko 71 % zaraženih u Americi (u Evropi 60 %). Uprkos uspesima u nekim regionima, poput Afrike sa 86 % (odnosno 20.9 miliona) HIV-om inficiranih osoba koje primaju antiretrovirusnu terapiju i postignutom supresijom kod 76 % pacijenata, mnogi regioni i dalje zaostaju za ciljevima programa Ujedinjenih nacija za HIV/AIDS (UNAIDS), kao što je slučaj sa Istočnim Mediteranom u kome je 27 % HIV-om inficiranih osoba (odnosno 130 000) podvrgnuto terapiji, a supresija je postignuta samo kod 24 % (1).



Slika 1. Broj novozaraženih osoba i broj smrtnih ishoda kroz istoriju (10).

U Srbiji je sa HIV infekcijom 2022. godine živelo oko 3800 osoba starijih od 15 godina. Oko 3300 (85 %) pacijenata je upoznato sa svojim statusom, a antiretrovirusnu terapiju prima oko 2400 (63 %) inficiranih. Broj novozaraženih je iznosio oko 200, dok je broj smrtnih ishoda usled komplikacija u vezi sa AIDS-om bio manji od 100 (11).

Efikasno lečenje HIV infekcije smanjuje širenje infekcije i smanjuje mortalitet, što je i potrebno za ostvarivanje ciljeva UNAIDS-a. Uspešan nacionalni odgovor na širenje HIV infekcije zahteva, između ostalog, dovoljno medicinskog osoblja, dostupno testiranje i najefikasnije lekove po što povoljnijim cenama (12).

1.1.2. Strategija borbe protiv širenja infekcije

Globalni ciljevi Ujedinjenih nacija za 2025. su smanjenje broja HIV-om novozaraženih osoba na manje od 370 000 godišnje i smanjenje broja smrtnih slučajeva povezanih sa HIV infekcijom na manje od 250 000 godišnje. Da bi se AIDS eliminisao kao globalna zdravstvena pretnja, do 2030. godine, ciljevi su smanjenje broja HIV-om novozaraženih osoba i broja osoba umrlih od HIV infekcije za 90% od vrednosti istoimenih parametara iz 2010. godine (10).

UNAIDS je postavio cilj, tzv. „95-95-95” strategiju koja podrazumeva da se do 2030. godine dijagnostikuje HIV infekcija kod 95% od svih HIV-om inficiranih osoba, obezbedi antiretrovirusna terapija za 95 % pacijenata sa potvrđenom dijagnozom i da se kod 95 % HIV-om inficiranih osoba postigne kompletna supresija replikacije HIV virusa (13).

Da bi se ispunili ciljevi „95-95-95” strategije za 2030. godinu, sa njihovim statusom je neophodno upoznati još 3,5 miliona ljudi koji žive sa HIV infekcijom, od kojih bar 2,1 milionu mora biti uvedena u lečenje kombinovana antiretrovirusna terapija i kod najmanje 570 000 uspostavljena supresija replikacije HIV-a.

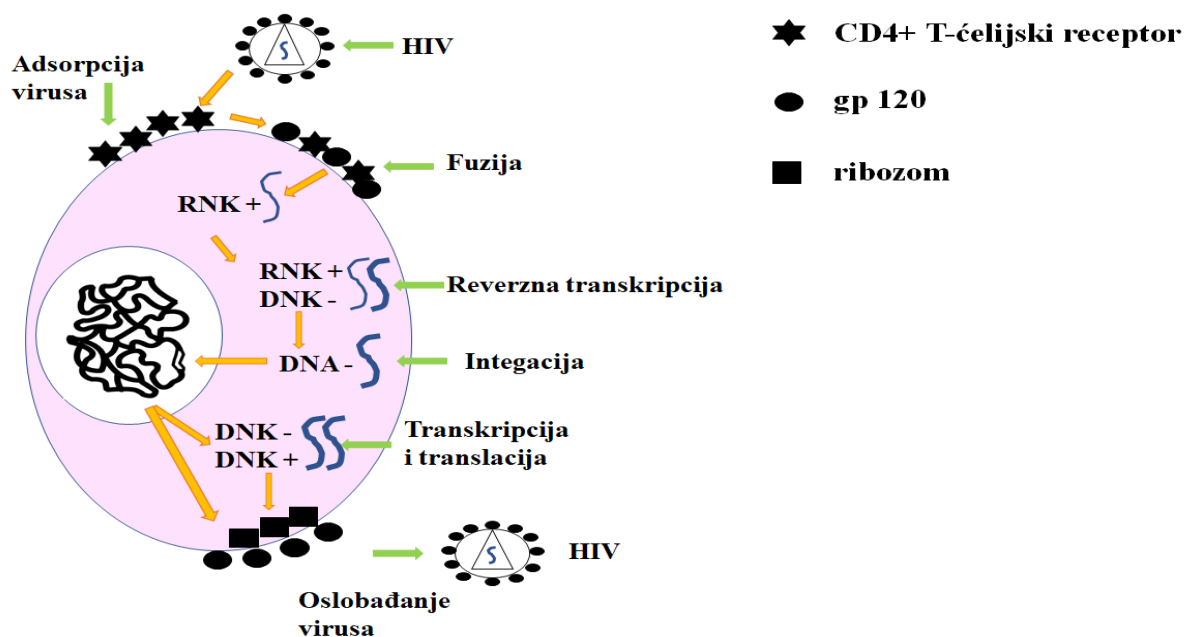
Osoba sa HIV infekcijom koja redovno uzima antiretrovirusne lekove kako je propisano, postigne i održava supresiju virusa, imaće značajno poboljšane zdravstvene ishode i neće preneti HIV svojim seksualnim partnerima (14).

1.1.3. Transmisija HIV infekcije

HIV-om inficirana osoba može inficirati drugu osobu na nekoliko načina. Virus se prenosi nezaštićenim seksualnim odnosima među heteroseksualnim ili homoseksualnim partnerima preko sperme i vaginalnog sekreta. Kod osoba koje intravenski koriste psihoaktivne supstance, infekcija je moguća preko krvi, odnosno kontaminirane igle ili sadržaja u špricu. Vertikalni prenos sa majke na dete je moguć *in utero*, tokom porođaja, ali i dojenjem (5).

1.1.4. HIV genom

Virusna čestica HIV-a (Slika 2) je sfernog oblika prečnika 80–100 nm i prekrivena je dvoslojnom lipidnom membranom poreklom od plazma membrane inficirane ćelije domaćina kojom se genetički material HIV-a zaodene tokom sklapanja i oslobađanja viriona (15).

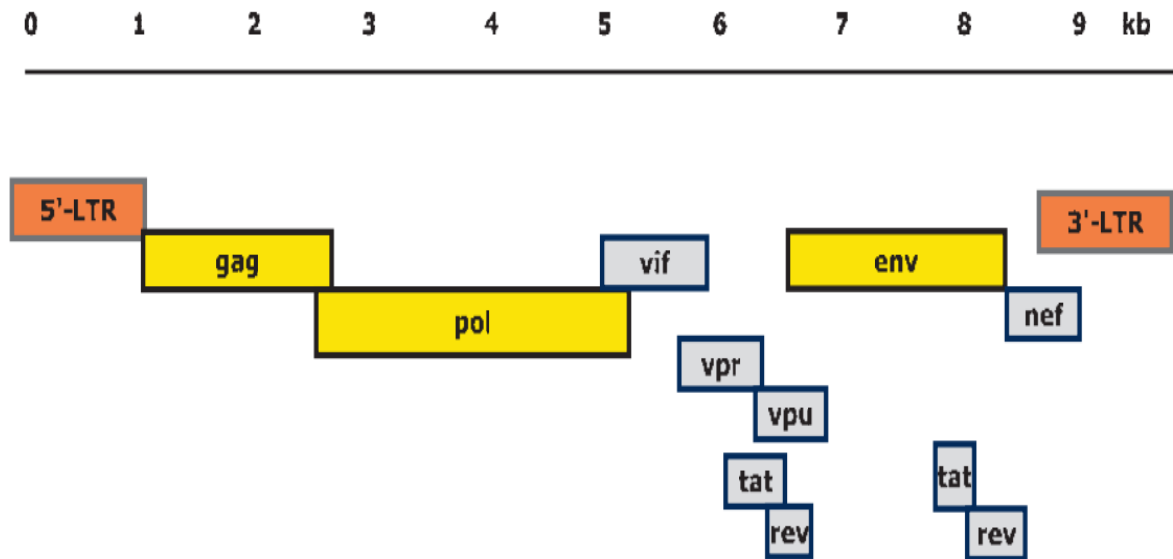


Slika 2. HIV replikacija

U sklopu membrane virusne čestice se nalaze glikoproteinski molekuli, kodirani *env* genom, sačinjeni od subjedinice gp 120 (površinski proteini) i subjedinice gp41 (transmembranski proteini). Virion preko subjedinice gp 120, stupa u kontakt sa ćelijom domaćina (CD4+ T-ćelija) preko njenih receptora i koreceptora CCR5 i CKSCR4. Interakcija domaćinovog receptora i virusnog gp 120 pokreće velike strukturne promene u virusnoj

membrani. Aktivnošću subjeinicice gp 41 dolazi do fuzije virusne i ćelijske membrane i započinje infekcija ćelije ulaskom virusa (16).

HIV-1 genom, dužine 9,75 kilobaza, čine dva identična jednolančana molekula ribonukleinske kiseline (RNK). Genom sadrži kodirajuće i nekodirajuće sekvence (Slika 3). Nekodirajuće sekvence se sastoje od dva duga terminalna ponovaka (u daljem tekstu: LTR) dužine oko 600 nukleotida. 3' LTR i 5' LTR olakšavaju inserciju virusnog u genom domaćina i sadrže promotorske i druge regulatorne sekvence neophodne za transkripciju virusne RNK. Virusni genom kodira strukturne, regulatorne i pomoćne proteine (5).



Slika 3. Strukturna organizacija HIV-1 genoma (5).

Strukturni proteini kodirani *gag* genom su građivni nukleoproteini i proteini kapsida i matriksa. Strukturni proteini kodirani *env* genom učestvuju u izgradnji virusne membrane i omogućavaju prepoznavanje i fuziju sa membranom ćelije domaćina, dok *tat* gen kodira transkripcioni aktivator, Tat protein, koji aktivira transkripciju sa LTR-a. *pol* gen kodira regulatorne proteine poput reverzne transkriptaze, protease, integraze, i virusne ribonukleaze H. *rev* gen kodira regulatora RNK splajsovanja koji takođe reguliše transport nosivih virusne RNK od jezgra do citoplazme.

Pomoćni ili prateći proteini: virusni protein R (Vpr), virusni protein U (Vpu), faktor virusne infektivnosti (Vif) i negativni efektor (Nef) ne učestvuju u ekspresiji virusnih gena, ali igraju važnu ulogu u patogenezi AIDS-a i izbegavanju antivirusnih mehanizama imunološkog odgovora domaćina (17). Navedeni proteini kontrolišu mnoge aspekte životnog ciklusa virusa i ćelije domaćina, tj. regulaciju gena i apoptozu (5).

Razumevanje mehanizama pomoću kojih se virus uspešno replicira u ćelijama domaćina i posle toga dovodi do postepenog uništavanja imunog sistema može doprineti razvoju novih terapijskih strategija.

1.1.5. Životni ciklus HIV-a

Retrovirusi su naziv dobili po enzimu koga kodiraju njihovi genomi, reverznoj transkriptazi, koja omogućava transkripciju dezoksiribonukleinske kiseline (u daljem tekstu: DNK) na osnovu RNK matrice. Posedovanje enzima sa ovim svojstvom omogućava virusu da napravi kopije sopstvenog genoma u ćeliji domaćina, kao što je npr. humana CD4+ T-ćelija. Virusna DNK se, dalje, integriše u genom limfocita, a sam process predstavlja osnovu za hroničnu HIV infekciju. Integracija HIV genoma u ćelije domaćina je velika prepreka i veliki izazov svakom antivirusnom tretmanu koji treba da suprimira i iskoreni infekciju (18).

Po fuziji membrana, virusna RNK ulazi u citoplazmu gde će se izvršiti reverzna transkripcija praćena translokacijom novosintetisane DNK u jedro i insercijom u genom domaćina. Retrovirusi koriste svoju reverznu transkriptazu za jedinstveni ciklus replikacije kojim se kopira virusna genomska RNK u DNK (19). Virusna integraza integriše ovu DNK (nazvanu provirusna DNK) u genom ćelije domaćina. Kako se ćelije dele, integrisana provirusna DNK postaje deo genoma novonastalih ćelija. Proliferirajuće ćelije domaćina, kao što su CD4+ T-ćelije, sa integrisanom provirusnom DNK, formiraju latentne rezervoare HIV čestica (20). Kako integrisana provirusna DNK postaje deo genoma ćelije domaćina, ona se ne može ukloniti uobičajenim antivirusnim lekovima.

DNK zavisna RNK polimeraza na osnovu provirusne DNK matrice sintetiše virusnu genomsku i informacionu RNK. HIV eksprimira Gag-Pol poliprotein koji se vezuje za membranu ćelije domaćina. U blizinu mesta vezivanja pomenutog poliproteina za membranu, regrutuje se novosintetisana virusna RNK. Sledi formiranje nezrelih virusnih čestica. RNK i Gag-Pol poliprotein se, zaodnuti ćelijskom membranom, oslobađaju u spoljašnjost ćelije. Sazrevanje virusa u infektivnu česticu podrazumeva autoaktivaciju i oslobađanje proteaze iz Gag-Pol prekursora kako bi ona mogla da izvrši enzimsko razlaganje preostalog dela prekursora na funkcionalne proteine. Proteoliza poliproteinskog prekursora mora biti izvršena u određenom momentu, što je eksperimentalno potvrđeno. Kada se inhibitor proteaze doda u ćeliju tokom sastavljanja virusne čestice, ne dolazi do sazrevanja viriona čak ni njegovim naknadnim uklanjanjem iz prečišćenih nezrelih viriona koji ostaju neinfektivni. Kada se proteaza oslobodi iz prekursora pre sklapanja viriona, smanjiće se produkcija virusnih čestica, a može doći i do eliminacije inficiranih ćelija usled citotoksičnog delovanja protease (21).

Najaktivnija replikacija HIV-a se odvija u limfnim čvorovima, gde se nalazi oko 98% limfocita i gde su ćelije su gusto zbijene. Razumevanje efikasnog načina širenja virusa u ovim regionima organizma je od najveće važnosti u kontroli infekcije. *In vitro* modeli, konstruisani da uporede infektivnost između slobodnocirkulišuće forme virusa i virusom inficirane ćelije *in vivo*, ukazuju na to da se širenje infekcije slobodnom formom virusa ne može održati i prednost u efikasnosti širenja infekcije daju inficiranim ćelijama. Prilikom širenja slobodne forme virusa, kada se replicirani virusi oslobode iz ćelije, oni difunduju i moraju da pronađu odgovarajući receptor na CD4+ T ćeliji, pričvrste se za nju i fuzionišu svoje membrane. Širenje virusa preko inficiranih ćelija je efikasno u limfnim čvorovima jer se pupljenje zrelog virusa događa tik uz susednu ćeliju, te je virusna čestica vrlo kratko izložena vanćelijskom okruženju i odmah dolazi u blizinu receptora susedne ćelije koju će ubrzo inficirati (22).

Specifično obeležje HIV patogeneze je postepeno iscrpljivanje CD4+ T-ćelija praćeno progresivnim padom imuniteta inficirane osobe, zajedno sa povećanom incidencom oportunističkih infekcija, maligniteta i komorbiditeta, što može dovesti do smrti. Kod nelečenih osoba napredovanje bolesti od HIV-a do AIDS-a često se dešava u periodu od 8 do 10 godina nakon inficiranja i prvobitno se smatralo da je rezultat postepenog, nezaustavljivog, virusom posredovanog uništavanja CD4+ T-ćelija. Danas je poznato da do masovnog gubljenja CD4+

T-ćelija dolazi prilično rano po inficiranju. Kod većine osoba zaraženih HIV-om, ovo početno nestajanje CD4+ T-ćelija će biti kompenzovano regeneracijom CD4+ T-ćelija i održavanjem broja CD4+ T-ćelija iznad praga od 200 ćelija/ml. Međutim, do potpune regeneracije i homeostaze CD4+ T-ćelija ne dolazi. Čak i kod osoba sa dugotrajnom supresijom HIV replikacije, CD4+ T-ćelije se iscrpljuju i stare. Vremenom se „potroše” navedeni reparativni mehanizmi i u trenutku kada broj CD4+ T-limfocita padne ispod praga, dolazi do razvoja oportunističkih infekcija. Ove promene izlažu imuni sistem izazovima. Broj efektorskih i memorijskih T ćelija opada ispod praga koji je neophodan da bi se sprečile oportunističke infekcije i maligniteti. Ubrzava se opadanje kompetentnosti CD4+ T-ćelija, što dovodi do hronične upale i indukovanja imunološkog starenja sličnog onom uočenom kod starijih osoba (23).

Uvećanje limfnih čvorova, temperatura, malaksalost i slabost, gastrointestinalni simptomi i osip su neki od uobičajenih kliničkih manifestacija koje se pojavljuju 3 do 6 nedelja po infekciji HIV-om. Ova simptomatska faza traje od dve do šest nedelja i praćena je asimptomatskom fazom. Virusni titar u krvi na početku infekcije prosečno iznosi od 10^5 do 10^9 kopija HIV RNK/ml plazme, ali taj broj može dostići i 10^{14} (24).

1.1.6. Dijagnostika

HIV RNK se u krvi može detektovati 11, a u limfocitima 14 dana nakon infekcije, dok su HIV-specifična antitela u plazmi detektabilna posle 3 nedelje, a u slučaju odloženog imunog odgovora, posle 8 nedelja (25, 26).

Dijagnoza HIV infekcijom se može pouzdano potvrditi detekcijom i utvrđivanjem broja kopija HIV RNK genoma u plazmi korišćenjem lančane reakcije polimeraze (u daljem tekstu: PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*). PCR testovi detektuju iznad 20 kopija/ml plazme. Za testiranje na prisustvo HIV-specifičnih antitela u krvi se koristi enzimski imunosorbentni test (u daljem tekstu: ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) izuzetne osetljivosti, razvijen za detekciju niskih koncentracija antitela. Kako bi se izbegli lažno pozitivni rezultati ELISA testa, uzorak se može podvrgnuti i Vesternblot eseju, ali ovaj metod ima dosta nižu osetljivost i nije pogodan za rane faze HIV infekcije (5). Zbog efikasnosti, danas se sve češće koriste PCR testovi.

Poznavanje sopstvenog HIV statusa, statusa seksualnog partnera i članova porodice je od suštinskog značaja za uspeh u borbi protiv širenja HIV infekcije. Testiranje prisustva HIV-a u organizmu doprinosi prevenciji HIV-a, blagovremenom tretmanu, ostvarivanju adekvatne nege i drugim vidovima podrške (27).

1.2. Antiretrovirusni lekovi za lečenje HIV infekcije

Prvi antiretrovirusni lek registrovan za lečenje HIV-infekcije je bio zidovudin koji je počeo da se koristi 1987. godine kao terminator rastućeg nukleozidnog lanca koji nastaje virusnom reverznom transkripcijom. Prvo antivirusno jedinjenje sa potpuno novim mehanizmom delovanja bio je sakvinavir, peptidomimetički inhibitor HIV proteaze koji je počeo da se koristi sredinom devedesetih godina prošlog veka (28). Razvoj lekova sa različitim mehanizmima delovanja je omogućio istovremenu upotrebu nukleozida koji ciljaju reverznu

transkripciju i inhibitora proteaze koji blokiraju sazrevanje virusa. Istovremeno ciljanje dva različita koraka životnog ciklusa virusa doprinelo je smanjenju viremije ispod detektabilnog nivoa, praćenog povećanjem broja CD4+ T-ćelija na normalan fiziološki nivo. Ovaj pristup je započeo novu eru u anti-HIV terapiji. Usledio je razvoj nenukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze i integriranih inhibitora, kao i drugih supstanci za ometanje životnog ciklusa virusa, poput antagonista CCR5 receptora (21).

Izazovi primene ranih antiretrovirusnih režima uključivali su veliko opterećenje tabletama, toksičnost i nepotpunu virološku supresiju. Monoterapija i nepotpuna virološka supresija rezultirali su pojavom višestrukih mutacija koje su doprinele virusnoj rezistentnosti na lekove (29). Kombinovane terapije su se pokazale efikasnijim i bezbednijim jer su istovremeno primenjene niske doze postizavale zadovoljavajuće antivirusno dejstvo, dok su neželjeni efekti i verovatnoća razvoja rezistentnih sojeva virusa bili svedeni na minimum (30).

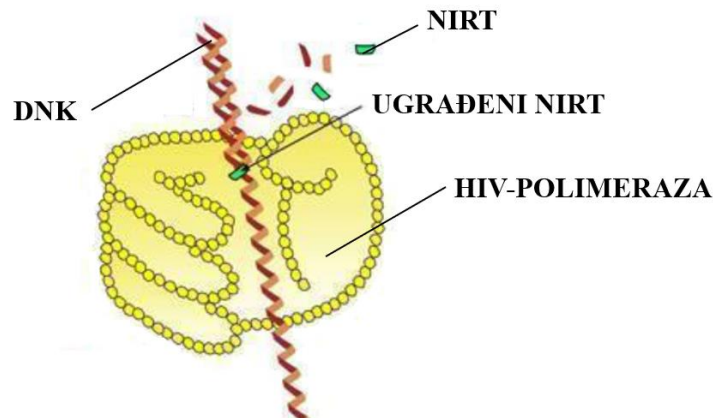
Razvoj protokola za lečenje HIV infekcije smatra se jednim od najvećih dostignuća savremene medicine. Nekada smrtonosna HIV-infekcija se danas može smatrati hroničnom bolešću sa kojom pacijenti mogu decenijama kvalitetno da žive zahvaljujući redovnoj primeni cART. Očekivani životni vek osoba zaraženih HIV-om, starosti 20 godina, povećao se sa 11,8 godina u eri monoterapije na 54,9 godina u najnovijoj eri cART, dostižući do 91,5% očekivanog životnog veka opšte populacije (31).

cART najčešće obuhvata kombinaciju tri antiretrovirusna leka: (A) dva leka iz grupe nukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze (NIRT) i jednog iz grupe nenukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze (NNIRT); (B) dva NIRT i jednog inhibitora proteaze (PI) ili (C) dva NIRT i jednog inhibitora integraze (II) (32, 33).

1.2.1. Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze

Predstavnici ove grupe lekova su zidovudin, didanozin, stavudin, lamivudin, abakavir, emtricitabin, tenofovir dizoproksil fumarat i tenofovir alafenamid.

HIV reverzna transkriptaza je polimeraza koja se sastoji od katalitičke subjedinice p66 i manje subjedinice p51 koja održava strukturu enzima. p66 subjedinica obuhvata N-terminalni domen, koji katalizuje polimerizaciju DNK na osnovu komplementarne RNK matrice, i C-terminalni RNKazni domen, koji upravlja virusnom RNK matricom tokom sinteze provirusne DNK. NIRT lekovi interaguju sa katalitičkim domenom HIV-1 reverzne transkriptaze u cilju sprečavanja sinteze virusne dvolančane DNK iz jednolančane virusne RNK genoma (34). NRTI se u formi proleka unose u organizam. Ćelijske kinaze fosforilacijom prevode prolek u njegovu aktivnu formu. NRTI lekovima nedostaje 3'-hidroksilna grupa na 2'-deoksiribozilnom delu molekula. Kada HIV polimeraza ugradi NRTI u rastući provirusni DNK lanac, usled nedostatka 3'-hidroksilne grupe, ne može se formirati 3'-5'-fosfodiesteraska veza neophodna za nastavak ugradnje nukleotida i replikacija virusa se zaustavlja (Slika 4) (35).



Slika 4. Mehanizam delovanja NIRT lekova (36).

1.2.1.1. Zidovudin

Zidovudin je sintetički analog prirodnog nukleozida timidina koji se na tržištu pojavio sredinom osamdesetih godina prošlog veka. Ovaj lek nema intrinzičnu anti-HIV aktivnost, već se u ćeliji prvo mora intracelularno konvertovati u svoj trifosfatni oblik dejstvom timidilat kinase. Konvertovani zidovudin trifosfat je sa „prirodnim” timidin trifosfatom u kompeticiji za vezivanje za virusnu DNK polimerazu, odnosno reverznu transkriptazu čiji supstrat je virusna RNK. Ugradnjom zidovudin trifosfata, kome nedostaje 3' hidroksilna grupa, onemogućeno je napredovanje rastućeg provirusnog DNK. Prevalenca HIV sojeva otpornih na zidovudin kod osoba koje nisu naivne na terapiju iznosi između 5 i 10 %. Visok nivo rezistencije na zidovudin je posledica mutacija u genu za reverznu transkriptazu kodiranu kodonima 41, 67, 70, 210, 215 i 219. Mutacija kodona 215 je najznačajnija jer dovodi do zamene treonina u tirozin ili fenilalanin i osetljivost virusne reverzne transkriptaze na zidovudin smanjuje za ≈ 16 puta. Zidovudin, kao analog nukleozida može da ometa replikaciju u mitohondrijama, što dovodi do mitohondrijalnog iscrpljivanja i poremećaja u njihovom funkcionisanju. Takođe, može da inhibira humane ćelijske DNK polimeraze i potencijalno utiče na funkcije HIV-om inficiranih i neinficiranih ćelija, ali je afinitet vezivanja za humanu DNK polimerazu 100 puta manji od afiniteta vezivanja za virusnu reverznu transkriptazu. Zidovudin se brzo i potpuno apsorbuje nakon oralne primene, ima bioraspoloživost od 63% i penetrira preko placente u amnionsku tečnost, fetalnu, neonatalnu i krv iz pupčane vrpce, u majčino mleko, pa čak i u cerebrospinalnu tečnost. Interindividualne varijacije u farmakokinetici zidovudina su velike. Lek se dobro toleriše sa incidencama povraćanja, nesаницe, kardiomiopatije, nerвозe i bolova u stomaku $\leq 5\%$ (37).

1.2.1.2. Didanozin

Didanozin je analog purinskih nukleozida koji se od 1991. godine koristio kao monoterapija, ali i u kombinaciji sa drugim antiretrovirusnim lekovima. Prvenstveno se koristio kod pacijenata koji ne podnose zidovudin, abakavir ili tenofovir. Upotreba didanozina je pozitivno uticala na supresiju replikacije virusa i povećanje broja CD4+ T-ćelija, odlagala

napredovanje bolesti kod pacijenata sa AIDS-om i povećala njihovo preživljavanje. Uklonjen je iz protokola lečenja zbog brojnih neželjenih efekata i interakcija sa drugim lekovima (38).

1.2.1.3. Stavudin

Stavudin je analog nukleozida timidina odobren za upotrebu 1994. godine. Intracelularnom fosforilacijom prelazi u svoj aktivni metabolit stavudin-5'-trifosfat koji u klinički relevantnim koncentracijama inhibira ugradnju timidin-5'-trifosfata u provirusnu DNK pomoću reverzne transkriptaze HIV-a i dovodi do prekida napredovanja sinteze DNK lanca. Stavudin je efikasan u ublažavanju simptoma HIV infekcije kod pacijenata koji ne podnose ili više ne reaguju na zidovudin ili didanozin, ali je, kao monoterapija, 5 do 10 puta manje potentan od zidovudina. Kombinacije stavudina sa većinom anti-HIV agenasa pokazuju aditivne ili sinergističke pozitivne efekte na lečenje. Virusna rezistencija na stavudin se ne razvija često, ali kada do nje dođe, primećeno je povećanje rezistencije i do 12 puta (39).

1.2.1.4. Lamivudin

Lamivudin je registrovan deceniju kasnije od zidovudina. Kao analog dideksinukleozida, sprečava replikaciju HIV-a kompetitivnom inhibicijom virusne reverzne transkriptaze i dovodi do terminacije produžavanja provirusnog DNK lanca u limfocitima humane periferne krvi, monocitima i makrofazima. Oralno primenjen lamivudin se dobro apsorbuje i ispoljava dobru sistemsku biorasploživost (82 %). Intracelularno poluvreme eliminacije lamivudina u HIV-om inficiranim ćelijama iznosi između 10,5 i 15,5 sati. U humanim mononuklearnim ćelijama je primećena minimalna citotoksičnost izazvana primenom lamivudina, što je objašnjeno izostankom interakcije sa mitohondrijalnom DNK polimerazom. Takođe, lamivudin minimalno inhibira sisarske DNK polimeraze i ima jedinstven profil virusne rezistentnosti. Učestala je mutacija na virusnom *pol* genu, koji kodira reverznu transkriptazu, dovodi do promene u kodonu 184 i do zamene metionina valinom. Ova mutacija rezultuje otpornošću virusne transkriptaze na inhibitorni efekat lamivudina, ali odlaže pojavu virusne rezistencije na zidovudin i obnavlja fenotipsku osetljivost na njega sve dok traje lečenje lamivudinom. Broj pacijenata rezistentnih na oba navedena leka je mali, a utvrđena je i njihova sinergijska efikasnost kada se koriste zajedno. Lamivudin je, takođe, vrlo efikasan i u kombinaciji sa nevirapinom. Lek se generalno dobro toleriše kod odraslih HIV-om inficiranih osoba sa brojem CD4+ T-ćelija > 500 ćelija/ μ L, ali se slabije toleriše kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću, sa brojem CD4+ T-ćelija < 100 ćelija/ μ L. Gastrointestinalni poremećaji su prijavljeni kao najčešći neželjeni događaji tokom terapije lamivudinom (40).

1.2.1.5. Abakavir

Nedugo po pojavi lamivudina, registrovan je i abakavir, karbociklični analog 2'-deoksiguanozin nukleozida. Abakavir, metabolisanjem do analoga 2'-deoksiguanozin nukleozida, kompetitivno inhibira reverznu transkriptazu HIV-a i prekida produžavanje provirusnog DNK lanca. Abakavir je izuzetno selektivan za HIV reverznu transkriptazu, sa

konstantom inhibicije od 90 do 2900 puta većom u poređenju sa konstantama inhibicije različitih humanih DNK polimeraza. Nema dokaza da abakavir ometa sintezu mitohondrijalne DNK. Rezistencija na abakavir identifikovana je po primeni leka kao monoterapije kao rezultat višestrukih mutacija na pozicijama M184V, L74V, K65R i I115F u kodirajućem region HIV reverzne transkriptaze. Primena abakavira sa lamivudinom ili zidovudinom menja obrazac i usporava pojave mutacija. Snižavanje nivoa HIV RNK ispod nivoa koji se može detektovati je izraženije i duže se održava kod pacijenata koji su prethodno bili naivni na antiretrovirusni tretman, kao i kod pacijenata koji su primali abakavir u kombinaciji sa drugim antiretrovirusnim lekovima. Apsorpcija abakavira po oralnom unosu je brza, maksimalna koncentracija u plazmi se dostiže za <1 sat, a bioraspoloživost iznosi 83%. Abakavir u kombinaciji sa lamivudinom i zidovudinom, jednostavan je i pogodan režim doziranja koji se generalno dobro podnosi, sposoban je da održi kontinuiranu supresiju virusne replikacije i odlaže uvođenje drugih klasa antiretrovirusnih lekova za kasniju upotrebu. Neželjena dejstva leka se najčešće prijavljuju ubrzo nakon početka lečenja. Većina je blagog ili umerenog intenziteta i prolaznog karaktera. Najčešće prijavljivano neželjeno dejstvo je mučnina, dok je glavni uzrok prekida terapije abakavirom razvoj reakcije preosetljivosti na lek koja je prijavljena kod 3 do 5% pacijenata (41).

HLA alel B*5701 je pokazao snažnu povezanost sa reakcijama preosetljivosti na abakavir. Stoga, većina smernica za lečenje preporučuje da se pacijenti koji započinju abakavir testiraju na prisustvo ovog alela i da oni koji su pozitivni ne treba da primaju navedeni lek. Od široko rasprostranjenog uvođenja HLA B*5701 testiranja, učestalost reakcija preosetljivosti kod onih koji primaju abakavir značajno je opala (42).

1.2.1.6. Tenofovir

Prvi novi antiretrovirusni lek koji se našao u upotrebi na početku novog milenijuma je bio tenofovir. Kasnih 1990-ih godina je postalo jasno da jedan aktivni agens protiv HIV-a nije dovoljan da suzbije replikaciju virusa i poboljša imunološku funkciju. Nova revolucionarna strategija u lečenju HIV infekcije je podrazumevala postojanje okosnice terapije koju čine dva leka iz klase NIRT. Novi NIRT lek koji se pojavio, tenofovir, je nukleotidni analog adenozin 5'-monofosfata. U svom izvornom obliku teško prolazi kroz ćelijske membrane i ima nisku biodostupnost. Da bi se njegove karakteristike poboljšale, u protokole lečenja su uvedene njegove formulacije tenofovir dizoproksil fumarate (u daljem tekstu: TDF) i tenofovir alafenamid (u daljem tekstu: TAF), koje se u organizmu metabolušu do tenofovir difosfata, inhibitora HIV replikacije, koji je u kompeticiji za ugradnju u DNK lanac sa deoksiadenozin 5'-trifosfatom. Tenofovir je komponenta preferiranih početnih režima cART zbog svoje efikasnosti, kao i poboljšane podnošljivosti u poređenju sa starijim lekovima. Primarna virusna mutacija koja kompromituje aktivnost tenofovira je K65R, povezana i sa unakrsnom rezistencijom na sve druge NIRT, osim na zidovudin. Mutacija K151M, kada se sama javi, izaziva slabu rezistenciju na tenofovir ali srednju rezistenciju kada se nađe u kombinaciji sa drugim mutacijama. Prisustvo višestrukih mutacija kao što su M41L, D67N, K70R, L210V, T215I/F i K219K/E značajno doprinose rezistenciji na tenofovir. Uobičajeni neželjeni efekti koji se javljaju kod pacijenata koji koriste TDF su povećana nefrotoksičnost, osip, dijareja, glavobolja, depresija, astenija, mučnina, laktacidoza, dok se kod pacijenata koji koriste TAF javlja smanjenje gustine kostiju od početne vrednosti, povećanje nivoa lipoproteina niske gustine i ukupnog holesterola u krvi (43).

Kada se poredi učinak TDF i TAF, stope supresije HIV RNK bile su 2% veće kod primene TAF, kada se koristio u kombinaciji sa farmakokinetičkim pojačivačima, pokazala je meta analiza sprovedena na 14 894 pacijenata. Kada se koristi bez pojačivača, nije bilo značajnih razlika u supresiji HIV RNK između TAF i TDF (44).

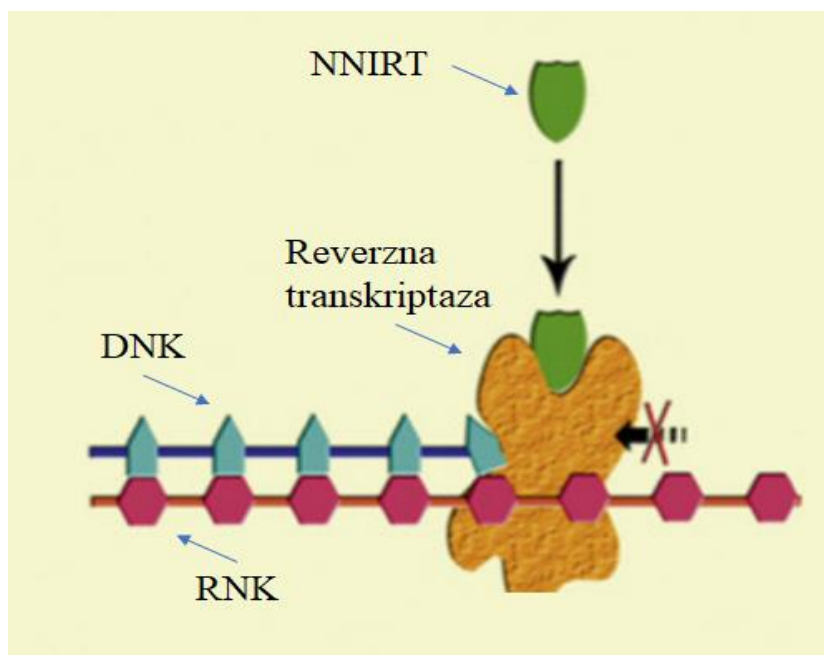
1.2.1.7. Emtricitabin

Dve godine posle tenofovira, u prodaji se našao i emtricitabin. Ugradnja aktivnog metabolita emtricitabin 5'-trifosfata u rastući DNK lanac HIV-a dovodi do prekida lanca. U poređenju sa lamivudinom, emtricitabin je *in vitro* pokazao veću efikasnost protiv HIV-a i sinergističan efekat u kombinaciji sa tenofovirom, zidovudinom, efavirenzom, nevirapinom i ritonavirovom. Strukturno, emtricitabin je fluorovani derivat lamivudina. Ova modifikacija poboljšava antivirusnu aktivnost emtricitabina u odnosu na onu kod lamivudina. Povećanjem afiniteta vezivanja za HIV reverznu transkriptazu, povećana je efikasnost inkorporacije u DNK lanac HIV-a, dok je smanjen afinitet vezivanja za DNK polimerazu γ i time minimizirana pojava mitohondrijalne toksičnosti. HIV sojevi rezistentni na emtricitabin pokazuju otpornost i na lamivudin, kao posledicu tačkaste mutacije u genu za reverznu transkriptazu, izmene u kodonu 184 i zamene metionina valinom ili leucinom. Farmakokinetički profil emtricitabine je okarakterisan dugim vremenom eliminacije u plazmi što omogućava njegovu oralnu primenu jednom dnevno, neometanu unosom hrane. Apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta je brza, a bioraspodivnost dostiže 93%. Emtricitabin ne ostvaruje interakcije sa citohromom P450, pa prema tome, ima vrlo ograničen potencijal za interakciju sa istovremeno primenjenim lekovima koje metaboliše navedeni enzim. Najčešći neželjeni događaji koji se javljaju tokom terapije koja sadrži emtricitabin uključuju, glavobolju, dijareju, mučninu, osip, rinitis, kašalj i osećaj iscrpljenosti. Ovi neželjeni događaji su uglavnom blagog do umerenog intenziteta pa samo $\approx 1\%$ pacijenata prekida lečenje. Emtricitabin je komponenta preporučivanog početnog režima cART. Može se koristiti umesto lamivudina kao jedan od dva činioca NIRT okosnice u režimima zajedno sa NNRTI ili PI lekom. Štaviše, emtricitabin i tenofovir, poželjna su kombinacija koju pacijenti bolje tolerišu od ko-formulisanog lamivudina/zidovudina, a kombinacija ostvaruje i višu stopu postojanog virološkog odgovora (45).

1.2.2. Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze

Predstavnici ove grupe lekova su nevirapin, efavirenz, etravirin, rilpivirin i doravirin.

Za razliku od NIRT jedinjenja, NNIRT lekovi se alosterno vezuju za virusnu reverznu transkriptazu. Lek se vezuje da deo virusnog molekula udaljenog od aktivnog mesta, nazvanog NNIRT džep. Ostvarivanjem veze leka i džepa se stvara nova prostorna konfiguracija mesta vezivanja supstrata, pa enzim više nije u stanju da se veže za RNK (Slika 5) (35).



Slika 5. Mehanizam delovanja NNIRT lekova (46).

1.2.2.1. Nevirapin

Nevirapin je visokospecifičan inhibitor HIV-1 reverzne transkriptaze registrovan 1996. godine. Farmakokinetiku nevirapina karakteriše brza i skoro potpuna oralna apsorpcija, prilično ravnomerna distribucija u svim organima i tkivima i dugo poluvreme eliminacije. Kada se nevirapin doda u kulturu HIV-om inficiranih ćelija, potpuna supresija replikacija virusa može da se postigne u roku od 24 sata, što je u skladu sa inhibicijom ranog koraka u životnom ciklusu retrovirusa i korisno u borbi protiv akutne HIV infekcije. Nevirapin snižava nivo akumulacije slobodnocirkulišućih viriona HIV-a, što doprinosi kontroli prenosa HIV infekcije preko fizioloških tečnosti poput sperme, cervikovaginalnog sekreta, krvne plazme i majčinog mleka. Međutim, uzimajući u obzir da se nevirapin metaboliše aktivnošću enzima citokroma P450, istovremena primena sa drugim lekovima koji se takođe metabolišu ovim sistemom, može predstavljati izazov prilikom usklađivanja terapije. Nepogodna osobina nevirapina je i brz razvoj visokog nivoa rezistencije virusa (47).

1.2.2.2. Efavirenz

Naredni lek koji je registrovan kao inhibitor aktivnosti HIV polieraze vezivanjem za hidrofobni džep njene p66 subjedinice, bio je efavirenz, 1998. godine (48). Niske koncentracije efavirenta ($6.1 \mu\text{mol/L}$) su povezane sa virološkim neuspehom, dok previsoke koncentracije () često dovode do neurološke toksičnosti, prevažodno do poremećaja spavanja, halucinacija i pojava suicida (49). Farmakokinetiku efavirenta karakteriše značajna varijabilnost između ispitanika, koja utiče i na terapijski odgovor i na neželjene efekte. Glavni put metabolizma efavirenta je posredovan pretežno enzimom CYP2B6, ali i enzimima CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2 i CYP2A6. Lekovi koje HIV-om inficirani pacijenti koriste istovremeno sa efavirentom mogu negativno uticati na nivo efavirenta u krvi jer inhibiraju ili indukuju enzime koji metabolišu efavirenz, a, takođe, sam efavirenz indukuje sopstveni metabolizam

povećanjem ekspresije ili aktiviranjem nekih od ovih enzima i ulazi se u začarani krug. Polimorfizmi u humanim genima koji kodiraju enzime koji metabolišu efavirenz mogu takođe uticati na njegovu koncentraciju, pokazujući veliku varijabilnost u njegovim koncentracijama u plazmi koje se primećuju među pacijentima (50, 51).

1.2.2.3. Etravirin

Etravirin je NNIRT nove generacije. Odobren je za lečenje HIV-1 infekcije 2008. godine. Izuzetno je značajan u lečenju odraslih pacijenata koji se već duži vremenski period leče, ali kod kojih se i dalje odvija replikacija sojeva virusa otpornih na druge cART režime. Etravirin pokazuje efikasnost *in vitro* protiv većine divljih sojeva HIV-1, kao i protiv nekoliko sojeva otpornih na dostupne NNIRT. Predstavlja dobro podnošljiv tretman koji dovodi do poboljšanja virusoloških i imunoloških ishoda. Jedini neželjeni efekat izazvan tretmanom koji se javlja sa većom učestalošću je osip (52).

1.2.2.4. Rilpivirin

Rilpivirin je kao lek druge generacije NNIRT-a registrovan 2011. godine predstavljao novu opciju za pacijente koji su rezistentni na lekove prve generacije NNIRT-a. Po hemijskom sastavu diaril pirimidin, molekul rilpivirina je u odnosu na prvu generaciju imao veću fleksibilnost i konformaciono se bolje prilagođavao prilikom vezivanja za virusnu transkriptazu. Obe navedene osobine su doprinele boljoj aktivnosti i većoj potenciji leka. Virološki odgovor je dobar kod pacijenata, osim ukoliko dođe do indukovanja E138K i M184I mutacija. Rilpivirin se u velikoj meri metaboliše citohromom P450 3A4 i stoga je teoretski podložan interakcijama sa lekovima koji indukuju ili inhibiraju ovaj enzim, ali njegov uticaj na metabolizam drugih lekova se nije pokazao kao klinički relevantan. Značajne interakcije koje snižavaju iskoristivost rilpivirina, rilpivirin ostvaruje sa inhibitorima protonskih pumpi, H₂ blokatorima i antacidima. Da bi se postigla zadovoljavajuća iskoristivost rilpivirina, potrebno ga je uzimati uz obrok od 500 cal. Prijavljeni neželjeni efekti koji su se najčešće pojavljivali kod pacijenata koji su koristili rilpivirin su obuhvatali depresiju, glavobolju, nesanicu i osip, ali su se svi nabrojani efekti javljali kod malog procenta pacijenata ($\leq 4\%$) (53).

1.2.2.5. Doravirin

Doravirin je najnoviji NNRTI, registrovan 2018. godine. Dostupan je kao koformulisani režim jedne tablete koji uključuje lamivudin i TDF. Lek je odobren kao inicijalna terapija, ali i kao opcija za pacijente koji su virološki suprimirani na stabilnom cART režimu. U kliničkoj praksi, kada pacijenti koji dugo primaju terapiju ne mogu da postignu virološku supresiju, nije neuobičajeno da se lečenje nastavi nekim II lekom pojačanim sa PI, sa ili bez NIRT okosnice, a na osnovu obrazaca rezistencije i podnošljivosti. U okolnostima u kojima II režim pojačan sa PI treba izbegavati, kao kod pacijenata koji čekaju transplantaciju ili kod pacijenata sa interakcijama sa lekovima koje onemogućavaju upotrebu PI pojačivača, doravirin

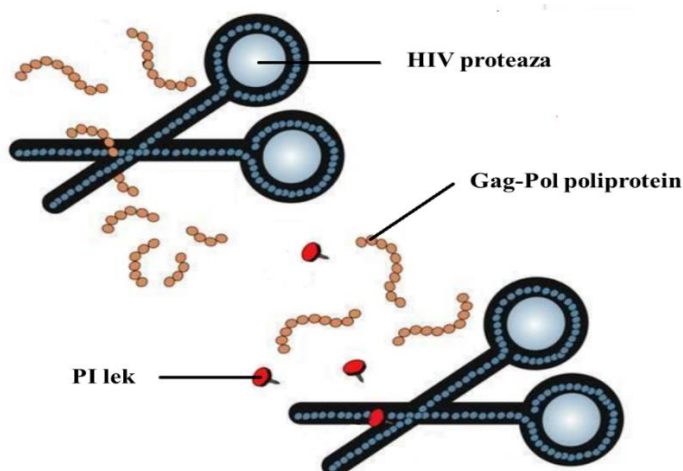
postaje dobra opcija. Upotreba doravirina je moguća i efikasna u prisustvu uobičajenih mutacija koje doprinose otpornosti na NNRTI, kao što su K103N, E138K i I181C. Međutim, ispitivanje koje je analiziralo 9764 uzorka je ukazalo na razvoj mutacija povezanih sa rezistencijom na doravirin. Prisustvo najmanje jedne mutacije koja dovodi do rezistentnosti na doravirin je identifikovana u 1,4% populacije. Najčešće mutacije su bile V108I (kod 0,6 % pacijenata), I188L (kod 0,2 % pacijenata), H221I (kod 0,2 %) i I318F (0,2 %). Što se neželjenih dejstava leka tiče, doravirin se generalno toleriše bolje od II i PI, a povećanje telesne težine i porast nivoa triglicerida u krvi je zapažen kod malog broja pacijenata (54).

1.2.3. Proteazni inhibitori

Lekovi iz grupe PI, poput sakvinavira, ritonavira, lopinavira, fosamprenavira, atazanavira, tipranavira i darunavira su inhibitori aktivnosti virusne proteaze koja učestvuje u sazrevanju HIV viriona u infektivnu virusnu česticu (55).

Virusne proteaze su pogodne mete za terapijsku intervenciju zbog njihove suštinske uloge u životnom ciklusu virusa. Kako bi HIV čestica sazrela i postala infektivna, neophodno je da dođe do cepanja Gag-Pol poliproteina (Slika 6). Ovu hidrolizu vrši HIV proteaza koja prethodno mora da se autoaktivira i oslobodi iz navedenog poliproteina. Kada HIV proteaza pocepa poliprotein, virus može da napadne novu ćeliju domaćina. Inhibicija HIV proteaze dovodi do stvaranja nezrelih neinfektivnih virusnih čestica. Inhibitori HIV proteaze prve generacije prvenstveno ciljaju aktivno mesto proteaze. Oni se reverzibilno vezuju za supstratni džep enzima, onemogućavajući vezivanje supstrata. Većina ovih inhibitora su peptidomimetici. Peptidomimetička struktura pri dizajnu ovih lekova je bila inspirisana Tir-Pro mestima cepanja koja se prirodno javljaju u Gag-Pol poliproteinu. Tir-Pro supstrati su atipični za proteaze sisara, tako da su inhibitori izvedeni iz Tir-Pro supstrata specifični za virusne proteaze, što smajuje njihovu reaktivnost sa proteolitičkim enzimima domaćina (21).

Evropski protokoli koji su dugo bili u praksi su često sugerisali upotrebu cART koja se sastoji iz leka koji pripada klasi IP, primenjenog zajedno sa ritonavinom, kao farmakokinetičkim pojačivačem, u kombinaciji sa dva leka iz klase NIRT kao preferiranim režimom prve linije ili jedan lek iz klase NNIRT sa dva NIRT, kao alternativnim režimom (56).



Slika 6. Mehanizam delovanja PI lekova (36).

1.2.3.1. Sakvinavir

Sakvinavir je pionir u grupi PI, registrovan kao prvi PI još 1995. godine. Sakvinavir ispoljava nisku bioraspoloživost usled nepotpune apsorpcije i ekstenzivnog metabolizma jer je supstrat transportera p-gp i citohroma CIP3A. Iz tog razloga, sakvinavir treba da se primenjuje istovremeno sa niskom dozom ritonavira. PI ritonavir je inhibitor oba jedinjenja, i p-gp i CIP3A4, što rezultira povećanom apsorpcijom i smanjenim metabolizmom sakvinavira. Aditivna ili sinergistička aktivnost je primećena *in vitro* kada se sakvinavir primenjuje sa inhibitorima reverzne transkriptaze i PI kao što su amprenavir, atazanavir i lopinavir. Sakvinavirova iskorišćenost je veća i kada se kombinuje sa sredstvima za redukciju želudačne kiseline. Primarne genotipske mutacije virusa koje rezultiraju smanjenom osetljivošću na sakvinavir uključuju G48V i L90M, ali javljaju se i brojne druge mutacije koje uključuju L10I/R/V, L24I, I54V/L, I62V, A71V/T, G73S, V77I, V82A/F/T/S i I84V. Uočene su i, do sada, nerazjašnjene razlike na polnoj osnovi koje se tiču farmakokinetike sakvinavira. Studije su pokazale da uzrok ne leži u različitim veličinama tela i telesnim masama, s obzirom da je klirens bio statistički značajno manji kod žena i nakon korekcije za telesnu težinu. Niža aktivnost CIP enzima kod žena se u jednoj studiji na malom broju ispitanika predlaže kao objašnjenje. Najčešće beleženi neželjeni efekti kod pacijenata koji su primali sakvinavir su gastrointestinalni poremećaji (kod 17 % pacijenata), bronhitis (kod 6 % pacijenata), dijareja (7 % pacijenata), mučnina (6 % pacijenata), glavobolja (2 %) i infekcije gornjeg respiratornog trakta (2 %). Prekid lečenja sakvinavirom usled neželjenih efekata iznosi oko 3 % (57).

1.2.3.2. Ritonavir

Ritonavir je uveden u upotrebu 1996. godine. Međutim, visoke doze ritonavira izazivaju snažne gastrointestinalne neželjene efekte. Ritonavir je potentan inhibitor 3A4 izoenzima jetrenog citokroma P450. Inhibicija navedenog citokroma blokira metabolizam mnogih lekova, uključujući inhibitore HIV proteaze, i na taj način dovodi do povećanja nivoa ovih lekova u plazmi (58). Iako predstavlja neželjeni efekat, ova pojava je dovela do razvoja nove klase jedinjenja, inhibitora citohroma P450 koji se mogu koristiti kao opšti "pojačivači" (tzv. busteri). Uloga pojačivača je da poboljšaju delovanje terapeutika sa kratkim poluživotom u serumu, uključujući i inhibitore HIV proteaze. Ritonavir je na ovaj način postao prvi farmakokinetički pojačivač (59).

1.2.3.3. Lopinavir

Na samom kraju XX veka, lopinavir/ritonavir postaje izuzetno efikasna koformulacija inhibitora proteaze koja se koristi protiv HIV infekcije. U ovom tandemu, lopinavir je odgovoran za supresiju virusnog opterećenja, dok je ritonavir farmakokinetički pojačivač. Novitet prilikom dizajna proteaznih inhibitora je bila sinteza asimetričnog jedinjenja sa perifernim funkcionalnim grupama, do tada neuobičajena strategija, koja je doprinela poboljšanju bioiskoristivosti leka i sprečavanju razvoja virusne rezistencije na lekove (60).

1.2.3.4. Fosamprenavir

Amprenavir je ušao u upotrebu kao deo terapije protiv HIV infekcije 1999. godine. Ovo jedinjenje je razvijeno na osnovu modifikovanih inhibitora renina. Da bi se poboljšala farmakokinetika, razvijen je hidrofилni fosfatni ester amprenavira, fosamprenavir, uveden u kliničku upotrebu 2003. godine, kao prolek. Tokom apsorpcije u crevima, fosamprenavir se pretvara u amprenavir pomoću fosfataza domaćina (61).

1.2.3.5. Atazanavir

Atazanavir, lek koji je registrovan 2003. godine, brzo se apsorbuje nakon oralne ingestije i dostiže maksimalnu koncentraciju u krvi za približno 2,5 sata. Oralna bioraspoloživost se kreće od 60% do 68%. Lek deluje kao supstrat za CYP3A4 i podleže biotransformaciji prvenstveno kroz monooksigenaciju i diooksigenaciju. Virološki odgovor na atazanavir kod pacijenata sa iskustvom u cART je pod uticajem tipa i broja prisutnih mutacija, od kojih je najznačajniji uticaj mutacije I50L. Pojačavanje atazanavira niskom dozom ritonavira povećava koncentraciju atazanavira u plazmi. Međutim, atazanavir bez pojačanja obezbeđuje manju supresiju virusa nego režim koji sadrži lopinavir/ritonavir pacijenata. Čak ni pri visokim koncentracijama atazanavira nije bilo pojačane citotoksičnosti u kombinaciji sa NIRT, NNIRT, PI, inhibitorima fuzije ili lekova koji se koriste kod pacijenata koinficiranih virusnim hepatitisom. Pokazane su farmakokinetičke interakcije između atazanavira i nekoliko lekova. Na primer, kod pacijenata koji su već bili u terapiji, ne preporučuje se istovremena primena efavirenza i ne treba koristiti inhibitore protonske pumpe. U kliničkim ispitivanjima, najčešći neželjeni efekti koje iskuse pacijenti na atazanaviru bili su osip, mučnina, žutica, dijareja i povišen ukupni bilirubin, imajući u vidu da se žutica i hiperbilirubinemija češće beleže kod pacijenata koji su primali atazanavir sa pojačivačem. U poređenju sa pacijentima koji upotrebljavaju druge PI, atazanavir izaziva manje promena u metabolizmu holesterola i triglicerida (62, 63).

1.2.3.6. Tipranavir

Naredni lek iz grupe PI koji je bio registrovan za lečenje HIV infekcije (2006. godine) je bio tipranavir. Pokazao je aktivnost protiv divljeg soja HIV-1 i protiv više mutiranih sojeva. Tipranavir zadržava aktivnost kod pacijenata sa iskustvom u lečenju, kod kojih je prisutan HIV sa velikim brojem akumuliranih mutacija povezanih sa otpornošću na PI. Prisustvo jedne ili dve takozvane „ključne mutacije” koje prvenstveno uključuju L33V/F, V82A/F/L/T, I84V i L90M često se povezuje sa smanjenom osetljivošću na sve trenutno dostupne PI, sa izuzetkom tipranavira. Istovremena primena sa malim dozama ritonavira značajno povećava koncentraciju tipranavira u plazmi. Tipranavir je supstrat i induktor izoenzima citokroma P450 3A4, tako da može stupiti interakcije sa drugim agensima koji su supstrati, induktori ili inhibitori ove porodice enzima. Što se tiče interakcija sa drugim cART lekovima, prijavljeni su slučajevi značajnih interakcija sa tipranavirom/ritonaviirom i drugim PI prilikom istovremene primene, ali ne i sa lekovima NNIRT, efavirenzom i nevirapinom. Profil štetnog dejstva tipranavira je sličan onome opisanom kod upotrebe drugih režima pojačanih PI i najčešće uključuje gastrointestinalne tegobe (64).

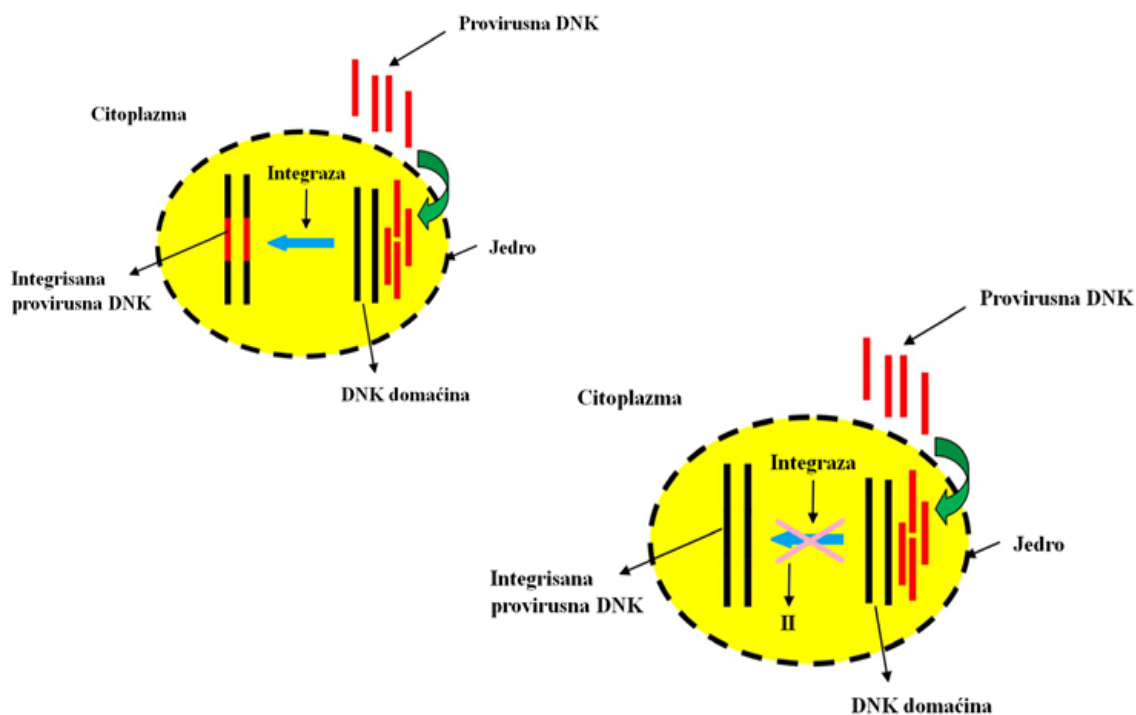
1.2.3.7. Darunavir

Najnoviji PI koji se koristi za lečenje HIV infekcije, darunavir, ima visoku genetsku barijeru protiv razvoja rezistencije i efikasan je protiv divljeg HIV soja, kao i HIV sojeva koji više nisu osetljivi na neke starije PI. Darunavir pojačan ritonaviro, kao komponenta cART, indikovani su za lečenje HIV-1 infekcije kod odraslih i pedijatrijskih pacijenata (starosti ≥ 3 godine), bez obzira da li su prethodno bili lečeni ili su naivni na tretman cART-om. Pojačani darunavir se generalno dobro podnosi, ali se mogu javiti gastrointestinalni poremećaji i abnormalnost u metabolizmu lipida (65).

1.2.4. Integrazni inhibitori

Raltegravir, dolutegravir, elvitegravir, biktegravir i kabotegravir inhibiraju aktivnost virusne integraze i tako onemogućavaju inserciju RNK virusa u humanu DNK (66).

Glavne globalne smernice u poslednjih nekoliko godina preferencijalno preporučuju prvu liniju cART koji se sastoji od osnovnog leka koji pripada klasi II u kombinaciji sa jednim ili dva NIRT (56, 67, 68). Lekovi iz klase II inhibiraju HIV-integrazu, enzim kodiran virusnim genomom, čija funkcija je da integriše svoj genom (u obliku dvolančane DNK) u genom ćelije domaćina. II inhibiraju proces transporta i insercije lanaca virusne DNK u domaćinove hromozome čime blokiraju stvaranje provirusa i širenje infekcije (Slika 7). II su izuzetno selektivni i jedini su lekovi koji se vezuju za dva mesta supstrata. Jedna veza se ostvaruje specifično sa kompleksom integraze i virusne DNK. Druga veza podrazumeva ostvarivanje interakcije leka sa dva esencijalna kofaktora, dva Mg^{+2} , u aktivnom mestu integraze. Odnosno, II se sastoje od farmakofora koji vezuje metal (sekvestriranje magnezijuma u aktivnom mestu integraze) i hidrofobne grupe koja interaguje sa virusnom DNK (35).



Slika 7. Mehanizam delovanja II lekova.

1.2.4.1. Raltegravir

Pre skoro dve decenije se pojavila nova klasa lekova, čiji mehanizam delovanja je bio potpuno drugačiji u odnosu na do tada dostupne antiretrovirusne lekove. Prvni integranski inhibitor koji se pojavio na tržištu je bio raltegravir, selektivni inhibitor integraze, HIV-1 specifičnog enzima koji je odgovoran za umetanje virusne komplementarne DNK u domaćinov genom. Oralnim putem uzet raltegravir se brzo apsorbira, sa prosečnom maksimalnom koncentracijom u plazmi koja se postiže u srednjem vremenu od >1 sat. Pacijenti koji su koristili raltegravir su pokazali značajno poboljšanje u virološkom i imunološkom odgovoru, procenjivanom nakon 16 i 48 nedelja od početka primene terapije. Nova terapija se generalno dobro podnosi, sa malom incidencom blagih do umerenih neželjenih efekata. Još jedna prednost raltegravira je bila u tome što ne utiče značajno na aktivnost citokroma P450 i stoga se ne očekuje interakcija sa drugim lekovima u sklopu cART koji su supstrati za ove enzime. Lek je pokazao dobru efikasnost kod pacijenata sa iskustvom u lečenju HIV infekcije otporne na više drugih, prethodno primenjenih, režima cART, međutim, vremenom su ipak otkrivene mutacije unutar HIV gena za integrazu (pretežno K148, N155 ili I143) za koje se pokazalo da su u korelaciji sa virusnom rezistencijom na raltegravir (69).

1.2.4.2. Dolutegravir

Broj zemalja koje su usvojile dolutegravir kao deo antiretrovirusne terapije prve linije se tokom godina stalno povećavao. Od 2020. godine 116 zemalja je usvojilo dolutegravir kao deo terapije prve linije za odrasle i adolescente, 87 zemalja je prijavilo usvajanje dolutegravira kao dela antiretrovirusne terapije druge linije za odrasle i adolescente. Režimi koji sadrže dolutegravir su usvojeni kao preferirana opcija na samom početku lečenja odojčadi i dece u 69% (79 od 114) zemalja koje učestvuju u izveštavanju SZO-a. Od navedenih zemalja je njih 33% usvojilo upotrebu dolutegravira samo za decu težine više od 20 kg (26 od 79), dok preostale zemlje preporučuju dolutegravir kao poželjnu opciju na početku lečenja za svu decu stariju od četiri nedelje i težine više od 3 kg (53 od 79), što predstavlja povećanje od 126% u odnosu na 35 zemalja u 2020. godini (70).

Kombinacija dolutegravira sa abakavirom/lamivudinom ili tenofovir dizoproksil fumaratom/emtricitabinom se pokazala kao pogodan režim koji se primenjuje jednom dnevno i ima visoku barijeru ka razvoju rezistentosti virusa. Dolutegravir se lako apsorbira nakon oralne primene, a srednja maksimalna koncentracija se u krvi postiže između 0,5 i 2,5 h posle doze. Dok se mnogi antiretrovirusni lekovi metabolišu putem citokroma P450 3A (CYP3A), dolutegravir se metaboliše glukuronidacijom enzima faze II i ima manje toksičan mehanizam eliminacije metabolita (71). Praćenje pacijenata na dolutegraviru posle 3 i 6 meseci terapije je pokazalo da se broj od <50 kopija HIV RNK /mL plazme postiže kod 79,8% i 91,7% pacijenata, respektivno, dok je mesečna stopa oporavka brojs CD4+ T-ćelija bila 28 ćelija/L (72). Dolutegravir je postao najčešće primenjivan antiretrovirusni lek na globalnom nivou zahvaljujući svojoj efikasnosti i bezbednosti, ističući klasu INSTI kao superiornu za lečenje pacijenata sa HIV infekcijom koji prethodno nisu bili lečeni (73).

1.2.4.3. Elvitegravir

In vitro, dokazan je aditivni efekat elvitegravira, registrovanog 2014. godine, kada se koristi u kombinaciji sa drugim antiretrovirusnim lekovima, uključujući lekove iz klase NNIRT

kao što su etravirin, nevirapin i efavirenz, raznim PI, zatim II raltegravinom, kao i inhibitorom fuzije enfuvirtidom i antagonistom ko-receptora CCR5, maravirokom. Interakcija između elvitegravira i NIRT lekova emtricitabina i tenofovira je pokazao sinergistički efekat. Iako su rezultati studije, koja je pratila pacijente tokom 144 nedelje terapije elvitegravinom, dokazali virološku supresiju tokom 144 nedelje, smatra se da je genetska barijera otpornosti relativno niska. Pojava određenih supstitucija amino kiselina unutar HIV-1 integraze može izmeniti osetljivost virusa na lek. Najčešće zamene povezane sa rezistencijom na elvitegravir uključuju T66I, E92K i K148R, za koje se in vitro pokazalo da rezistenciju povećavaju čak 37, 63 i 240 puta, respektivno. Ostale zamene koje se razvijaju tokom primene elvitegravira uključuju H51I, F121I, S147G, S153I, E157K i R263K. Nabrojane supstitucije aminokiselina u HIV-1 integrazi mogu smanjiti osetljivost na elvitegravir kroz različite mehanizme, poput pojava steričnih smetnji usled prostornih promena unutar molekula, promena šarže, izmena u strukturnoj konformaciji i izmenjenog profila vezivanja magnezijuma. Elvitegravir pokazuje minimalnu citotoksičnost i ne inhibira humane topoizomerase I i II. Oralni elvitegravir se generalno dobro toleriše kada se koristi do 96 nedelja u kombinaciji sa pojačanim ritonavinom. Neželjene reakcije koje su bile najčešće tokom upotrebe elvitegravira su dijareja (7,1%) i mučnina (4,0%) (74).

1.2.4.4. Biktegravir

Biktegravir je II registrovan 2018. godine i predstavlja lek sa visokom genetskom barijerom za razvoj otpornosti na HIV-1. Lek je ko-formulisan sa lekovima iz NIRT klase, emtricitabinom i TAF-om. Primena ove formulacije je efikasna u uspostavljanju virološke supresije kod odraslih, generalno se dobro podnosi, ispunjava zahteve antiretrovirusnog režima za pacijente sa koinfekcijom virusom hepatitisa B i ne zahteva prethodno testiranje na HLA-B*5701, što ga čini pogodnijim brzo otpočinjanje lečenja. Formulaciju pacijenti generalno dobro podnose, a neželjeni efekti se javljaju ređe nego kod terapija koje uključuju dolutegravir (75).

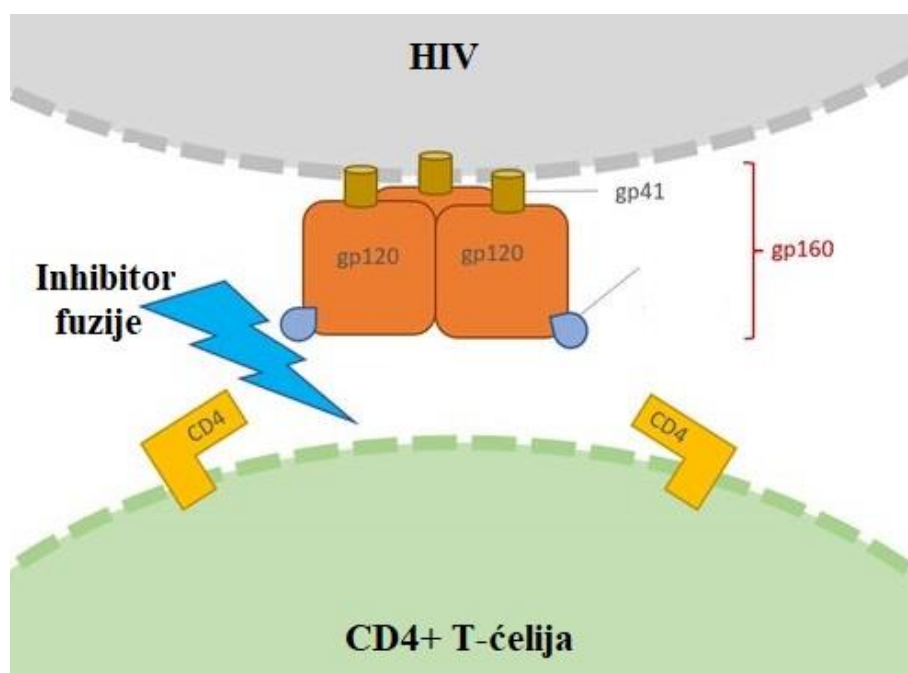
1.2.4.5. Kabotegravir

Kabotegravir je snažan II sa hemijskom strukturom sličnom dolutegraviru, predstavnik druge generacije II, registrovan za upotrebu 2021. godine. Predstavlja suspenzija za injekcije sa produženim oslobađanjem. Pokazao je efikasnost i u profilaksi pre izlaganja i u lečenju HIV infekcije. Pretkliničke i kliničke studije su dosledno pokazale da se kabotegravir lako apsorbuje nakon intramuskularne i subkutane primene, sa poluzivotom eliminacije od približno 40 dana, što dozvoljava retko doziranje, jednom mesečno ili jednom u dva meseca. Kabotegravir ne stupa u klinički značajne interakcije sa drugim lekovima, slabo je rastvorljiv u vodi, sporo se metaboliše i ima visoku tačku topljenja. Dobro penetrira u različita tkiva, distribuirajući se u pluća, jetru, bubrežnu i nadbubrežnu srž, ali je prodor u mozak ograničen. Genetska barijera rezistentnosti virusa na kabotegravir je visoka. Neželjeni efekti se uglavnom odnose na reakcije na mestu ubrizgavanja (76).

1.2.5. Inhibitori fuzije

Predstavnici klase lekova inhibitora fuzije su enfuvirtid i fostemsavir.

Uprkos velikom broju dostupnih antiretrovirusnih lekova, postoji stalna potreba za pronalaženjem novih klasa lekova koji ciljaju različite stadijume virusne replikacije, prvenstveno zbog razvoja rezistencije na postojećee lekove i dostizanjem poboljšanih bezbednosnih profila i podnošljivosti u poređenju sa trenutno dostupnim tretmanima. Ulazak HIV-1 u ćelije domaćina odvija se kroz više koraka koji zahtevaju interakciju virusnog omotača sa dva ćelijska receptora na sekvencijalni način (Slika 8). Šiljkovi omotača virusa se sastoje od trimera gp120 spoljašnjeg glikoproteina koji su nekovalentno povezani sa gp41 transmembranskim glikoproteinom. Vezivanje šiljka za receptor domaćina rezultira konformacionim promenama u gp120 koje formiraju mesto vezivanja ko-receptora ćelije domaćina. Vezivanje ko-receptora koje sledi, dovodi do daljih konformacionih promena koje kulminiraju gp41 posredovanom fuzijom membrana. Protein gp120 je veoma dinamičan, prolazi kroz višestruke konformacione promene i pre i posle vezivanja za CD4 receptor domaćina. Inhibitori fuzije “zaključavaju” gp120 u zatvoreno stanje koje onemogućava konformacione promene neophodne za početnu interakciju između virusa i površinskih receptora CD4 receptora, čime se sprečava vezivanje i naknadni ulazak u imunske ćelije domaćina (77).



Slika 8. Mehanizam delovanja inhibitora fuzije (78).

1.2.5.1. Enfuvirtid

Subkutano apliciranje enfuvirtida, kao dodatak optimizovanom osnovnom cART režimu poboljšalo je virološki i imunološki odgovor kod HIV-om inficiranih pacijenata u dva opsežna i više pratećih ispitivanja koja su usledila, što je dovelo do registracije leka 2003. godine. Presek sproveden u 24. i 48. nedelji tretmana enfuvirtida u kombinaciji sa optimizovanom cART je dovela do značajnog smanjenja virusnog opterećenja i povećanja

broja CD4+ T-ćelija u poređenju sa istom optimizovanom cART, ali bez enfuvirtida. Enfuvirtid je mali molekul, peptid koji se sastoji od 36 aminokiselina, koji ispoljava sličnu aktivnost protiv različitih sojeva HIV-a i sinergično dejstvo u kombinaciji sa raznim antiretrovirusnim lekovima *in vitro*. Otpornost HIV-a na enfuvirtid prvenstveno je povezana sa mutacijama u genu koji kodira gp41, dok unakrsna rezistencija na enfuvirtid nije povezana sa unakrsnom otpornošću virusa na druge antiretrovirusne lekove. Enfuvirtid se generalno dobro podnosi. Prijavljivani slučajevi pneumonije i limfadenopatije, a jedini neželjeni efekat koji je prijavljivan izuzetno često (kod 98 % ispitanika) se odnosio na reakciju na mestu ubrizgavanja, iako je retko (kod 4,4 %) predstavljao ograničavajući factor za nastavak tretmana. Interesantno je da je do ukupno manje neželjenih efekata dolazilo ukoliko se primenjivao enfuvirtid uz cART u odnosu na primenu samo identične cART, bez enfuvirtide (79).

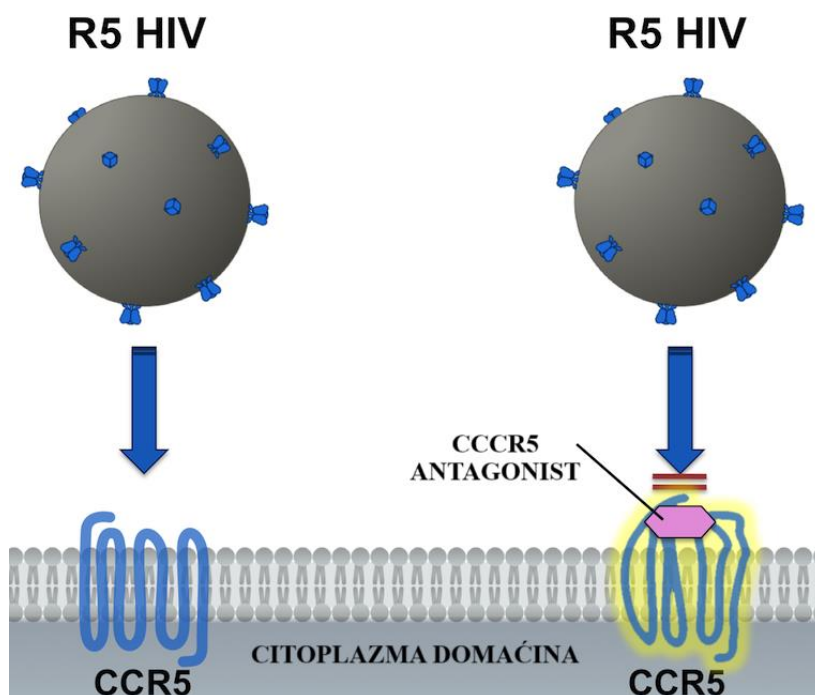
1.2.5.2. Fostemsavir

Fostemsavir, registrovan 2020. godine, razvijen je posebno za upotrebu kod pacijenata sa HIV-1 infekcijom otpornom na više prethodno primenjivanih cART režima, sa ograničenim mogućnostima u odabiru narednih terapijskih režima. Pored toga, fostemsavir se može koristiti bez obzira na tropizam HIV-a. Fostemsavir je prolek temsavira, derivata piridina, sa snažnom aktivnošću protiv HIV-1. Vezuje se direktno za virusni gp120, blizu njegovog mesta vezivanja za CD4+ T-ćelije. HIV-om inficirani pacijenti koji su primali monoterapiju fostemsavirom imali su značajno veći pad nivoa HIV-1 RNK od onih koji su primali placebo tokom prvih 8 dana ispitivanja. Svi pacijenti koji su učestvovali u ispitivanju su iscrpili sve dostupne odobrene lekove u najmanje četiri klase antiretrovirusnih lekova i imali su nizak broj CD4+ T-ćelija. Efikasnost u održavanju broja kopija HIV RNK i CD4+ T-ćelija je održana tokom 48 nedelja. Treba istaći i da je praćenje rezultata kombinovane terapije sa fostemsavirom, raltegravirom i TDF pokazalo da je primenjeni režim imao povoljan bezbednosni profil i efikasnost i tokom 192 nedelje. Pošto se apsorpcija temsavira ne menja sa povećanim pH želuca, pacijenti mogu da uzimaju agense za suzbijanje kiseline tokom terapije fostemsavirom. Temsavir se primarno metaboliše hidrolizom, ali i oksidacijom citohromom P-450, te je istovremena primena fostemsavira sa jakim induktorima citohtoma CYP3A kontraindikovana jer može dovesti do značajno niže izloženosti temsaviru, što na kraju može umanjiti virološki odgovor. Fostemsavir ne pokazuje *in vitro* unakrsnu rezistenciju sa drugim klasama antiretrovirusnih lekova. Najčešće neželjene reakcije povezane sa upotrebom fostemsavira uključuju mučninu, dijareju, glavobolju, bol u stomaku, dispepsiju, umor, osip i poremećaj sna (80, 81).

1.2.6. Antagonisti CCR5 receptora

HIV-1 ulazi u ciljne ćelije vezujući svoj glikoprotein membrane, gp120, za CD4 receptor i/ili koreceptore kao što su CCR5 i CXCR4 (Slika 9). CCR5 se eksprimira u nekoliko tipova ćelija, uključujući T-ćelije, dendritske ćelije i leukocite. Važnost CCR5 u infekciji HIV-om je dokazana studijama koje pokazuju da delecija dužine 32 bp u genu za CCR5 dovodi do otpornosti na HIV-1 infekciju ili sporijeg napredovanja do AIDS-a. Nakon neuspešnih sinteza nekoliko molekula, sintetisan je molekul oznake UK-107,543 koji je nizom modifikacija koje su doprinele potentnijem vezivanju za CCR5, efikasnijoj antiretrovirusnoj aktivnosti, apsorpciji, farmakokinetici i selektivnosti, pod nazivom maravirok registrovan 2007. godine kao jedini antagonista CCR5 receptora. Maravirok je umereno lipofilan, što povećava njegovu sposobnost prodiranja kroz lipidne membrane. Zahvaljujući ovom svojstvu, maravirok se

distribuirana širom organizma, pa i u cervikovaginalnu, semenu i cerebrospinalnu tečnost. U navedenim tečnostima održava nedetektabilni HIV-status i doprinosi smanjenju prenosa HIV-infekcije seksualnim putem. Takođe, povoljno utiče na broj T-ćelija. Snažno inhibira CCR5 signalizaciju i ne dovodi do internalizacije CCR5, što sugerira da je funkcionalni antagonist CCR5 molekula. Metabolizira se pomoću CYP3A4 i CYP3A5 enzima. CYP3A5 je uključen u oksidativni metabolizam maraviroka i sugerirano je da genski polimorfizmi CYP3A5 gena mogu uticati na farmakokinetiku maraviroka (82).



Slika 9. Mehanizam delovanja CCR5 antagonista (83).

Međutim, mogućnost upotrebe CCR5 antagonista zavisi od poznavanja HIV podtipa osobe. Postoje tri podtipa HIV-a u odnosu na tip vezivanja za koreceptor domaćina: R5 HIV (vezuje se samo za CCR5 koreceptor); Ks4 HIV (vezuje se samo za CKSCR4 koreceptor) i mešoviti R5/Ks4 HIV (vezuje se za CCR5 ili CKSCR4 koreceptor). CCR5 antagonisti se vezuju samo za CCR5 koreceptor, uzrokujući njegovu konformacionu promenu koja sprečava da se za njega veže HIV protein gp120. Antagonisti CCR5 ne blokiraju efikasno ulazak Ks4 HIV tipa u ćeliju, tako da nisu efikasni ni kod mešovitog tipa, pa se maraviroc prepisuje nakon testiranja, samo osobama koje imaju potvrđeno prisustvo samo čistog R5 HIV tipa (84).

1.2.7. Farmakokinetički pojačivači

PI su među najpotentnijim antiretrovirusnim lekovima, ali se brzo metabolišu pretežno citohromom P450 CYP3A, što može dovesti do snižene sistemske iskorišćenosti. Da bi se povećala njihova izloženost i smanjila verovatnoća razvoja rezistencije, PI se obično koriste u kombinaciji sa malim dozama ritonavira, inhibitorom citohroma CYP3A. Ova tehnika je poznata kao "farmakokinetičko pojačavanje" ili "bustovanje", a takođe se može koristiti i za povećanje izloženosti drugih antiretrovirusnih lekova, kao što su inhibitori integraze. Međutim, pojačavanje sa ritonavirima ima svoja ograničenja. Ritonavirova inhibicija citohroma CYP3A

nije selektivna i može da izazvati aktivnost drugih enzima koji metabolišu lekove, što dovodi do brojnih neželjenih interakcija sa drugim lekovima. Takođe, upotreba ritonavira može biti praćena metaboličkim i gastrointestinalnim neželjenim efektima. Shodno tome, ispitivani su alternativni inhibitori citohroma CYP3A. Kobicistat je registrovan 2014. godine i predstavlja selektivni vremensko i koncentracijski-zavistan CYP3A inhibitor bez intrinzične anti-HIV aktivnosti. Uzimajući u obzir snažnu inhibiciju citohroma CYP3A od strane kobicistata, njegova istovremena primena sa lekovima koje metaboliše navedeni citohrom, može dovesti do povećanja koncentracije tih istovremeno primenjenih lekova u plazmi. Odnosno, pošto se kobicistat uglavnom metaboliše pomoću CYP3A, koncentracije kobicistata u plazmi se mogu povećati ili smanjiti nakon istovremene primene sa CYP3A inhibitorima ili induktorima, respektivno. Apsorpcija kobicistata je brza nakon oralne primene, a maksimalna koncentracija u plazmi se dostiže posle četiri sata. Njegova selektivnost doprinosi predvidivosti interakcija sa drugim enzimima i lekovima, a citotoksičnost je minimalna. U odnosu na ritonavir, kobicistat manje remeti funkcije adipocita, uključujući akumulaciju lipida i insulinom stimulisan unos glukoze, ali više doprinosi povećanju vrednosti kreatinina u serumu. In vitro, kobicistat interaguje sa transporterima u proksimalnim bubrežnim tubulama, što može pomoći u razjašnjavanju uticaja čela na nivo kreatinina u serumu (85).

1.2.8. Strategije lečenja i profilaksa

cART suprimira replikaciju HIV-a u najvećem delu organizma obolele osobe ometajući nekoliko ključnih faza životnog ciklusa virusa i smatra se efikasnom kada je prisutnos HIV-a manja od 50 kopija HIV RNK/ml plazme (86). Koncentracija HIV-a u plazmi može da opadne i do približno 99% u prve dve nedelje lečenja zahvaljujući brzom eliminaciji slobodnog virusa i gubitkom inficiranih ćelija. Procenjeno je da bi bilo potrebno 2,3 - 3,1 godine terapije koja potpuno inhibira umnožavanje virusa da bi se eliminisao HIV iz cirkulacije. Da bi se HIV potpuno eliminisao iz organizma, potrebno bi bilo još duže lečenje zbog postojanja poznatih, ali i neotkrivenih odeljaka u organizmu do kojih terapija ne dospeva (87).

U organizmu se formiraju anatomske rezervoari u kojima se virus i dalje replikuje jer se antiretrovirusni lekovi ne mogu uspešno transportovati kroz sve tkivne barijere, te je HIV-infekcija hronično prisutna u organizmu (88). HIV dospeva u centralni nervni sistem (CNS) rano nakon infekcije, uglavnom preko monocita, i širi se prvenstveno na intraparenhimske mononuklearne fagocite i astrocite. Nastaje rezervoar latentne infekcije jer većina lekova u sklopu cART slabo penetrira u CNS. HIV infekcija i inflamacija mozga se nastavljaju bez obzira što se cART i dalje primenjuje (89). Limfoidno tkivo je ključni rezervoar za održavanje perzistentnosti HIV infekcije. Ovo tkivo je mesto u kome HIV može da nastavi da se replicira tokom akutne infekcije. Dok cART efikasno suzbija replikaciju virusa u većini drugih tkiva i koncentraciju virusne RNK u krvi snižava ispod detektibilnog nivoa, terapija ne suprimira u potpunosti replikaciju virusa u rezervoarima limfoidnog tkiva jer su koncentracije lekova nedovoljne da u potpunosti zaustave umnožavanje virusa. Kontinuitano umnožavanje virusnih čestica i inficiranje ćelija u limfoidnom tkivu je prepreka za funkcionisanje imunog sistema, a takođe, i pretnja da se cirkulacijom infekcija proširi na druga tkiva. Uzimajući u obzir da cART ne dostiže klinički efikasne koncentracije u limfoidnom tkivu, postizanje optimalne ćelijske farmakokinetike i prostorne distribucije antiretrovirusnih lekova u tkivu, radi potpunog suzbijanja replikacije virusa i očuvanja imunološke funkcije je, stoga, preduslov za eliminaciju virusnog rezervoara i, konačno, izlečenja HIV infekcije (33).

Ukupno 99 zemalja u svetu je usvojilo preporuke Svetske zdravstvene organizacije (SZO) da se istog dana kada se dijagnostički potvrdi HIV infekcija, započne antiretrovirusna

terapija, što je povećanje od 46% u broju zemalja u odnosu na 2020. godinu (70). Strategija nazvana “*Test and treat*”, u praksu uvedena 2009. godine, ima za cilj smanjenje stope širenja HIV-infekcije (90).

150 od 165 zemalja članica SZO koje vrše monitoring HIV infekcije (91%) su već usvojile preporuke SZO o profilaksi pre izlaganja (PrEP) i uvrstili strategiju u svoje nacionalne smernice. Preostalih 15 zemalja ne preporučuju nikakav PrEP u okviru svojih smernica (70).

U smernicama za HIV iz 2016. godine, SZO je preporučila oralni PrEP koji sadrži tenofovir kao dodatno sredstvo prevencije za osobe koje su izložene značajnom riziku od HIV infekcije. Smernice su sastavljene na osnovu ispitivanja sprovedenog kod serodiskordantnih heteroseksualnih i homoseksualnih parova i osoba koje intravenski koriste psihoaktivne supstance čiji rezultati su ukazali na značajan nivo efikasnosti pomenute prevencije. Dalje, SZO je 2017. godine proširila preporuke o PrEP na trudnice i dojilje, da bi 2018. godine objavila izveštaj u kome se konstatuje da se tenofovir može zameniti emtricitabinom i lamivudinom (27).

Što se profilakse posle izlaganja (PEP) tiče, prve sistematizovane smernice su 2014. godine imale za cilj da se PEP preporučuje tako da obuhvata lekove koji su dostupni zemljama sa niskim i srednjim prihodima. Proširene smernice koje je 2016. godine SZO formulisala su obezbedile podatke o propisivanju i doziranju terapije na osnovu kliničkih studija sprovedenih posle poštovanja prvih smernica. Dve godine kasnije, preporuke su preformulisane uzimajući u obzir podatke o novim dostupnim lekovima, sa naglaskom na korišćenju dolutegravira (27).

Zdravstveni problemi koji mogu biti u vezi sa primenjenim lekovima postaju važan izazov u dugoročnom lečenju HIV-pozitivne populacije. Izazovi uključuju polifarmaciju i veći rizik od neželjenih interakcija lekova. Antiretrovirusni lekovi mogu da stupe u interakciju sa komedikamentima koje se koriste za lečenje komorbiditeta, odnosno, mogu imati inhibitorno dejstvo na enzime koji metabolišu istovremeno primenjene lekove ili na transportere lekova, a navedeno može dovesti do toksičnosti leka ili gubitka njegove efikasnosti. Obrnuto, komedikamenti mogu ometati apsorpciju antiretrovirusnih lekova i na taj način kompromitovati njihovu efikasnost.

Hronična inflamacija uzrokovana stalnim prisustvom virusa i kumulativna toksičnost uzrokovana cART-om dovode do progresivnih metaboličkih i fizioloških promena u organizmu. Pojava ovih promena potencijalno je povezana sa ubrzanim procesom starenja kod osoba sa HIV -infekcijom. Fokus moderne terapije treba da bude orijentisan na dugoročno održavanje organizma u dobrom zdravstvenom stanju, održavanje dobrog kvaliteta života i brigu o multimorbiditetu (3).

1.3. Komorbiditeti i multimorbiditeti kod pacijenata sa HIV infekcijom

Kod HIV-om inficiranih osoba se primećuje raniji početak neinfektivnih komorbiditeta povezanih sa starenjem, kao što su poremećaj lipidnog statusa, neurokognitivna oboljenja, učestalije fature kostiju, hipertenzija, dijabetes, oboljenja bubrega, itd. Nekoliko studija je pokazalo da osobe koje žive sa HIV-om imaju veću prevalenciju multimorbiditeta i komorbiditeta u poređenju sa opštom populacijom zbog preranog starenja, neželjenih efekata cART-a i bioloških efekata HIV infekcije. Broj starijih odraslih osoba (starih preko 50 godina) koji žive sa HIV-om raste na globalnom nivou, što prirodno dovodi do povećanja prevalencije komorbiditeta povezanih sa HIV-om, ali i starenjem. Uzrok povećanja je najvećim delom

posledica ranijeg početka primene cART-a u poređenju sa erom pre sprovođenja „Testiraj i leči“ pristupa, što je poboljšalo šanse za preživljavanje HIV-om inficirane populacije. Pored toga, prijavljeno je da se HIV infekcija javlja kod osoba u starijoj dobi nego ranije, a kod takvih osoba su se pred HIV infekciju možda već razvile izvesne nezarazne bolesti (91).

1.3.1. Lipodistrofija

Lipodistrofija je čest komorbiditet koji se javlja kod ljudi koji žive sa HIV-om i koriste antiretrovirusnu terapiju. Starenjem dolazi do preraspodele masnog tkiva tako da se gube potkožni depoi na račun povećanja visceralne masti i gubi se masno tkivo lica, a u samom masnom tkivu se javljaju proinflammatory promene. Iste promene, karakteristične za starije osobe, u masnom tkivu koje uključuju perifernu lipoatrofiju (tj. gubitak potkožnog masnog tkiva na licu, rukama i nogama), često povezanu sa lipohipertrofijom visceralne komponente, i povišene koncentracije proinflammatory citokina se javljaju i kod ljudi koji žive sa HIV infekcijom. Povišeni nivoi p53 i p16 proteina i mitohondrijalna citotoksičnost u masnom tkivu su povezani sa upotrebom antiretrovirusnih lekova. Usled navedenih promena, povećava se kardiovaskularni rizik i dolazi do promena u funkcionisanju metabolizma masti. Promene u distribuciji masti se mogu zadržati kod pacijenata koji su primali analoge timidina i nekoliko godina nakon prekida terapije. Odrasli koji su kao mladi bili inficirani HIV-om i izloženi antiretrovirusnim lekovima starije generacije posebno su osetljivi na lipoatrofiju koja može da se zadrži dugo po prekidanju terapije. Lekovi u sklopu cART su povezani sa dislipidemijom koja povećava rizik od pojave kardiovaskularnih oboljenja dva do četiri puta u odnosu na HIV-omneinficirane osobe. Proteazni inhibitori mogu negativno uticati na diferencijaciju adipocita, dok inhibitori reverzne transkriptaze i HIV proteini mogu biti represori adipogeneze (92). Kod osoba koje žive sa HIV infekcijom je dokazana smanjena autofagija u masnom tkivu koja po parametrima odgovara autofagiji u masnom tkivu starih osoba (93).

1.3.2. Dijabetes

Povećani rizik razvoja insulinske rezistencije je kod HIV-om inficiranih osoba povezan sa pojavom mitohondrijalne disfunkcije, povećanim volumenom cirkulišućih slobodnih masnih kiselina, povećanom akumulacijom masti u mišićima i organima i povećanim nivoom proinflammatory jedinjenja u cirkulaciji. Riziku od poremećaja u metabolizmu glukoze doprinosi i primena cART, pogotovo lekova iz klase PI, kao što su darunavir i ritonavir. Navedeni lekovi izazivaju insulinsku rezistenciju i nižu proizvodnju insulina ometajući receptore za apsorpciju glukoze, posebno transporter glukoze tipa 4 (94).

1.3.3. Hipertenzija

Prevalencija hipertenzije kod HIV-om inficiranih osoba je značajno porasla prethodnih godina i bila je u velikoj meri povezivana sa povećanjem kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta. U poređenju sa HIV-om neinficiranim osobama, HIV-om inficirani pacijenti koji koriste cART su podložniji razvoju hipertenzije. Nekoliko viroloških faktora i faktora

povezanih sa lečenjem ima ulogu u patofiziologiji hipertenzije kod HIV infekcije, uključujući hroničnu upalu, rekonstituciju imuniteta i lipodistrofiju. Nabrojana stanja direktno ili indirektno utiču na simpatički nervni sistem i renin-angiotenzin-aldosteron sistem. U literaturi, upotreba određenih režima u sklopu cART, takođe, je povezana sa izmenjenim metabolizmom lipida, povećanjem telesne težine i ubrzanom aterosklerozom koja dovodi do hipertenzije kod HIV-om inficiranih pacijenata. Mehanizam dolutegravira u povećanju težine pacijenata i riziku od hipertenzije je nepoznat, ali smatra se da razlog može biti ometanje hipotalamičke kontrole unosa hrane i održavanja energetske homeostaze preko signalnog puta melanokortina, odgovornog regulaciju unosa hrane i metaboličke energetske ravnoteže kod sisara. Pored toga, dolutegravir je povezan i sa izmenjenom distribucijom i formiranjem depoa masnog tkiva. Drugi faktori koji sinergistički povećavaju rizik i pogoršavaju postojeću hipertenziju uključuju starenje HIV-om inficirane populacije, imunološku aktivaciju, nivo viremije, i gojaznost (95).

1.3.4. Kardiovaskularne bolesti

Stopa incidencije kardiovaskularnih oboljenja je kod HIV-om inficiranih pacijenata za 21% visa u poređenju sa opštom populacijom. Široko je rasprostranjeno mišljenje da ateroskleroza kod HIV-om inficiranih osoba može biti povezana sa delovanjem prokoagulanasa i proinflamatornih mehanizama uključenim u postizanje imunosupresije, sa štetnim virusnim efektima na endotelne i druge ćelije, sa štetnim metaboličkim efektima određenih cART agenasa i visokom prevalencijom upotrebe psihoaktivnih supstanci među HIV-pozitivnim osobama (96).

1.3.5. Metabolički sindrom

Metabolički sindrom obuhvata skup faktora rizika koji dovode do pojave kardiovaskularnih bolesti kao primarnog kliničkog ishoda i doprinose većem riziku od razvoja dijabetesa. Takvi faktori uključuju gojaznost, poremećen metabolizam glukoze (dijabetes, poremećena tolerancija glukoze ili poremećena glikemija natašte), povišen krvni pritisak, povišen nivo triglicerida i nizak nivo lipoproteina visoke gustine. Bez obzira na kardiovaskularne ishode, smatra se da su osobe sa metaboličkim sindromom podložnije nizu stanja uključujući neke vrste kancera, sindromu policističnih jajnika i astmi (97).

Nekontrolisana replikacija HIV-a, koinfekcije (npr. sa virusom hepatitisa C) i cART doprinose metaboličkim oboljenjima. Prevalencija metaboličkih bolesti porasla je u poslednjoj deceniji i dovedena je u vezu sa uvođenjem cART. Očekuje se nastavak porasta u narednih nekoliko godina budući da korisni efekti cART-a omogućavaju lečenoj populaciji da doživi starost. Prevencija ili upravljanje metaboličkim bolestima kod osoba inficiranih HIV-om često uključuje polifarmaciju, što povećava rizik od neoptimalne adherencije i stoga može ugroziti kontinuitet efikasnosti cART-a. Pored toga, treba pažljivo razmotriti moguće interakcije lekova u sklopu cART-om i lekova kojima se tretiraju metabolička oboljenja (98).

1.3.6. Neurokognicija

Procenjuje se da 20-70% HIV-om inficiranih osoba bude pogođeno neurokognitivnim poremećajima. Kada se cART uvede u protocol lečenja, uglavnom dolazi do poboljšanja

neurokognitivnog stanja pacijenata, međutim, usled neurotoksičnog delovanja produkata metabolizma cART, određeni procenat pacijenata oseti pogoršanje. Smatra se da pogoršanja mogu biti i posledica HIV replikacije u centralnom nervnom sistemu, usled suboptimalnog prodiranja cART-a kroz krvno likvornu barijeru (96).

1.3.7. Bolesti bubrega

Oboljenja bubrega koja se obično javljaju kod HIV-om inficiranih pacijenata su posledica oportunističkih infekcija, imunog odgovora organizma na HIV i toksičnih efekata cART (99). Tenofovir je povezan sa gubljenjem fosfata, Fankonijevim sindromom, tubularnom nekrozom i akutnim otkazivanjem bubrega kada se primenjuje sa nesteroidnim antiinflamatornim lekovima i sa smanjenom renalnom funkcijom kada se primenjuje sa lopinavirom (96). Prevalenca i incidence oboljenja bubrega povezanih sa starenjem i metaboličkim uzrocima postaju sve više u populaciji HIV-om inficiranih pacijenata i prisutnije su kod ovih pacijenata u odnosu na opštu populaciju (100).

1.3.8. Osetljivost kostiju

Prevalencija preloma kostiju je za 67 % povećana kod HIV-om inficiranih osoba u poređenju sa HIV-om neinficiranim osobama, dok je rizik od razvoja osteoporoze kod HIV-om inficiranih osoba trostruko veći. Pacijenti koji koriste PI u sklopu cART mogu imati i do 2,5 puta veće izgleda da će patiti od smanjenja mineralne gustine kostiju u odnosu na pacijente koji uzimaju druge klase lekova (101). Rizik od pojave osteoporoze i fraktura kostiju se dupliraju kod HIV-om inficiranih osoba nakon deset godina lečenja sa cART. Rizik se povećava posebno po navršavanju 55. godine života (102).

1.4. Starenje i HIV

Nepotpuni su podaci o uticaju činilaca HIV-infekcije na raniju manifestaciju kliničke starosti. Izuzetno je kompleksan i međusoban odnos između činilaca HIV infekcije sa drugim mehanizmima potencijalno odgovornim za pojavu komorbiditeta povezanih sa starenjem u odsustvu HIV-infekcije. Mehanizmi kojima antiretrovirusni lekovi doprinose starenju su multifaktorijalni i takođe je potrebno nastaviti istraživanja kako bi se isti bolje razumeli.

Po uvođenju cART u protokole lečenja HIV infekcije, došlo je do dramatičnog smanjenja smrtnosti uzrokovane AIDS-om. Nedugo zatim je došlo do ubrzanog izveštavanja o pojavi masovnih metaboličkih problema kod HIV-om inficiranih pacijenata koji su bili lečeni novim cART-om. Izveštavano je o pojavama insulinske rezistencije, dislipidemije, i osteoporoze kod HIV-om inficiranih pacijenata i o povećanoj stopi infarkta miokarda, bubrežne insuficijencije, kognitivne disfunkcije i preloma kostiju u odnosu na HIV-negativne kontrole (96). Sva navedena stanja se učestalije javljaju kako pojedinci stare, pa stoga jedan od najvećih problema osoba inficiranih HIV-om postaje prisustvo „ubrzanog starenja” koje podrazumeva povećanu stopu komorbiditeta povezanih sa starenjem u poređenju sa HIV-

negativnim osobama, ali i njihovu disfunkcionalnost i nemogućnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti.

Starenje se može definisati kao vremenski zavisna pad funkcionalnog kapaciteta i otpornosti na stres povezan sa povećanim rizikom od invaliditeta, morbiditeta i mortaliteta (103). Starenje se odvija različitom brzinom i može biti ubrzano ili naglašeno kod HIV-om inficiranih osoba (104). Stoga, postoji značajno interesovanje za utvrđivanje razlike između hronološke starosti, koja predstavlja broj kalendarskih godina proteklih od nečijeg rođenja, i biološke starosti, mere koja odražava fiziološke funkcije osobe i njeno opšte zdravstveno stanje (105).

Takođe, usled dugotrajne izloženosti cART-u i imunosupresiji, neželjeni efekti imaju kumulativno toksično dejstvo koje opterećuje organizam. Ovo može stimulisati progresivne patofiziološke mehanizme koji su potencijalno povezane sa ubrzanim procesima starenja.

Novija istraživanja pokazuju da kod HIV-om inficiranih pacijenata biološka starost odstupa od njihove hronološke starosti (104), takođe, njihovo starenje više odmiče u odnosu na ono zabeleženo kod njihovih HIV-om neinficiranih vršnjaka (106). Nelečena HIV infekcija može da izazove ubrzanje biološkog starenja do 14,7 godina (107).

Stiv Horvat, profesor humane genetike na Kalifornijskom univerzitetu u Los Anđelesu i biostatističar, vodeći je istraživač u oblasti biologije starenja. Horvat je postulirao epigenetički sat, algoritam koji vrši predikciju starosti izuzetno dobro u širokom spektru tkiva i tipova ćelija. Horvatov sat može identifikovati i tkiva koja pokazuju dokaze ubrzanog starenja usled bolesti (108). Horvat nije zaobišao ispitivanje starenja kod HIV pacijenata i u studiji nedavnog datuma je potvrdio da je HIV infekcija bila povezana sa ubrzanjem starenja u krvi, bubrezima, slezini i mozgu, kao i da je veći indeks multimorbiditeta bio povezan sa većim ubrzanjem starenja u svim tkivima. Indeks multimorbiditeta u ovoj studiji je definisan kao broj medicinskih stanja koja se javljaju kod jednog pacijenta: hipertenzija, dijabetes tipa 2, kardiovaskularne bolesti, bolest bubrega, itd. Dodatno, uvrđeno je da je starenje krvi imalo najveći najveću snagu i najveći broj korelacija sa starenjem ostalih tkiva. U ranijim studijama je isti autor ukazao na ubrzano starenje i na neuropsihološki deficit kod perinatalno HIV-om inficiranih adolescenata (109), kao i da HIV infekcija dovodi do povećanja ćelijske starosti u moždanom tkivu i krvi, 7,4 godine i 5,2 godine, respektivno (110).

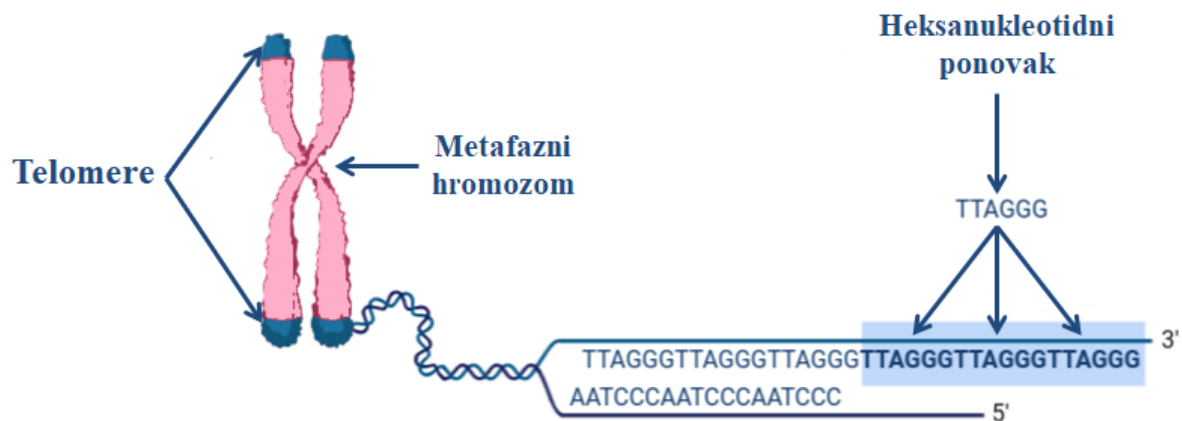
Složeno i heterogeno ljudsko starenje je neophodno kvantifikovati i okarakterisati na adekvatan način. Biomarkeri su, po definiciji, objektivne indikacije medicinskog stanja koje se mogu precizno i ponovljivo meriti, posmatrano izvan pacijenta. Ključne osobine prilikom odabira biomarkera jesu da se oni odnose na konkretno stanje pacijenta i da su njihove vrednosti stabilne i ponovljive unutar pojedinca. Takođe, manja intraindividualna varijabilnost nivoa biomarkera je poželjna kako bi veličina potrebnog uzorka bila manja (111). Biomarkeri starenja imaju ulogu da objasne u kojoj meri brojna medicinska stanja utiču na biološku starost pacijenata. Biološka starost pacijenata se može pratiti promenama vrednosti biomarkera starenja (112). Kao pouzdan biomarker starenja se pokazala dužina telomera (107). Uzimajući u obzir činjenicu da su telomere u korelaciji sa hronološkom starošću tokom celog života i da imaju prediktivnu moć za napredovanje bolesti i reagovanje organizma na izlaganja različitim agensima, pomoću praćenja promena u dužini telomera se može kvantifikovati biološko starenje (113).

Svetska zdravstvena organizacija preporučuje početak primene cART odmah i bez odlaganja, po dobijanju dijagnoze (27). Nelečena HIV-infekcija i starenje imaju sinergistički efekat na skraćivanje telomera. Ukoliko se HIV-infekcija ne leči, dolazi do porasta broja kopija HIV-RNK i opadanja broja CD4+ T ćelija. Izračunato je da virusno opterećenje od > 100.000

kopija HIV-RNK/mL krvne plazme utiče na dužinu telomera slično kao starenje od 7 godina i zaključeno je da HIV-om inficirana osoba sa virusnim opterećenjem od > 100.000 kopija HIV-RNK/mL, može imati dužinu telomera kao skoro dve decenije starija HIV-om neinficirana osoba (114).

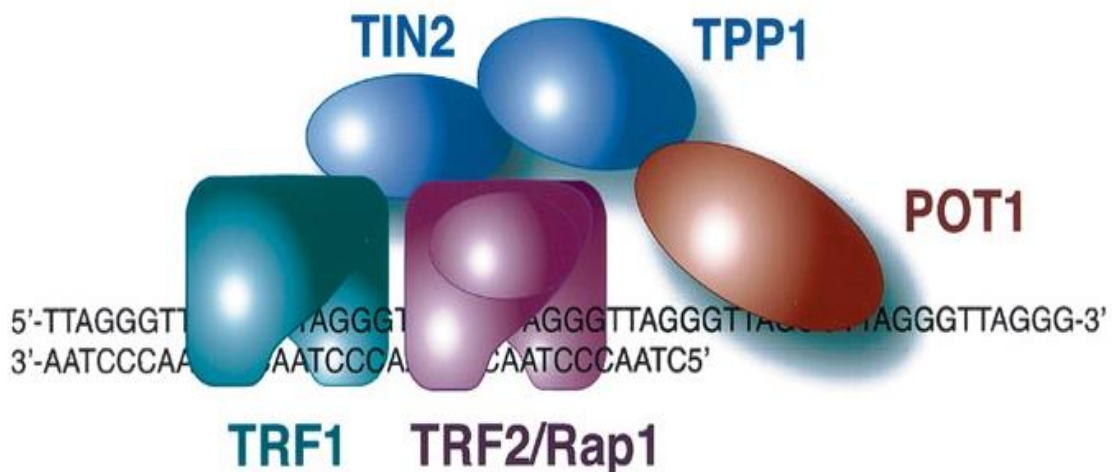
1.5. Telomere

Humane telomere se nalaze na krajevima hromozoma i štite hromozome od lokalnog gubitka genetičkog materijala. U humanim ćelijama se telomere sastoje od nekoliko hiljada heksanukleotidnih ponavaka (TTAGGG), Slika 10. Ovi nizovi dužine 10 to 15 kilobaza (kb) se svakom deobom ćelije fiziološki skraćuju (115). Kada se dostigne kritično skraćenje telomera, na oko 12 heksanukleotidnih ponovaka, deobe ćelija više neće biti moguće i doći će do programirane ćelijske smrti (apoptoze) (116).



Slika 10. Građa telomera.

Telomerni ponovci su mesta vezivanja zaštitnog proteinskog kompleksa, nazvan šelterin (engl. *shelterin*) proteinima, koji sprečavaju oštećenja na DNK molekulima i olakšavaju regrutovanje replikativnih faktora specifičnih za telomere (117). Šelterin kompleks poput kape pokriva i oblaže krajeve telomera. Ovaj zaštitni kompleks je prisutan samo na krajevima hromozoma, vezan je za telomere tokom celog ćelijskog ciklusa i čini ga šest subjedinica, Slika 11. Vezujući faktori 1 i 2 (engl. *Telomeric Repeat Binding Factor 1*, TRF1 i engl. *Telomeric Repeat-Binding Factor 2*, TRF2), imaju ulogu u replikaciji telomera i u vezivanju preostala četiri proteina zaštitnog kompleksa za dvolančane TTAGGG ponovke: represornog i aktivatorskog proteina 1 (engl. *Repressor and Activator Protein 1*, RAP1), TRF1-vezujućeg nuklearnog faktora 2 (engl. *TRF1-Interacting Nuclear Protein 2*, TIN2), zaštitnika telomera 1 (engl. *Protection of Telomeres*, POT1) i proteina koji interaguje sa POT1 i TIN2 (engl. *POT1-and TIN2-Interacting Protein*, TPP1) (118).



Slika 11. Subjedinice zaštitnog proteinskog kompleksa (119).

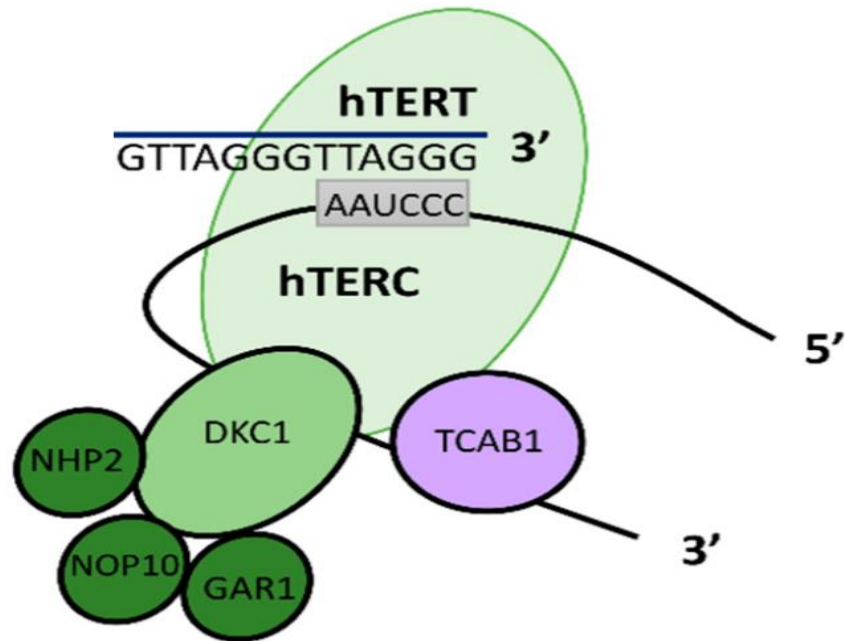
Sam kraj telomere se sastoji od vodećeg i zaostajućeg DNK lanca. Vodeći lanac je duži i svojim 3' krajem obrazuje tzv. G rep, jednolančanu sekvencu dužine od 50 do 300 nukleotida. G rep se uvija u T petlju čija zaštitna uloga sakriva jednolančanu DNK kako je mehanizmi ćelijske reparacije ne bi prepoznali kao svoj supstrat i remodelovali je (119).

Zbog svoje strukture, DNK polimeraza može da sintetiše DNK samo u 5'-3'smeru. Replikacija zaostajućeg lanca će ostati nezavršena. Svakom deobom, „problem replikacije završetka”, tj. pojava nekompletne replikacije telomera, za sobom ostavlja ćerku ćeliju sa telomerama kraćim od majke ćelije. Krajevi hromozoma se postepeno skraćuju i ćelija dolazi do tačke kada deobe više nisu moguće (120). Kada se dostigne kritično skraćivanje, a deobe više nisu moguće, ćelija postaje disfunkcionalna i podleže apoptozi (116, 121).

Enzim koji reguliše replikativni potencijal ćelije, održava dužinu telomera u fiziološkim uslovima i usporava neminovno skraćivanje telomera je telomeraza (118).

1.5.1. Telomeraza

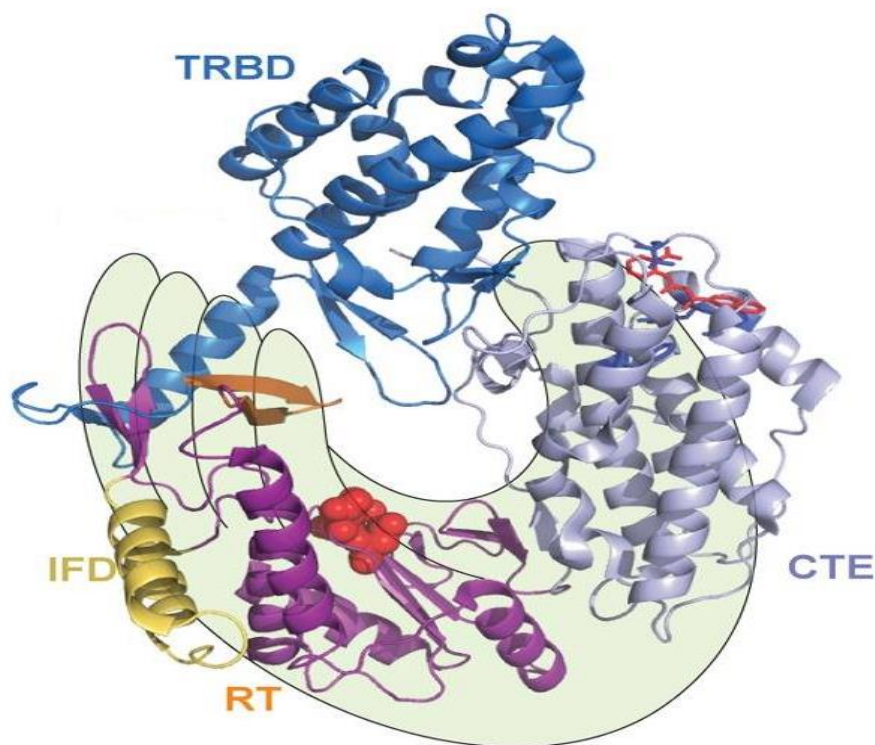
Enzim telomeraza je ribonukleoproteinski kompleks (Slika 12) sačinjen od katalitičke subjedinice - telomerazne reverzne transkriptaze (TERT subjedinica, kodirana od strane TERT gena), kratkog ribonukleotidnog lanca (TERC subjedinica dužine 451 nt) i pratećih proteina koji imaju ulogu u stabilizaciji molekula: diskerin (DKC), nukleolarni protein 10 (NOP10), nehistonski protein 2 (NHP2), telomerazni protein Kajlovog tela (TCAB1) i subjedinica 1 ribonukleoproteinskog kompleksa (GAR1) (122,123).



Slika 12. Struktura humane telomeraze (124).

Istraživanja pokazuju da telomeraza u većini ćelija odraslih osoba nije aktivna i ne eksprimira se u značajnoj meri, osim u matičnim ćelijama tkiva i ćelijama koje se fiziološki često i ubrzano dele, kao što su npr. kostna srž, aktivirani limfociti ili ćelije gastrointestinalnog trakta (125, 126). Proučavanje strukture telomeraze je veliki izazov za istraživače jer se u većini ćelija nalazi u izuzetno niskoj koncentraciji, poseduje veliku sekvencijalnu i strukturnu varijabilnost među vrstama, teško se prečišćava iz uzoraka, a ekspresija TERT gena i sklapanje telomeraznog kompleksa se otežano prati u *in vitro* uslovima.

TERT subjedinica (Slika 13) se sastoji od katalitičke C-terminalne ekstenzije (u daljem tekstu: CTE domen), domena zaduženog za sintezu telomernih ponovaka (u daljem tekstu: RT domen), N-terminalnog domena koji prepoznaje telomere (u daljem tekstu: TEN domen) i RNK-vezujućeg domena, koji je neophodan za sklapanje telomeraze i sintezu ponovaka (u daljem tekstu: TRBD domen). Da bi elongacija telomera otpočela, enzimski kompleks se translocira do telomera. TEN prepoznaje telomere i RT, CTE i TRBD domeni se približavaju jedan drugome i formiraju prsten oko DNK-RNK dupleksa. Jednolančani 3' kraj G-repa telomerne DNK se na osnovu komplementarnosti uparuje sa RNK šablonom TERC subjedinice. Početno uparivanje RNK-DNK se dešava između 4 ili 5 baza od mogućih 7 do 9, ostavljajući nesparenim kratak niz RNK nukleotida koji služe kao šablon na osnovu kog telomeraza produžava rastući lanac DNK. Kada se lanac sintetiše naspram celog šablona, dolazi do prolazne disocijacije RNA-DNK hibrida. Novosintetisani kraj DNK se repositionira sa aktivnog mesta TERT i svojih poslednjih 4 ili 5 nukleotida postavlja ponovo komplementarno na RNK šablon, kako bi se ciklus produžavanja lanca ponovio. Telomeraza ostaje povezana sa krajem hromozoma sve dok se ne doda nekoliko telomernih ponovaka. Proces je pomognut TPP1-POT1 proteinskim kompleksom. Naspram novosintetisanog rastućeg lanca, DNK polimeraza α dodaje nucleotide u zaostajući DNK lanac (127, 128).



Slika 13. Struktura katalitičke subjedinice humane telomerase (127).

Izostanak ekspimiranja telomerase nastao kao posledica mutacija u TERT genu, pomoćnim proteinima telomerase ili promotorskim elementima uzrokuje genska oboljenja, dok je njena aberantna regulacija preduslov za besmrtni fenotip velikog broja ćelija kancera (129).

1.5.2. Skraćivanje telomera

Usled nekompletne replikacije DNK, prilikom svake gubi se od 100 do 200 baznih parova (bp) telomernih ponovaka (130). Ranih šezdesetih godina prošlog veka je dokazano da je vek ljudskih somatskih diploidnih ćelija ograničen brojem deoba. Vek ćelije je uslovljen tzv. Hejflikovim limitom, granicom posle koje deobe ćelija više nisu moguće. U normalnim humanim somatskim ćelijama se ne ekspimiraju telomera pa održavanje dužine telomera nije moguće i dolazi do trajnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa. Hejflik je smatrao da je sposobnost humanih ćelija da se dele ograničena na oko 50 puta do prestanka njihovog deljenja (118, 131).

Brojni faktori utiču na promenu dužine telomera, a skraćanju telomera mogu doprineti dejstva fizioloških, psiholoških i patoloških stresora, primena cART i hronična inflamacija (132, 133, 134, 135). Srednja vrednost dužine telomera leukocita smatra se odrazom dužine telomera u drugim ćelijama (136).

Infekcija virusom može pokrenuti različite odgovore ćelije na stres i izazvati ćelijsko remodelovanje, uključujući promene na nivou telomera. Dužina telomera može da utiče na struktuiranje heterohromatina i na lokalnu transkripciju u subteloernom regionu. Subtelomerni geni su odgovorni za regulaciju ekspresije proteina uključenih u urođeni imunološki odgovor, kao što je interferon-stimulisani gen 15, interferonom regulisan gen koji

je među najznačajnijim proteinima koji su aktivirani nakon virusne infekcije. Imajući ovo u vidu, dužina telomera i telomerni hromatin, na opisani način, imaju funkcionalne veze sa urođenim imunološkim signalnim putevima, pa ćelije sa različitim dužinama telomera mogu imati različite odgovore na virusnu infekciju (117).

Ubrzo nakon HIV serokonverzije je uočeno rapidno skraćivanje telomera u mononuklearnim ćelijama krvi (137). Do sada je potvrđeno da su kraće dužine telomera zabeležene kod HIV-om inficiranih pacijenata povezane sa neprekidnom imunološkom aktivacijom i nižim imunološkim odgovorom uprkos supresiji virusa ostvarenoj upotrebom cART-a (138, 139). Uvid u progresiju HIV-infekcije se vrši praćenjem broja CD4+ T ćelija (140). Broj CD4+ T ćelija < 200 ćelija/ μ L se može povezati sa skraćenim telomerama (114). Parametar koji se često koristi za praćenje upalnih procesa i progresiju HIV-infekcije je C-reaktivni protein (u daljem tekstu: CRP) (140, 141). Uticaj CRP-a na dužinu telomera još uvek nije sasvim jasan. Dokazano je da porastom koncentracije CRP-a, pojavom koja je ukazatelj da je došlo do inflamacije, može doći do skraćivanja telomera (142), ali postoje i rezultati ispitivanja koji ne ukazuju na to da postoje uticaj CRP-a na dužinu telomera (143).

U zdravim CD4+ T ćelijama telomere se skraćuju brzinom od 50 do 100 baznih parova (bp) po deobi ćelije (144). Međutim, gubitak telomera može se povećati tokom virusne infekcije i do 5 puta. Ovaj progresivni gubitak telomera može da dostigne kritičnu tačku starenja ćelije, poznatu kao senescencija (nereplikativno i anergično stanje). Oštećenje telomerne DNK koje uzrokuje starenje ćelije i/ili apoptozu, rezultira progresivnim iscrpljivanjem CD4+ T-ćelija i neuspehom imunološkog oporavka tokom HIV infekcije (23).

Prisustvo virusnog Tat proteina u humanoj ćeliji je povezano sa pojavom komorbiditeta, redukcijom telomerazne aktivnosti, sprečavanjem sklapanja telomeraznog kompleksa u funkcionalnu celinu, inhibicijom translokacije sekretovane telomeraze u jedro, razgradnjom telomeraze i indukovanjem oksidativnog stresa (145). Virusni Vpr dovodi do degradacije telomeraze i indukovanja oksidativnog stresa, koji, osim što može direktno dovesti do fizičkog oštećenja telomera, inicira translokaciju telomeraze u mitohondrije i terminaciju elongacije telomera (146, 147).

Pored cART-a, zbog podložnosti razvoju različitih pridruženih bolesti, HIV-om inficirani pacijenti koriste i druge lekove kako bi držali pod kontrolom stečene komorbiditete. Pokazalo se da neki lekovi mogu uticati na dužinu telomera. Iako su statini izuzetno efikasni za tretman kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze, veoma čestih komorbiditeta povezanih sa HIV infekcijom, oni mogu biti povezani sa skraćenjem telomera (114). Takođe, objavljeni su i mogući mehanizmi pomoću kojih statini mogu da očuvaju dužinu telomera (148).

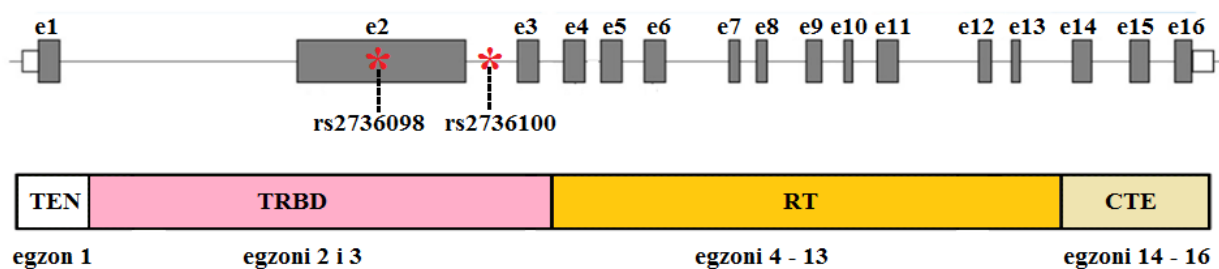
Poput statina, uticaj insulina na dužinu telomera se ne može generalizovati jer postoje dokazi da on može dovesti do skraćivanja telomera (149), ali i da može imati zaštitno dejstvo na telomere (150), dok je dijabetes nesumnjivo povezan sa skraćivanjem telomera (151). Dijabetes je često povezan sa gojaznošću. Ne treba zanemariti ni uticaj gojaznosti na dužinu telomera. U meta-analizi koja je obuhvatila skoro 150.000 ispitanika, ne samo da je prikazana inverzna veza između indeksa telesne mase (engl. *Body Mass Index*, BMI) i dužine telomera, već je takođe izračunato da se sa svakim jediničnim povećanjem BMI dužina telomera skraćuje za 3,99 bp (152).

Molekularni mehanizmi preko kojih antiretrovirusni lekovi mogu uticati na skraćivanje telomera su različiti. Na primer, efavirenz doprinosi skraćivanju telomera tako što narušavanjem ćelijske homeostaze (153), stimulisanjem proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (154), povećava upalu (155) i inhibira molekule koji stabilizuju telomerau (156). Za razliku od efavirenza, tenofovir direktno inhibira telomerazu (157), ali i menja ekspresiju gena uključenih

u održavanje telomera (158). Dolutegravir, s druge strane, može indirektno da skрати telomere negativno regulišući aktivnost telomerase i promovišući proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika (135). Međutim, nekoliko studija je pokazalo da je cART koristan za oporavak dužine telomera (159, 160).

1.6. Uticaj TERT gena na dužinu telomera

Održavanje dužine telomera je pod kontrolom telomerase, enzima kodiranog TERT genom, koji usporava skraćivanje telomera i reguliše replikativni potencijal ćelije (118). TERT gen se nalazi na hromozomu 5p15.33 kod ljudi. Kodira sastavni i suštinski deo holoenzima telomerase (Slika 14). Dugačak je oko 42 kb i sastoji se od 15 introna i 16 egzona, sa promotorskim jezgrom dužine 260 bp. TEN domen je kodiran egzonom broj 1. TRBD domen kodiraju egzoni 2 i 3. RT domen je kodiran egzonima 5, 6, 7, 8 i 9, dok CTE domen kodiraju egzoni 14, 15 i 16. Pretpostavka je da se TERT gen može transkribovati u čak 22 izoforme, ali da samo transkript pune dužine, koji sadrži svih 16 prepisanih egzona, poseduje aktivnost reverzne transkriptaze koja je neophodna za produžavanje telomera (161-163).



Slika 14. Strukturna organizacija TERT gena.

U humanom TERT genu je opisan niz različitih polimorfizama pojedinačnih nukleotida (u daljem tekstu: SNP), a istraživanja pokazuju da su od posebnog značaja za njegovu ekspresiju dva polimorfizma, rs2736098 i rs2736100 (164, 165).

Polimorfizam rs2736098 G>A, koji se nalazi u drugom egzonu, takođe je povezan sa dužinom telomera, odnosno osobe sa AA genotipom imaju kraće telomere (166).

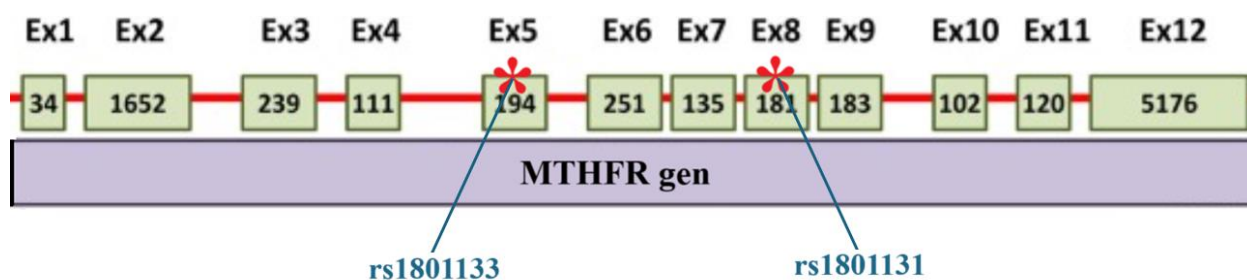
Polimorfizam rs2736100 A>C u nekodirajućem regionu drugog introna TERT gena je bio povezivan sa promenama u dužini telomera. Prema opsežnoj meta-analizi, nosioci varijante C (citozin) imali su duže telomere od nosilaca alela divljeg tipa - A (adenin) (164).

Po do sada raspoloživim podacima, nije bilo objavljivanih podataka o efektima polimorfizma rs2736098 TERT na dužinu telomera kod pacijenata zaraženih HIV-om, pre publikovanja rezultata ovog ispitivanja (167), dok su samo dve studije istraživale efekte polimorfizma rs2736100 TERT na dužinu telomera kod pacijenata zaraženih HIV-om. Obe studije su rađene samo na uzorcima poreklom iz afričkih populacija (168, 169). Saznanja o eventualnim razlikama u dužini telomera između nosilaca različitih genotipova bi mogla da pruže više informacija o biološkom zdravlju pojedinačnog pacijenta i mogla bi ukazati na one pacijente koji nose veći rizik od komplikacija povezanih sa HIV-om (170-173).

1.7. Uticaj MTHFR gena na dužinu telomera

Metilacija DNK je jedan od bitnih mehanizama modulacije genske ekspresije. Tokom reakcije metilacije dolazi do kovalentnog vezivanja metil grupe za peti ugljenik citozina ugrađenog u CpG ostrvce (174). HIV infekcija može ubrzati starosno zavisnu metilaciju za približno 14.7 godina. Kao rezultat ubrzane metilacije, kod HIV-om inficiranih osoba, dužina telomera u CD4+ T-ćelijama može odgovarati dužini telomera u CD4+ T-ćelijama koju imaju 20-30 godina starije HIV-om neinficirane osobe (107). Jedno od glavnih obeležja starenja ćelije je opšta hipometilacija koja se prostire duž genoma (174). Širenje hipometilacije duž celog genoma je primećena i kod HIV-om inficiranih osoba (175).

Kada je promotor TERT gena hipometilovan, eksperimentalno je potvrđeno da je sinteza telomeraze suprimirana, a dužine telomera su skraćene (176). Donator metil grupe u 80% metilacija koje se odigravaju u ćeliji je S-adenozilmetionin (177). Prekursor S-adenozilmetionina je metionin. Enzim metilentetrahidrofolat reduktaza, kodiran genom MTHFR (Slika 15), učestvuje u sintezi metionina. Varijanta gena koja ima najznačajniji uticaj na aktivnost reduktaze je rs1801133 C>T, odnosno nukleotidna supstitucija citozina timinom (T) na poziciji 677 u MTHFR genu. Kod heterozigotnih osoba (CT), kod kojih je jedan citozin zamenjen timinom, aktivnost metilentetrahidrofolat reduktaze opada na 65 %. Kod mutiranih homozigota (TT) kod kojih su oba citozina zamenjena sa dva timina, aktivnost enzima pada na samo 10-20 %. Genska varijanta MTHFR gena koja takođe utiče na aktivnost metilentetrahidrofolat reduktaze je rs1801131 A>C, na poziciji 1298. Kod heterozigotnih osoba, kod kojih je jedan citozin zamenjen timinom, aktivnost metilentetrahidrofolat reduktaze je smanjena za 40 % (178).



Slika 15. Strukturna organizacija MTHFR gena (179).

Kada se aktivnost reduktaze smanji, ugrožen je ciklus metionina u kojem se metil grupe transportuju do svojih konačnih akceptora, biomakromolekula kao što su DNK, RNK i proteini. Smanjenje aktivnosti metilentetrahidrofolat reduktaze dovodi do hipometilacije DNK. Pored toga, pokazalo se da je metilentetrahidrofolat reduktaza enzim koji utiče na farmakodinamiku brojnih lekova, a do sada je samo jedna grupa autora ispitala odnos rs1801131 i rs1801133 polimorfizama MTHFR gena sa antiretrovirusnim lekovima (180).

Oba polimorfizma, a posebno MTHFR rs1801133, često se povezuju sa povećanjem rizika od različitih zdravstvenih stanja, uključujući neplodnost kod muškog pola, spontane pobačaje, defektno formiranje neuralne cevi, urođene bolesti srca i Daunov sindrom, a sugerisano je da doprinose i kompleksnim zdravstvenim poremećajima kao što su kancer, kardiovaskularne bolesti, autoimuni poremećaji i neurodegenerativne bolesti (181).

U naučnoj literaturi nema dostupnih podataka o povezanosti dužine telomera, važnog genetskog parametra procesa starenja, sa prisustvom polimorfizama rs1801133 i rs1801131 u genu MTHFR kod pacijenata zaraženih HIV-om.

Polimorfizmi gena igraju važnu ulogu u dispoziciji lekova i individualizaciji terapije, jer mogu doprineti varijabilnosti farmakokinetičkih procesa i mogu uticati na promenu efekata negenetskih faktora. U lečenju HIV-a, farmakogenetičko-farmakokinetički odnosi su dokazani za mnoge antiretrovirusne lekove. Procenjeni udeo pacijenata starijih od 50 godina, što je, generalno, starosna granica za definisanje „starijih“ osoba u oblasti HIV-a, iznosio je 42% u 2013. godini i predviđa se da će biti 70% do kraja 2035. godine. Starenjem se menja farmakokinetika organizma, a postoje polimorfizmi gena koji mogu da modifikuju efekat starenja i dovedu do pojave značajne varijabilnosti u farmakokinetici među pacijentima. Uglavnom se identifikacija SNP-ova koji bi mogli da pruže informacije za prilagođavanje režima i doziranja cART, odnose na širok spektar metaboličkih enzima i transportera lekova, ali ne treba zaobići ni polimorfizme u genima koji nemaju direktan uticaj na metabolizam leka, ali imaju uticaj na druge procese, ugrožene pojavom bolesti (182).

Potencijalne razlike u dužini telomera kod pacijenata inficiranih HIV-om, u zavisnosti od TERT i MTHFR genotipova i primenjenih antiretrovirusnih lekova, mogu uticati na izbor cART-a i individualizovati režim lečenja HIV-om inficiranih pacijenata.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti učestalosti alela i genotipova rs2736100 i rs2736098 polimorfizama u TERT genu kod pacijenata sa HIV infekcijom lečenih cART-om.
2. Odrediti učestalosti alela i genotipova rs1801133 i rs1801131 polimorfizama u MTHFR genu kod pacijenata sa HIV infekcijom lečenih cART-om.
3. Ispitati povezanost utvrđenih genotipova i RTL kod pacijenata sa HIV infekcijom lečenih cART-om.
4. Ispitati povezanost primenjenih antiretrovirusnih lekova u sastavu cART-a na RTL.
5. Ispitati zajednički uticaj genotipova rs2736100 i rs2736098 polimorfizama TERT gena, rs1801133 i rs1801131 polimorfizama MTHFR gena i primenjenih lekova u sastavu cART-a na RTL kod pacijenata sa HIV infekcijom lečenih cART-om.

3. MATERIJAL I METODE

Tokom celokupnog istraživanja su poštovani svi etički principi i svi principi dobre laboratorijske i kliničke prakse, vodeći se međunarodno priznatim i usvojenim standardima (183). Istraživanje je izvršeno uz saglasnost Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, odlukom 1322/IX-24, izdatu dana 22.09.2023. godine.

3.1. Studijska grupa

Ova studija preseka je obuhvatila 176 ispitanika sa dijagnostikovanom HIV infekcijom koji se redovno kontrolišu i leče u Centru za HIV/AIDS, Instituta za infektivne i tropske bolesti „Dr Kosta Todorović“, Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Svi ispitanici iz ove studijske grupe su pripadali populaciji sa teritorije Republike Srbije. Ispitanicima je usmeno objašnjena metodologija i cilj istraživanja. Ispitanici su, po potpisivanju informisane saglasnosti za učešće u istraživanju i potvrde o razumevanju njegovog sadržaja, bili upućivani na uzorkovanje krvi. Relevantne podatke za istraživanje iz zdravstvenog kartona i istorije bolesti ispitanika su prikupljatene poštujući mere zaštite ličnih podataka ispitanika.

Kriterijumi za uključnje:

- a. pacijenti bele etničke pripadnosti, muškog pola
- b. starost pacijenta iznad 18 godina
- c. potpisana saglasnost za učestvovanje u istraživanju
- d. potvrđena HIV-infekcija (*Real Time PCR* metodom)
- e. primena cART-a u trajanju od minimum 4 meseca
- f. pacijenti sa manje od 50 kopija HIV RNK/ml krvi na kontrolnom pregledu

Kriterijumi za isključenje:

- a. prisustvo akutne infekcije
- b. prisustvo hepatitis B virusne infekcije (HBV)
- c. prisustvo hepatitis C virusne infekcije (HCV)
- d. prisustvo infekcije izazvane humanim papiloma virusom (HPV)
- e. upotreba citotoksičnih lekova
- f. primena radioterapije
- g. upotreba rekreativnih droga
- h. hroničan alkoholizam

3.2. Odabir tkiva za ispitivanje

Krv se često koristi kao optimalan surogat za proučavanje drugih tkiva kada su u pitanju epigenetički efekti starenja. Ovaj zaključak se zasniva na umerenim koeficijentima korelacije između godina starosti pacijenta i ubrzanja starenja krvi i drugih tkiva, kao i činjenici da je nekoliko medicinskih stanja povezano sa tkivno specifičnim efektima ubrzanja starosti (109). Mononuklearne ćelije periferne krvi su dinamične ćelije koje adekvatno reprezentuju trenutno fiziološko stanje pacijenata (184).

Venepunkcijom je u Centru za HIV/AIDS od pacijenata uključenih u istraživanje uzimano po 4 ml uzorka krvi za farmakogenetsko istraživanje (BD Vacutainer, K2 EDTA). Planirani broj pacijenata uključenih u istraživanje je bio oko 150.

3.3. Inaktivacija virusa

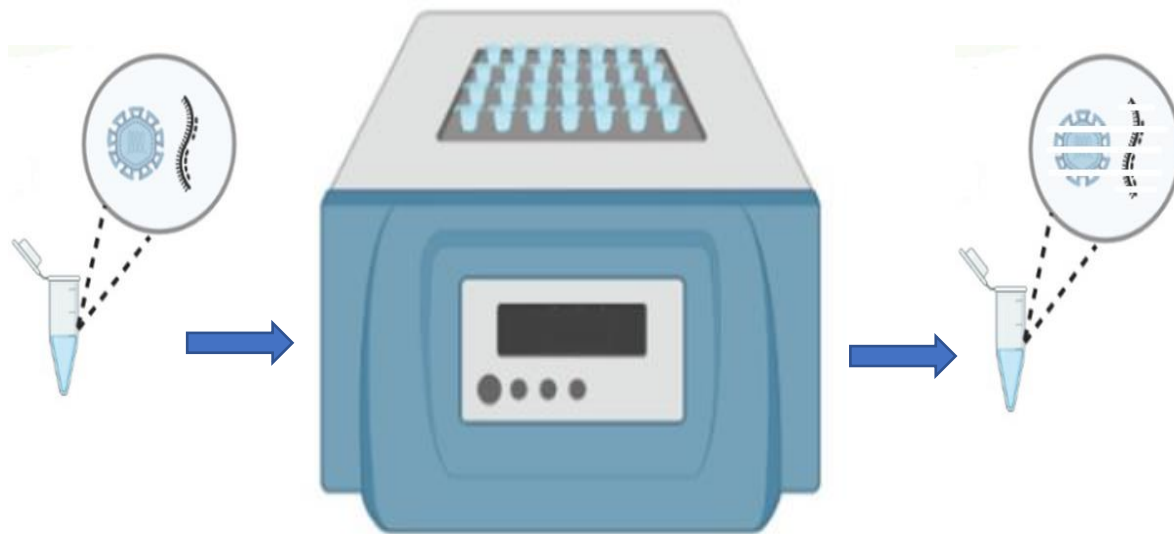
U Laboratoriji za farmakokinetiku, Instituta za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je izvršena inaktivacija HIV virusa u uzorku.

Lipidni omotač HIV-a je prvenstveno zalužan za stabilnost virusne čestice. HIV može ostati stabilan ako provede i do čak nekoliko sati u sredini pH vrednosti između 3 i 10, izložen UV zračenju, gama zračenju ili ultrazvučnim talacima, ali je osetljiv na dezificijense poput alkohola, formaldehida, natrijum dodecilsulfata ili tritona X-100. Poluživot HIV-a iznosi približno 30 minuta na temperaturi 56 °C, 1 minut na temperaturi 60 °C i manje od jedne sekunde na temperaturama iznad 65 °C (5).

Izabrani metod inaktivacije primenjen u ovom istraživanju podrazumeva izlaganje uzorka visokoj temperaturi tokom kratkog vremenskog preioda (78 °C, 30'). Termička inaktivacija je konvencionalna i efikasna metoda za eliminisanje infektivnosti patogena iz uzoraka koji se ispituju u kliničkim i istraživačkim laboratorijama i za kontrolu i smanjenje rizika od profesionalne izloženosti i kontaminacije radne i životne sredine. Inaktivacija se vršila u vodenom kupatilu prema standardnom protokolu (Slika 16) (185). Toplotna inaktivacija HIV-a u ljudskoj krvnoj plazmi je ušla u rutinsku upotrebu jer omogućava da se patogen uništi dovoljno brzo, pre nego što visoka temperatura naruši biološke karakteristike plazme koja se ispituje. Empirijski podaci ukazuju na to da se primenom temperature iz opsega od 75 °C do 78 °C dostiže inaktivacija virusa, skoro bez promena u komponentama plazme, čak i ekspozicijom od 0,006 sekundi. Promene u komponentama plazme počinju da se uočavaju primenom temperature od 81 °C.

Toplotna inaktivacija virusa u uzorku se ostvaruje indukovanjem jedinstvenih modifikacija virusnih proteina i genoma na molekularnom nivou, odnosno denaturacijom sekundarnih struktura proteina i drugih molekula, što dovodi do poremećaja u odvijanju molekularnih funkcija i inaktivacije virusa (186). Denaturacija virusnih proteina, izazvana kritičnim zagrevanjem, trodimenzionalno menja oblik njihovog aktivnog mesta tako da se ono više ne može uklopiti sa supstratom, te protein više ne može izvršiti svoju funkciju, na primer prepoznavanje molekula na membrani ćelije potencijalnog domaćina.

Korišćenjem različitih uređaja je otkriveno da je vodeno kupatilo efikasniji termički inaktivator virusa u odnosu na suve sterilizatore, uređaje koji smanjenje infektivnosti postižu suvim vrelim vazduhom. Vodeno kupatilo, osim što postiže veću efikasnost, postiže i veći prenos toplote i termičku ravnotežu uzorka, dok smanjuje potrebu za produženim zagrevanjem (187). Pogodnosti korišćenja toplotne obrade uzorka je i u tome što se izbegava korišćenje hemijskih dezinfekcionih agenasa i sprečava rasipanje infektivnog materijala inaktivacijom celokupnog uzorka.



Slika 16. Inaktivacija virusa u vodenom kupatilu.

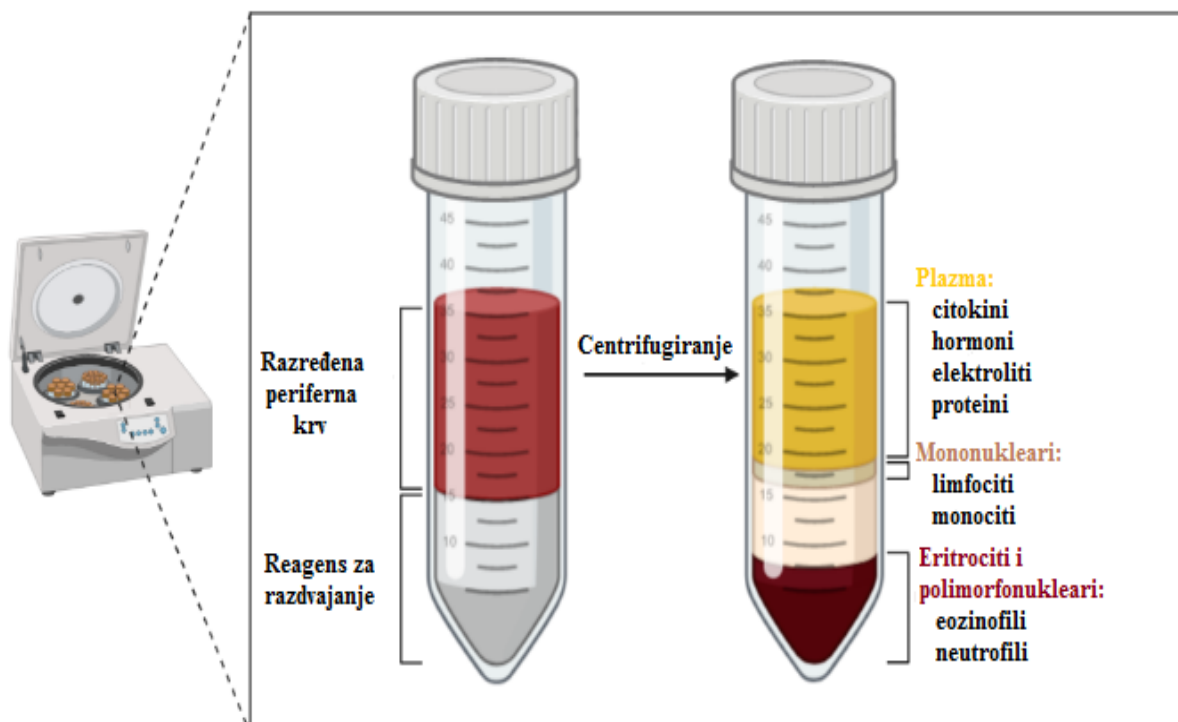
3.4. Izdvajanje mononukleara

Po protokolu proizvođača su iz uzoraka krvi, korišćenjem hidrofилnog polisaharida (FicollPaque Plus, GE Healthcare) na gustinskom gradijentu razdvojene mononuklearne ćelije od plazme, eritrocita, trombocita i granulocita (Slika 17). Za razliku od eritrocita i trombocita, ostale krvne ćelije imaju jezgro i mogu se klasifikovati prema strukturi jezgra kao mononuklearne ili polimorfonuklearne ćelije. Obe klase ćelija imaju važnu ulogu u imunitetu i štite organizam od zaraznih bolesti što objašnjava njihovu zastupljenost u kliničkim ispitivanjima. Izolacija mononuklearnih i polimorfonuklearnih ćelija iz krvi predstavlja polaznu tačku za širok spektar imunoloških studija, identifikaciju biomarkera, razvoj vakcina i imunoterapiju kancera. Limfociti i monociti su dve glavne kategorije mononuklearnih krvnih ćelija sa jednodelnim jedrom sa specifičnim i važnim ulogama u odbrani tela od infekcije i kancera. Limfociti, u koje spadaju prirodne ćelije ubice (NK), T ćelije i B ćelije, čine većinu populacije mononuklearnih ćelija periferne krvi, 70 – 90%. Monociti predstavljaju 10 – 30% populacije mononukleara, a mali procenat predstavljaju i dendritske ćelije, 1 - 2% (188).

Veliki proboj u razvoju metoda za separaciju krvnih ćelija je bilo otkriće centrifugiranja kroz rastvor Fikol-natrijum metrizoata. Novi metod je pružio efikasnije i brže frakcionisanje različitih ćelijskih populacija pune krvi korišćenjem jedinstvenog obrasca migriranja ćelija kroz reagens za razdvajanje. Ovaj metod se zasniva na razlici u gustini između ćelija krvi i reagensa za razdvajanje (189). Studije su ispitivale uticaj uslova čuvanja uzoraka krvi na uspešnost ekstrakcije mononukleara. Fluorescentnom protočnom citometrijom procenjivan je prinos reakcije odvajanja mononukleara, vijabilnost odvojenih ćelija i održavanje međusobnog udela ćelijskih populacija unutar mononuklearne frakcije između uzoraka mononukleara iz sveže krvi držane na sobnoj temperaturi i uzoraka koji su pre razdvajanja bili kriokonzervirani. Rezultati studije su prednost dali držanju uzoraka na sobnoj temperature do odvajanja mononukleara jer su pokazali da hlađenje može imati negativan efekat na prinos reakcije i da može poremetiti međusobne udele u subpopulacijama ćelija. Takođe, populacija mononukleara je bila kontaminirana neutrofilima u uzorcima koji su stajali na sobnoj temperaturi duže od 6 sati pre razdvajanja (190). Studija koja je pratila zastupljenost 26 različitih populacija ćelija ekstrahovanih iz pune krvi u različitim vremenskim tačkama u odnosu na vreme venepunkcije

je pokazala da u idealnom slučaju, ceo proces izolacije mononukleara i krioprezervacije treba izvesti u roku od 8 sati od vađenja krvi (191).

Kako bi se obezbedio visok prinost i velika iskoristivost izolovanih mononuklearnih ćelija, u ovom ispitivanju, za ekstrakciju se koristila sveža krv, tj. ekstrakcija je rađena iz antikoagulansom tretirane krvi, nekoliko sati nakon venepunkcije. Uzorci krvi su se čuvali na sobnoj temperaturi do inaktivacije i razdvajanja mononukleara. Svaki uzorak krvi (po 2 ml) je razblažen fiziološkim rastvorom (razmera 1:1). U falkon test tube zapremine 10 ml je sipano po 3 ml reagensa za razdvajanje. Reagensu se pažljivo dodavalo po 4 ml krvi razblažene fiziološkim rastvorom u razmeri 1:1 (2 ml uzorka + 2 ml fiziološkog rastvora), tako da ne dođe do mešanja reagensa i krvi. Zatim se ovako pripremljeni uzorak centrifugirao (400 x g, 30 minuta). Tokom centrifugiranja, ćelije veće gustine (tj. granulociti i eritrociti) sedimentiraju kroz reagens. Mononukleari se talože na fazi između reagensa i plazme, iz koje se mogu pažljivo sakupljati. Po završenom centrifugiranju, izdvojen sloj mononuklearnih ćelija (beličast sloj na granici faza reagensa i plazme) se ekstrahovao u nove falkon tube, vodeći računa da se ne ekstrahuje i medijum. Preostali sadržaj (plazma + reagens + eritrociti + granulociti) iz falkon tube se odbacuje. Usledilo je ispiranje prikupljenih mononuklearnih ćelija prelivanjem uzorka sa 8 ml 1xPBS, mešanjem invertovanjem tube i centrifugiranjem (400 x g, 15 minuta). Poslednji korak je podrazumevao odlivanje supernatanta i rastvaranje taloga u kome se nalaze mononuklearne ćelije u vodi (192). Uzorci su prebacivani u tube zapremine 1,5 ml i čuvani na -20 °C.

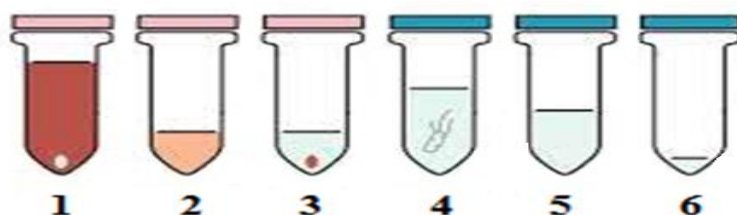


Slika 17. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi centrifugiranjem u gradijentu gustine.

3.5. Izolacija DNK

U Laboratoriji za humanu genetiku, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je iz uzoraka mononuklearne frakcije krvi izvedena izolacija DNK molekula, određena relativna dužina telomera i genotipizacija.

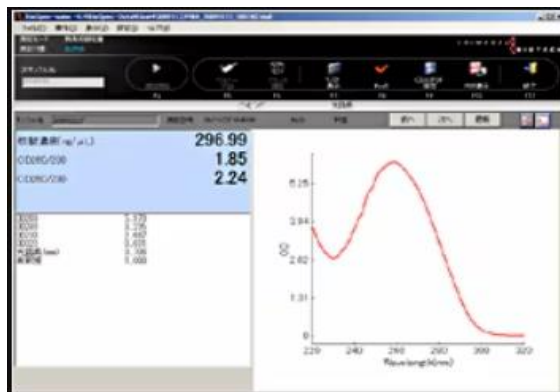
DNK molekuli su izolovani iz mononuklearnih ćelija metodom izoljavanja (Slika 18). Izolat mononuklearnih ćelija je tretiran puferom za liziranje leukocita, natrijum-dodecilsulfatom i proteinazom K, kako bi se razgradile membrane ćelija i jedra i inaktivirali proteini. Smeša je zatim bila inkubirana (55 °C, 10 minuta), nakon čega joj je bio dodan natrijum hlorid i etanol. Etanol dovodi do taloženja DNK, dok natrijum hlorid pomaže u uklanjanju proteina koji su vezani za DNK i održava ih rastvorenim u vodenom sloju kako se ne bi taložili u alkoholu zajedno sa DNK. DNK nije rastvorljiva u alkoholu. Etanol ima nižu dielektričnu konstantu od vode, što mu omogućava da izvlači molekule vode vezane za DNK formiranjem jonskih veza koje izazivaju taloženje DNK spajanjem njenih lanaca koji postaju vidljivi golim okom u vidu belih tankih niti umršenih u klupko. Smeša sa natrijum hloridom i etanolom je centrifugirana (13000 rpm, 10 minuta), nakon čega je dobijeni supernatant, koji je sadržao DNK, prebacivan u čiste tubice. Supernatantu se dodavao hladni apsolutni etanol i centrifugirao se. Što je etanol hladniji, to je DNK manje rastvorljiva u njemu i lakše se taloži. Ohlađeni etanol snižava temperaturu u reakcionoj smeši i time sprečava aktivnost enzima DNK-aza, odgovornih za lizu i degradaciju DNK. Smanjenje aktivnosti enzima DNK-aze povećava prinos izolovane DNK. Novodobijeni supernatant je odbacivan. Talogu, u kome se nalazila DNK, se dodavao hladni 75 % etanol. Alkoholni rastvor DNK se isušivao. Ovako dobijena DNK rastvarala se u vodi i čuvala na -80 °C (193).



Slika 18. Izolacija DNK metodom izoljavanja. 1 – Suspenzija mononukleara, 2 – Liziranje ćelija, 3 – Taloženje DNK i proteina, 4 - Izdvajanje proteina u vodenu fazu, 5 - Razdvajanje DNK i proteina, 6 – Izolat DNK.

3.6. Određivanje koncentracije DNK i čistoće uzorka

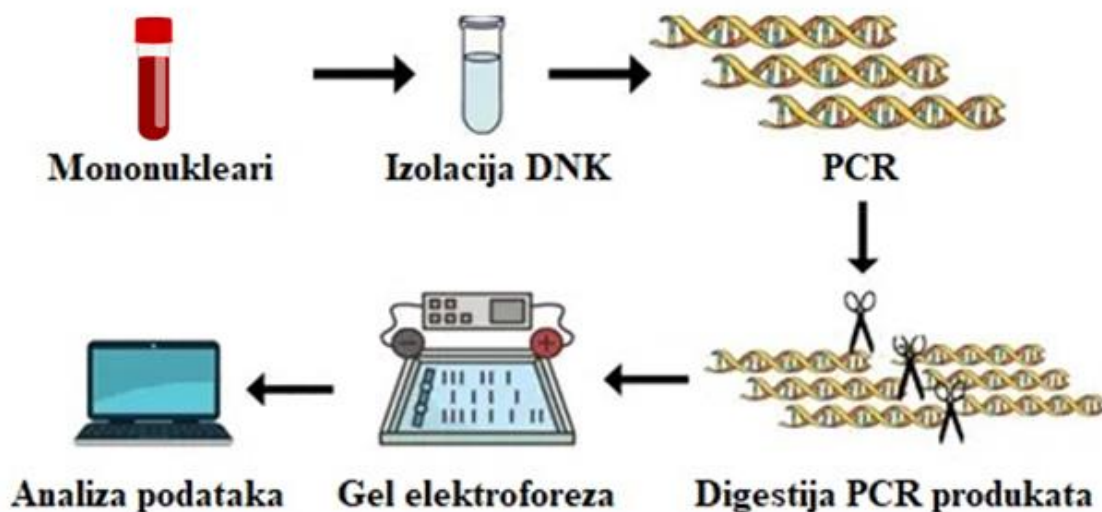
Koncentracija i kvalitet DNK izolata su procenjivani spektrofotometrijski (BioSpec-nano, Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan), Slika 19. DNK izolat se rastvarao u vodi (1 µl DNK u 50 µl vode) i određivala mu se apsorbanca na 260 nm (pokazatelj koncentracije DNK) i 280 nm (pokazatelj kvaliteta DNK izolata, odnosno prisustvo proteina u izolatu). Čistoća uzorka (R) se procenjuje na osnovu odnosa A_{260nm}/A_{280nm} . Ukoliko je $R \geq 1,6$, zaključuje se da se DNK nalazi u dovoljno visokoj koncentraciji u izolatu i da izolat nije kontaminiran proteinima. U studiju su bili uključivani samo oni DNK izolati čija čistoća je bila zadovoljavajuća (194).



Slika 19. Uređaj za određivanje koncentracije DNK u uzorku i prikaz ekrana rezultata određivanja koncentracije.

3.7. Utvrđivanje genotipova TERT i MTHFR gena.

Genotipovi genskih varijanti TERT i MTHFR gena su utvrđeni metodom lančane reakcije polimeraze (*engl. polymerase chain reaction, PCR*), praćenom fragmentalnom enzimskom restrikcijom i proverom rezultata na akrilamidnom gelu (195, 196, 197), kao što je prikazano na Slici 20.

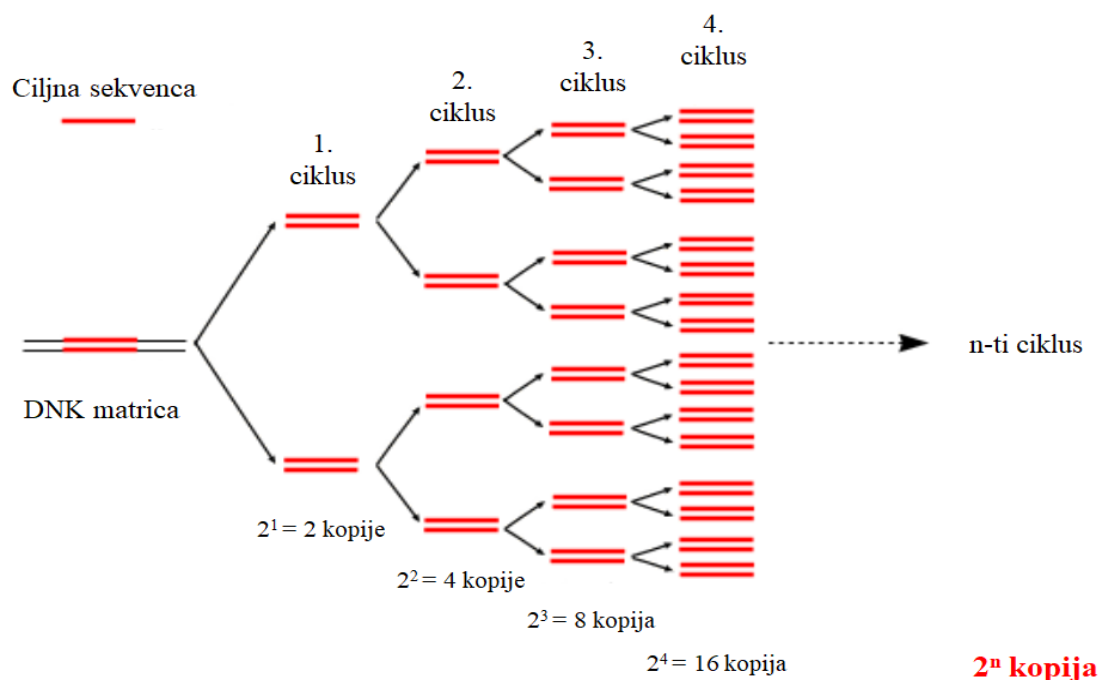


Slika 20. Uvrđivanje genotipova analiziranih polimorfizama

3.7.1. Lančana reakcija polimeraze

PCR metodom su umnožavane ciljne sekvence u okviru gena koje obuhvataju mesto u kome dolazi do zamene nukleotida, odnosno pojave ispitivanog polimorfizma. PCR reakcija predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Umnožavanje sekvenci podrazumeva cikličnu

smenu denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera pomoću termostabilne *Taq* polimeraze, Slika 21.



Slika 21. Lančana reakcija polimeraze

Nakon denaturacije DNK lanaca, odnosno njihovog razdvajanja, za jednolančane matrice, specifično se vezuju prajmeri. Prajmere predstavljaju dve oligonukleotidne DNK sekvence od kojih zavisi umnožavanje, međusobno su suprotno orijentisane i duge su obično oko 15 – 20 nukleotida. DNK polimeraza sintetiše rastući lanac na osnovu matrice, a nadovezujući se na postavljeni prajmer. Kraj DNK fragmenta koji se umnožava je definisan 5' krajem prajmera, a ukupna dužina fragmenta je definisana rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. Rezultat ovog procesa je multimilionsko umnožavanje ciljane sekvence, tako da se u jednom PCR amplifikatu dobije $10^6 - 10^8$ ciljanih PCR produkata (198). Sekvence i temperature topljenja prajmera su prikazani u Tabeli 1. Za izvođenje PCR reakcije je korišćen KAPA Master Mix (Kapa Biosystems, Inc, Wilmington, MA, USA) prema protokolu proizvođača.

3.7.2. Genotipizacija polimorfizama. Elektroforeza na akrilamidnom gelu

Provera uspešnosti PCR reakcije, odnosno umnožavanja ciljnih fragmenata, vršena je vertikalnom poliakrilamidnom gel elektroforezom. Usled svog negativnog naelektrisanja, DNK molekuli, odnosno PCR produkti se kroz poliakrilamidni gel postavljen u električnom polju, kreću od katode ka anodi. Provera uspešnosti PCR reakcije vršena je na 8% poliakrilamidnom (PAA) gelu u 1xTBE puferu, pri naponu struje od 220V, u trajanju od 30 do 45 minuta. Nakon toga, gel je potapan u vodeni rastvor etidijum bromida i analiziran pod UV svetlom transiluminatora (Vilber Lourmat, France). Etidijum bromid se interkalira u DNK i omogućava njenu vizuelizaciju pod UV osvetljenjem (199).

PCR produkti su bili tretirani restrikcionim enzimima koji, svojom endonukleaznom sposobnošću, specifično prepoznaju DNK sekvence dužine od 4 do 6 bp i seku DNK na mestu zamene nukleotida ili u njegovoj neposrednoj blizini. Sečenjem se dobijaju DNK fragmenti različitih dužina. Prisustvo ili odsustvo restrikcionog mesta ukazuje na prisustvo ili odsustvo analiziranog polimorfizma. Presečeni fragmenti će, budući da su kraći, brže putovati kroz gel ka anodi i odvojiće se od nepresečenih što omogućava vizuelnu detekciju i determinisanje očitano genotipa (200). PCR produkti su bili tretirani odgovarajućim enzimima u trajanju od 10 do 45 minuta na temperaturi od 37 °C (New England Biolabs, USA). Posle digestije, sledila je provera produkata digestije na poliakrilamidnom gelu, analizirana je dužina dobijenih fragmenata i određivani su genotipovi. Korišćeni enzimi su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 1. Utvrđivanje genskih varijanti. Sekvence i temperature topljenja prajmera.

Polimorfizam	Lokus	Sekvenca prajmera	Temperatura topljenja	Broj ciklusa
TERT rs2736098	chr1:11794419 (GRCh38.p12)	F: 5'GCCAGACCCGCCGAAGAAG3'	62 °C	35
		R: 5'GCGCGTGGTCCCAAGCAG3'		
TERT rs2736100	chr1:11796321 (GRCh38.p12)	F: 5'CCCCACAAGCTAAGCATTAT3'	62 °C	35
		R: 5'GAAGAACCACGCAAAGGAC3'		
MTHFR rs1801131	chr5:1293971 (GRCh38.p12)	F: 5'GGTCCCCACTTCCAGCATC3'	60 °C	35
		R: 5'GCAAGTCCCCCAAGGAGG3'		
MTHFR rs1801133	chr5:1286401 (GRCh38.p12)	F: 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3'	52 °C	35
		R: 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3'		

Tabela 2. Dužine PCR produkata, upotrebljeni enzimi i dužine dobijenih fragmenata.

Polimorfizam	PCR produkt	Enzim	Dužina fragmenata	
MTHFR	rs1801131 (A1298C)	163 bp	MboII 5'GAAGA(N) ₈ ↓3' 3'CTTCT(N) ₇ ↑5'	AA: 56, 28, 31, 30, 18 bp AC: 84, 56, 28, 31, 30, 18 bp CC: 84, 31, 30, 18 bp
	rs1801133 (C677T)	198 bp	HinfI 5'G↓ANTC 3' 3'CTNAG↑G5'	CC: 198 bp CT: 198, 175 bp TT: 175 bp
TERT	rs2736098 (G/A)	379 bp	Bsp120I 5'G↓GGCCCC3' 3'CCCGGG↑G5'	GG: 289, 90 bp GA: 379, 289, 90 bp AA: 379 bp
	rs2736100 (A/C)	152 bp	BfmI (SfcI) 5'C↓TRYAG3' 3'GAYRT↑C5'	AA: 152 bp AC: 152, 104, 48 bp CC: 104, 48 bp

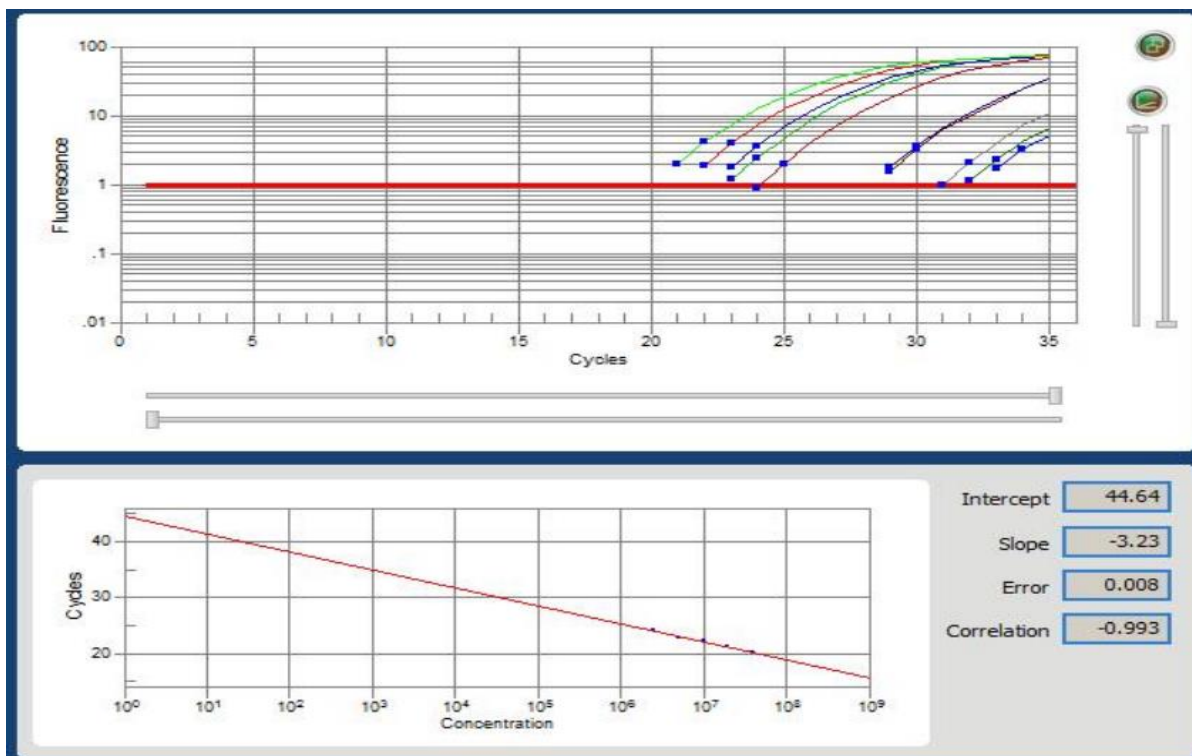
3.8. Određivanje relativne dužine telomera

RTL iz izolata je određivana metodom automatizovane lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time PCR*, ili *quantitative PCR – qPCR*), u odnosu na referentnu unikalnu sekvencu. Metod podrazumeva istovremeno *in vitro* umnožavanje i kvantifikovanje odabranih sekvenci, u ovom istraživanju - telomera, i referentnog gena, prisutnog u jednoj kopiji, u ovom istraživanju - humanog beta globina (HBG), kroz određeni broj ciklusa u kojima se smenjuju faze denaturacije, hibridizacije i elongacije DNK sekvenci. Aparat koji izvodi reakciju umnožavanja (Line GeneK Fluorescence Real-time PCR Detection System, BIOER Technology, Shanghai, China) detektuje fluorescenciju koja nastaje ugrađivanjem fluorescentne boje u DNK sekvencu prilikom svakog ponovljenog ciklusa umnožavanja. Ciklus u kom reakcija umnožavanja ulazi u eksponencijalnu fazu i fluorescencija prelazi prag detekcije predstavlja Ct vrednost (*Cycle threshold*). Ct vrednost je obrnuto srazmerna početnoj količini DNK materijala koji se umnožava, tako da će niža Ct vrednost ukazivati na višu početnu koncentraciju DNK sekvence koja se umnožavala, a viša Ct vrednost na nižu početnu koncentraciju DNK sekvence. Sekvence, koncentracije i temperature topljenja prajmera su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Parametri korišćeni za određivanje RTL.

Prajmer	Sekvenca	Koncentracija	Temperatura topljenja
TEL 1	F:5'CGGTTTGTGGGTTGGGTTGGG TTTGGGTTGGGTT3'	600 nM	56 °C
TEL 2	R:5'GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCC TTACCCTTACCCT3'	600 nM	
HBG 1	F: 5'TCTGACACAAC TGTGTTCACTAGC3'	300 nM	
HBG 2	R: 5'TCTGACACAAC TGTGTTCACTAGC3'	700 nM	

qPCR reakcije za telomere i HBG su puštane simultano kako bi se uspostavili jednaki uslovi prilikom izvođenja obe reakcije. U obe qPCR reakcije zapremina reakcione smeše iznosila je 25 μ l, a komponente smeše činili su: 12,5 μ l SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA), 1 μ l *forward* i 1 μ l *reverse* prajmera za telomere, odnosno HBG, 10 ng DNK iz uzorka i voda do finalne zapremine reakcije. U svakoj reakciji korišćena je referentna tumorska DNK (293T) u serijskom razblaženju, 2.5 ng/ μ l-5ng/ μ l-10ng/ μ l-20ng/ μ l-40ng/ μ l, za izradu standardne krive i praćenja efikasnosti reakcije. Standardne krive koje su se prihvatale bile su nagiba od -3.2 do -3.7 i koeficijenta linearne korelacije (R^2) \geq 0.98, Slika 22.



Slika 22. Formiranje standardne krive na osnovu Ct vrednosti serijskih razblaženja referentne DNK.

Registrovani fluorescentni telomerni PCR signal odgovarao je dužini telomera, odnosno broj parova prajmera koji se na početku reakcije vezao za telomerne ponovke bio je direktno proporcionalan ukupnoj dužini telomera u uzorku. PCR signal poreklom od HBG odgovarao je broju ćelija jer se samo dva para prajmera moglo vezivati na početku reakcije za HBG, budući da je izabrani gen prisutan samo u jednoj kopiji u ćeliji, tj. po jedan na svakom homologom hromozomu. Koristeći opisani način, prosečna dužina telomera u ćeliji dobija se kada se intenzitet PCR telomernog signala podeli intenzitetom PCR signala unikalne sekvence, T/S odnos (broj telomernih ponovaka/broj gena prisutnog u jednoj kopiji).

Ct vrednosti (srednja vrednost) dobijene za telomere i HBG korišćene su za računanje relativnog T/S odnosa koji je dobijen upotrebom formule:

$$T / S = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

gde je:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{telomere}} - Ct_{\text{HBG}}) \text{ ispitivanog uzorka} - (Ct_{\text{telomere}} - Ct_{\text{HBG}}) \text{ referentnog DNK uzorka}$$

Na ovaj način, dobijena je RTL za svaki uzorak (201, 202).

3.9. Statistička obrada rezultata ispitivanja

Klasifikacija individualnih parametara, dobijenih kliničkim i laboratorijskim ispitivanjima, njihova statistička obrada i grafički prikazi rezultata su vršeni pomoću specijalizovanih R-softverskih paketa (*R Core Team, 2017*). Statistička analiza je obuhvatila deskriptivnu statistiku, mašinsko učenje, kao i metode inferencijalne statistike.

Za deskriptivnu statistiku su korišćene mere centralne tendencije i mere raspršenosti podataka prikazane tabelarno.

Predviđanje kliničkih ishoda je od suštinskog značaja za blagovremeno otkrivanje eventualnog pogoršanja stanja pacijenata, kao i za olakšavanje opterećenosti zdravstvenog sistema. Podaci ekstrahovani iz zdravstvenih kartona pacijenata mogu se koristiti za razvijanje i procenu prediktivnih modela mašinskog učenja. Ukoliko je više relevantnih podataka specifičnih za pacijenta i oboljenje prikupljeno i integrisano u model, utoliko je prediktivna moć modela veća. Donošenje odluka u kliničkoj praksi je već uveliko pod uticajem predviđanja i preporuka dobijenih korišćenjem statističkih modela i veštačke inteligencije, a na osnovu dostupnih demografskih, medicinskih, terapijskih i genetičkih informacija pojedinaca i populacije. Razvijene su brojne aplikacije za mašinsko učenje, a posebno se ističu modeli za predviđanje ishoda oboljenja i lečenja. Mašinsko učenje, primenom veštačke inteligencije, prepoznaje obrasce unutar velikog skupa medicinskih podataka i transformiše ih u predviđanje kliničkih ishoda u određenom vremenskom period (203).

Mašinskim učenjem pomoću softverskih paketa “*randomForest*” i “*Boruta*” su određene nezavisne varijable koje su značajno povezane sa zavisnom varijablom RTL. Podaci su podvrgnuti mašinskom učenju bez nadzora koje koristi algoritme za analizu, grupisanje i otkrivanje obrazaca ili grupisanja podataka bez potrebe za ljudskom intervencijom. Uticaj varijabli izdvojenih na opisani način je proveravan metodama inferencijalne statistike.

Inferencijalna statistika je obuhvatila testove prema vrsti varijabli. Za kontinualno promenljive varijable korišćen je Man-Vitnjev U test. Kruskal-Volisov test je korišćen za analizu varijanse između više od dve kategorije. Odnos između dve kvantitativne varijable je testiran Kendalovim testom, dok je vizuelizacija rezultata statističkog testiranja vršena korišćenjem „*ggpub*“ R paketa (204). Uklapanje distribucije genotipova u Hardi-Vajnbergovu ravnotežu (HVE) proveravano je korišćenjem Hi-kvadrat testa. Navedeni testovi su izvedeni korišćenjem ugrađenog R paketa „*stats*“ (verzija 3.6.2, R Core Team, Beč, Austrija), nakon čega je usledio Danov post-hoc test sa Holmovom korekcijom za višestruka poređenja (205). Za sva statistička testiranja, prag značajnosti je postavljen na konvencionalni nivo od 0.05. Snaga statističkog testa je bila 0.8.

Granične vrednosti parametara korišćenih za određivanje statusa hiperlipidemije bile su sledeće: nivo holesterola $>5,2$ mmol/l i nivo triglicerida $>1,7$ mmol/l (206). Vrednosti glikemije iznad 6,1 mmol/l smatrane su povišenim (207). Arterijska hipertenzija okarakterisana je vrednošću pritiska ≥ 140 mmHg (208). Granične vrednosti navedenih markera određene su nacionalnim smernicama koje donosi Ministarstvo zdravlja Republike Srbije.

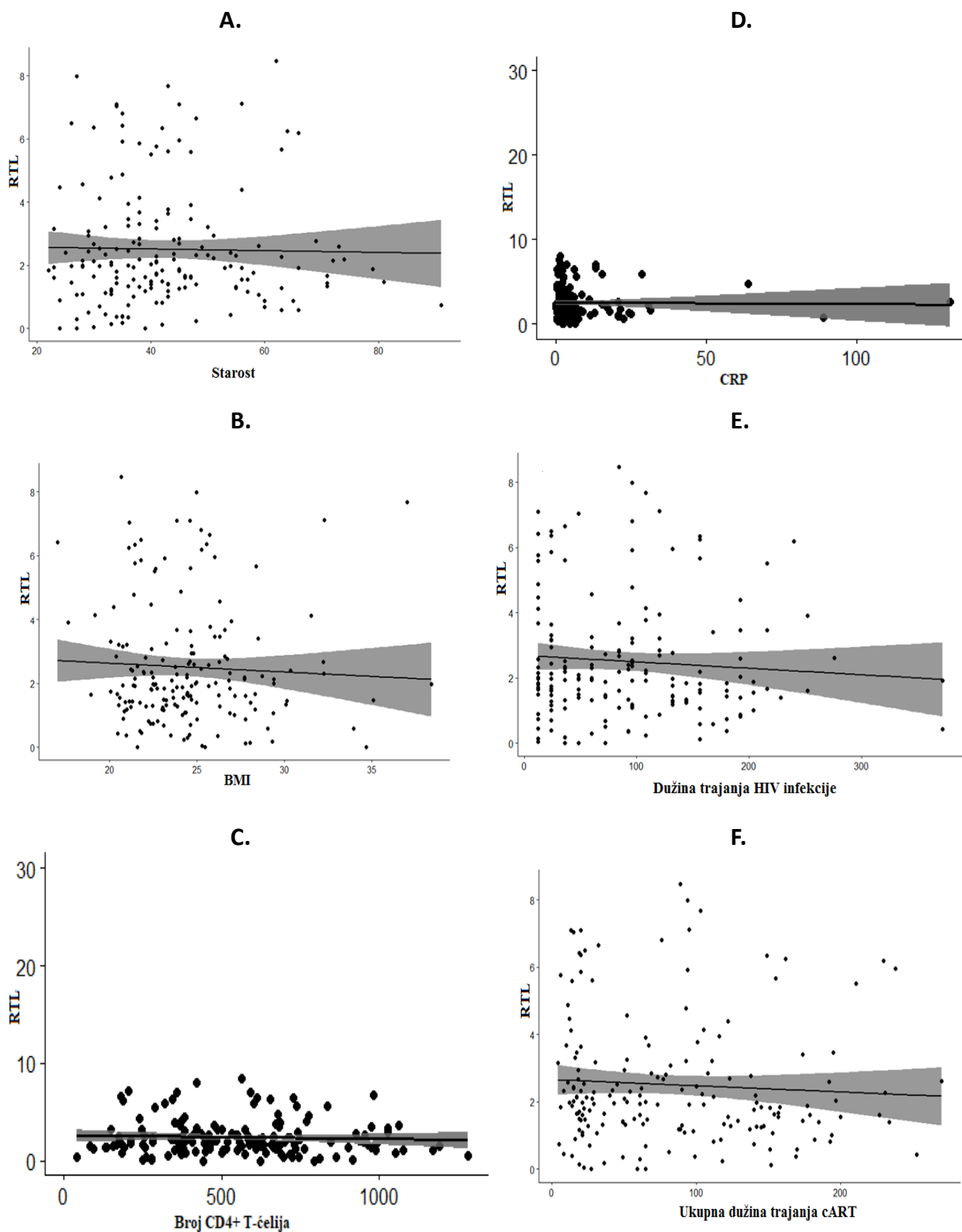
4. REZULTATI

4.1. Opšte karakteristike pacijenata

Ukupno 176 pacijenata koji su ispunili kriterijume su uključeni u ispitivanje. Prosečna starost pacijenata u ovom uzorku je iznosila $42,70 \pm 13,18$ godina, dok je njihov prosečan BMI bio $24,51 \pm 3,49$ kg/m². Prosečan broj CD4+ T-ćelija pacijenata je iznosio $554 \pm 259,68$ ćelija/ μ l plazme. Svi uključeni pacijenti su imali ≤ 50 kopija HIV RNA/ml plazme. Srednja vrednost CRP-a je iznosila $5,57 \pm 5,43$ mg/l. Ukupno trajanje HIV infekcije je u proseku iznosilo $92,42 \pm 72,22$ meseca, dok su pacijenti primali cART u proseku $82,02 \pm 64,81$ meseca. Srednja vrednost RTL za celu grupu pacijenata je iznosila $2,50 \pm 1,87$. Kendalov test korelacije je pokazao da nijedna od navedenih karakteristika pacijenata nije bila u korelaciji sa RTL. Navedeni rezultati su prikazani u Tabeli 4 i na Slici 23.

Tabela 4. Osnovne karakteristike pacijenata i njihova korelacija sa RTL.

Varijabla	Srednja vrednost \pm SD	<i>p</i> vrednosti dobijene Kendalovim testom korelacije varijable sa RTL
Starost (godine)	$42,70 \pm 13,18$	$p = 0,904$
BMI (kg/m ²)	$24,51 \pm 3,49$	$p = 0,551$
Broj CD4+ T-ćelija (ćelija/ μ l)	$554 \pm 259,68$	$p = 0,536$
CRP (mg/l)	$5,57 \pm 5,43$	$p = 0,264$
Dužina trajanja HIV infekcije (meseci)	$92,42 \pm 72,22$	$p = 0,220$
Ukupna dužina trajanja cART (meseci)	$82,02 \pm 64,81$	$p = 0,095$



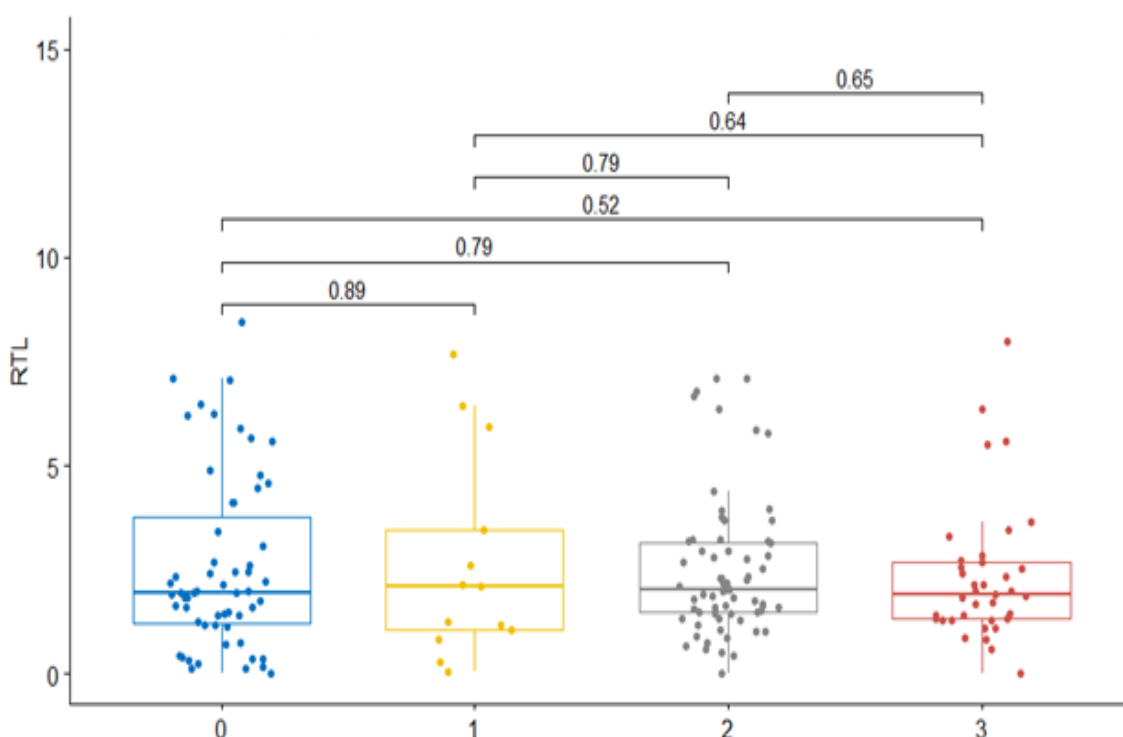
Slika 23. Osnovne karakteristike pacijenata i njihova korelacija sa RTL. Kendalov test korelacije osnovnih karakteristika pacijenata sa RTL. **A.** Uticaj starosti na RTL ($p = 0,904$). **B.** Uticaj BMI na RTL ($p = 0,551$). **C.** Uticaj broja CD4+ T-ćelija na RTL ($p = 0,536$). **D.** Uticaj CRP-a na RTL ($p = 0,264$). **E.** Uticaj dužine trajanja HIV infekcije na RTL ($p = 0,220$). **F.** Uticaj ukupne dužine trajanja HIV infekcije na RTL ($p = 0,095$).

4.2. Uticaj hiperlipidemije na RTL

Vrsta hiperlipidemije nije uticala na vrednost RTL kod pacijenata ($p = 0,94$), tj. razlika u dužini telomera između pacijenata bez hiperlipidemije, pacijenata sa hipertrigliceridemijom, pacijenata sa hiperholesterolemijom i pacijenata sa mešovitim tipom hiperlipidemije (pacijenti sa hipertrigliceridemijom i sa hiperholesterolemijom) nije bila statistički značajna (Tabela 5 i Slika 24). Nije bilo značajne međusobne razlike u RTL između pacijenata koji nisu koristili terapiju za hiperlipidemiju, pacijenata koji su koristili fibrine i pacijenata koji su koristili statine ($p = 0,342$).

Tabela 5. Uticaj hiperlipidemije na vrednost RTL kod pacijenata.

Hiperlipidemija	Broj pacijenata (%)	RTL
Bez hiperlipidemije	59 (33,5)	$2,58 \pm 2,08$
Hipertrigliceridemija	13 (7,4)	$2,69 \pm 2,48$
Hiperholesterolemija	67 (38,1)	$2,49 \pm 1,68$
Mešoviti tip	37 (21,0)	$2,33 \pm 1,66$



Slika 24. Rezultati Kruskal-Voliovog testiranja uticaja hiperlipidemije na RTL. 0 – RTL kod pacijenata bez hiperlipidemije, 1 – RTL kod pacijenata sa hipertrigliceridemijom, 2 – RTL kod pacijenata sa hiperholesterolemijom, 3 – RTL kod pacijenata sa mešovitim tipom hiperlipidemije.

4.3. Uticaj nivoa glukoze u krvi na RTL

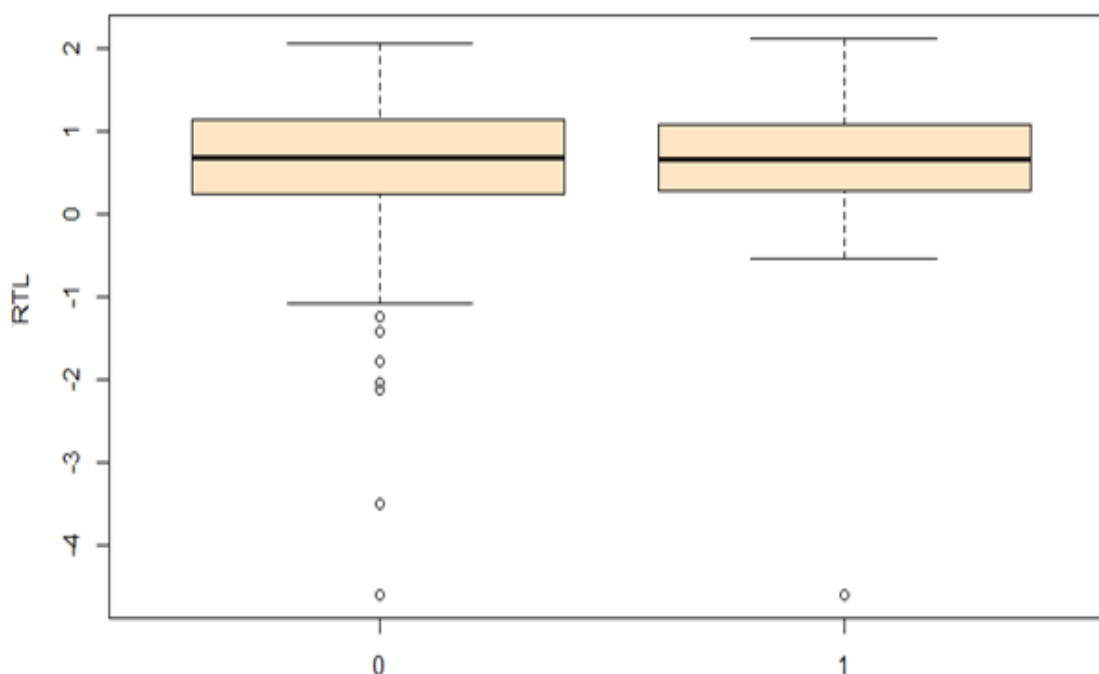
RTL se nije značajno razlikovala između grupe pacijenata sa normalnim nivoom glukoze u krvi u odnosu na grupu od 13 pacijenata sa povišenim nivoom glukoze u krvi ($p = 0,082$). Prисуство dijabetesa tipa 2 (kod 8 pacijenata) nije imalo značajan uticaj na RTL ($p = 0,695$). Insulin je uzimalo samo 7 pacijenata, a njihova RTL nije bila značajno različita u odnosu na RTL pacijenata koji nisu uzimali terapiju za dijabetes ($p = 0,272$).

4.4. Uticaj hipertenzije na RTL

Pacijenti sa visokim krvnim pritiskom nisu imali značajno duže telomere u odnosu na pacijente sa normalnim krvnim pritiskom ($p = 0,889$), Tabela 6 i Slika 25.

Tabela 6. Uticaj hipertenzije na vrednost RTL kod pacijenata.

Vrednost krvnog pritiska	Broj pacijenata (%)	RTL
Normalna	122 (69,3)	$2,45 \pm 1,80$
Povišena	54 (30,7)	$2,62 \pm 2,03$



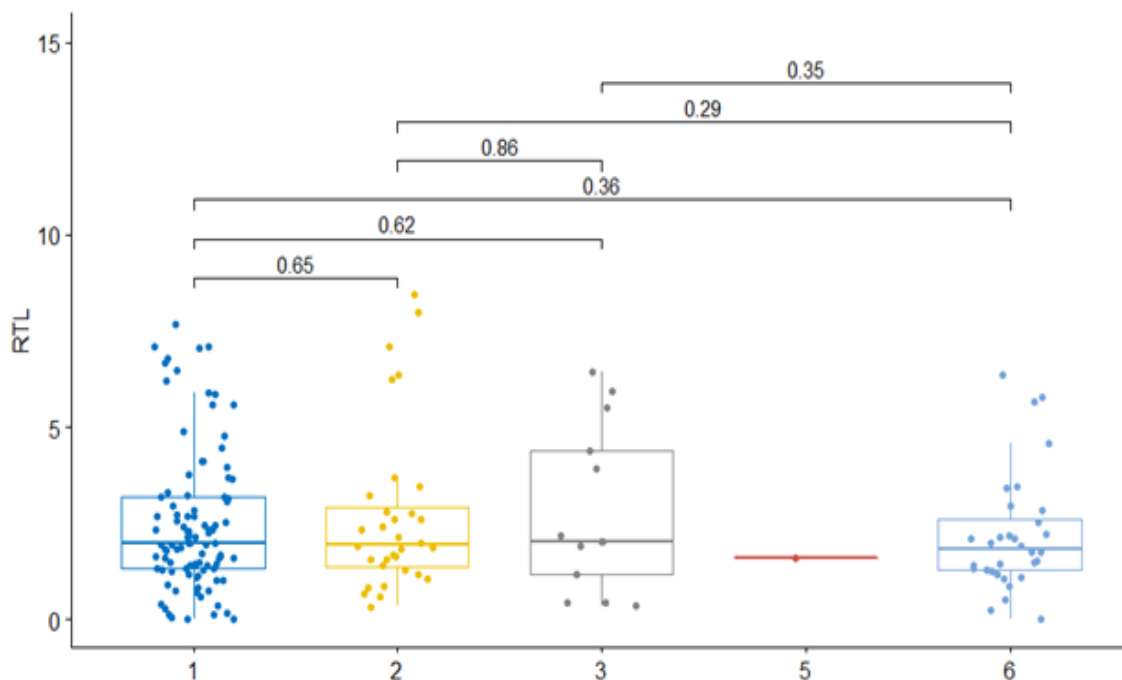
Slika 25. Rezultati Velčovog t-testa uticaja hipertenzije na RTL. 0 – RTL kod pacijenata bez hipertenzije, 1 – RTL kod pacijenata sa hipertrigliceridemijom, 2 – RTL kod pacijenata sa hipertenzijom.

4.5. Uticaj transmisije HIV-a na RTL

Mehanizam HIV-transmisije nije uticao na razliku u RTL među pacijenatima koji su inficirani od strane homoseksualnog partnera, pacijenata inficiranih od strane heteroseksualnog partnera, pacijenata koji su se zarazili prilikom intravenske upotrebe psihoaktivnih supstanci, pacijenata koji su se zarazili transfuzijom krvi i pacijentima sa nepoznatim načinom transmisije ($p = 0,882$), Tabela 7 i Slika 26. U ovom istraživanju nije bilo pacijenata zaraženih vertikalnom transmisijom.

Tabela 7. Uticaj mehanizma transmisije na vrednost RTL kod pacijenata.

Mehanizam HIV-transmisije	Broj pacijenata (%)	RTL
Homoseksualna transmisija	97 (55,1)	2,50 ± 1,86
Heteroseksualna transmisija	33 (18,8)	2,63 ± 2,17
Intravenska upotreba psihoaktivnih supstanci	13 (7,4)	3,01 ± 2,03
Vertikalna transmisija	0 (0,0)	/
Transfuzija	1 (0,6)	1,61
Nepoznat mehanizam transmisije	32 (18,2)	2,20 ± 1,54



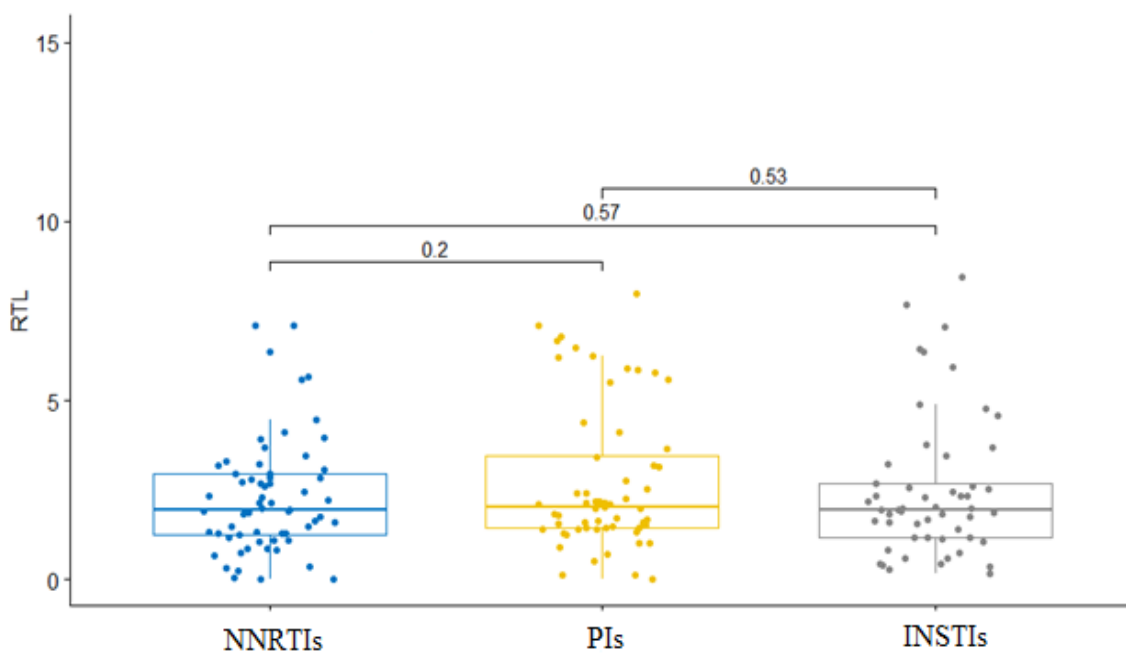
Slika 26. Rezultati Kruskal-Willisonovog testiranja uticaja mehanizma transmisije na RTL. 1 – RTL pacijenata inficiranih homoseksualnim putem, 2 – RTL pacijenata inficiranih heteroseksualnim putem, 3 – RTL pacijenata inficiranih putem intravenskih korišćenja psihoaktivnih supstanci, 5 – RTL pacijenta inficiranog putem transfuzije krvi, 6 – RTL pacijenata inficiranih nepoznatim putem.

4.6. Uticaj terapijskog režima na RTL

Od ukupno 176 pacijenata, 53 (30,1%) su koristili lekove iz klase II u prosečnom trajanju od $18,86 \pm 18,75$ meseci, 60 pacijenata (34,1%) je koristilo lekove iz klase PI u prosečnom trajanju od $23,60 \pm 23,03$ meseci i 63 (35,8%) su koristili lekove iz klase NNIRT prosečno $37,38 \pm 29,96$ meseci, zajedno sa dva leka iz klase NIRT kao okosnicom cART-a, Tabela 8. Kruskal-Volisov test nije pokazao statistički značajnu razliku ($p = 0,761$) u RTL između tri terapijske grupe u okviru cART, različite po mehanizmu delovanja leka: RTL kod pacijenata koji su koristili II je bila $2,49 \pm 1,89$, kod pacijenata koji su koristili PI je iznosila $2,73 \pm 2,03$, a kod pacijenata koji su koristili NNIRT $2,30 \pm 1,62$ (Slika 27).

Tabela 8. RTL pacijenata koji primaju različite klase lekova u okviru cART.

Trenutni cART	Broj pacijenata (%)	Prosečno trajanje trenutne cART (u mesecima)	RTL (Srednja vrednost \pm SD)	$p = 0,761$
2NIRT + II	53 (30,1)	$18,86 \pm 18,75$	$2,49 \pm 1,98$	
2NIRT + PI	60 (34,1)	$23,60 \pm 23,03$	$2,73 \pm 2,03$	
2NIRT + NNIRT	63 (35,8)	$37,38 \pm 29,96$	$2,30 \pm 1,62$	



Slika 27. Rezultati Kruskal-Volisovog testiranja uticaja mehanizma delovanja klase leka (mehanizma delovanja leka) u okviru cART na vrednosti RTL pacijenata.

Kombinaciju dva leka, u okviru klase NIRT, lamivudina i abakavira je koristilo 111 (63,1%) pacijenata. 60 pacijenata je koristilo tenofovir sa emtricitabinom i 5 (2,8%) pacijenata je koristilo lamivudin sa zidovudinom. Što se tiče klase II, dolutegravir je bio u upotrebi kod više pacijenata nego raltegravir: 40 (75,5%) u odnosu na 13 (24,5%), respektivno. U okviru

klase PI, 48 (80%) pacijenata je koristilo darunavir sa farmakokinetičkim pojačivačem ritonaviro. 9 (15%) pacijenata je uzimalo fosamprenavir sa ritonaviro, dok je samo 3 (5%) pacijenta koristilo lopinavir sa ritonaviro. Što se tiče NNIRT klase lekova, efavirenz je koristilo 53 (84,1%) pacijenta, a nevirapin je koristilo 10 (15,9%) pacijenata.

Rezultati Kruskal-Volisovog testiranja (između tri grupe pacijenata u okviru klase cART-a) i Man-Vitnijevog testiranja (između dve grupe pacijenata u okviru klase cART-a) nisu ukazali na postojanje statistički značajne razlike između RTL pacijenata u okviru klase II ($p = 0,187$), klase PI ($p = 0,790$), kao ni u okviru klase NIRT ($p = 0,277$). Međutim, unutar klase NNIRT javila se statistički značajna razlika u dužini telomera između pacijenata koji su koristili efavirenz i onih koji su uzimali nevirapin ($p = 0,018$).

Vrednosti RTL pacijenata svrstanih u grupe na osnovu terapijskih režima u okviru različitih klasa cART-a i rezultati statističkog testiranja uticaja terapijskog režima na RTL su prikazani u Tabeli 9.

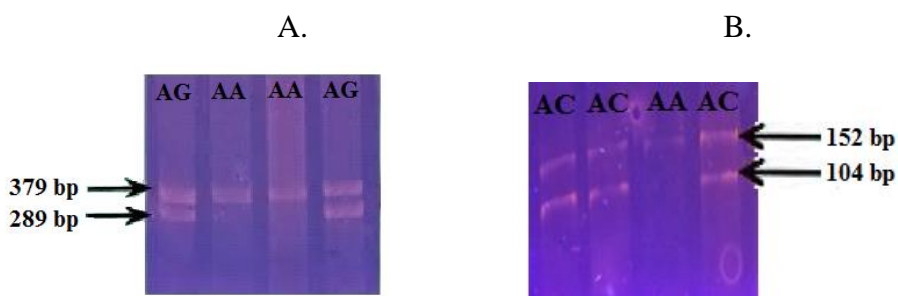
Tabela 9. RTL kod pacijenata na različitim terapijskim režimima u okviru cART.

cART klasa	Terapijski režim u okviru cART klase	Broj pacijenata na režimu (%)	RTL (Srednja vrednost \pm SD)	Uticaj terapijskog režima na RTL
II	Dolutegravir	40 (75,5)	2,69 \pm 2,11	$p = 0,187$
	Raltegravir	13 (24,5)	1,87 \pm 1,37	
PI	Darunavir + Ritonavir	48 (80)	2,68 \pm 1,99	$p = 0,790$
	Fosamprenavir + Ritonavir	9 (15)	2,82 \pm 2,34	
	Lopinavir + Ritonavir	3 (5)	3,23 \pm 2,33	
NNIRT	Efavirenz	53 (84,1)	2,10 \pm 1,55	$p = 0,018$
	Nevirapin	10 (15,9)	3,33 \pm 1,63	
NIRT	Lamivudin + Abakavir	111 (63,1)	2,44 \pm 1,84	$p = 0,277$
	Tenofovir + Emtricitabin	60 (34,1)	2,00 \pm 1,94	
	Lamivudin + Zidovudin	5 (2,8)	3,59 \pm 1,60	

Rezultati multivarijantne regresione analize pokazali su blagi negativan efekat inhibitora integraze na RTL sa vrednošću koeficijenta -1,13 i $p = 0,047$. Međutim, ukupni model je imao nizak značaj (F-statistika, $p = 0,7$), bivarijantna povezanost između RTL i tipa inhibitora integraze nije bila značajna ($p = 0,69$). Statistička moć multivarijantne regresije bila je 0,78 sa veličinom efekta od 0,1.

4.7. Uticaj polimorfizama TERT gena na RTL

Umnožavanje fragmenata TERT gena je rađeno PCR metodom. Nakon umnožavanja, PCR produkti su podvrgnuti digestiji restrikcionim enzimima, a genotipovi očitani vizuelno po izvršenoj elektroforezi na akril amidnom gelu (Slika 28).



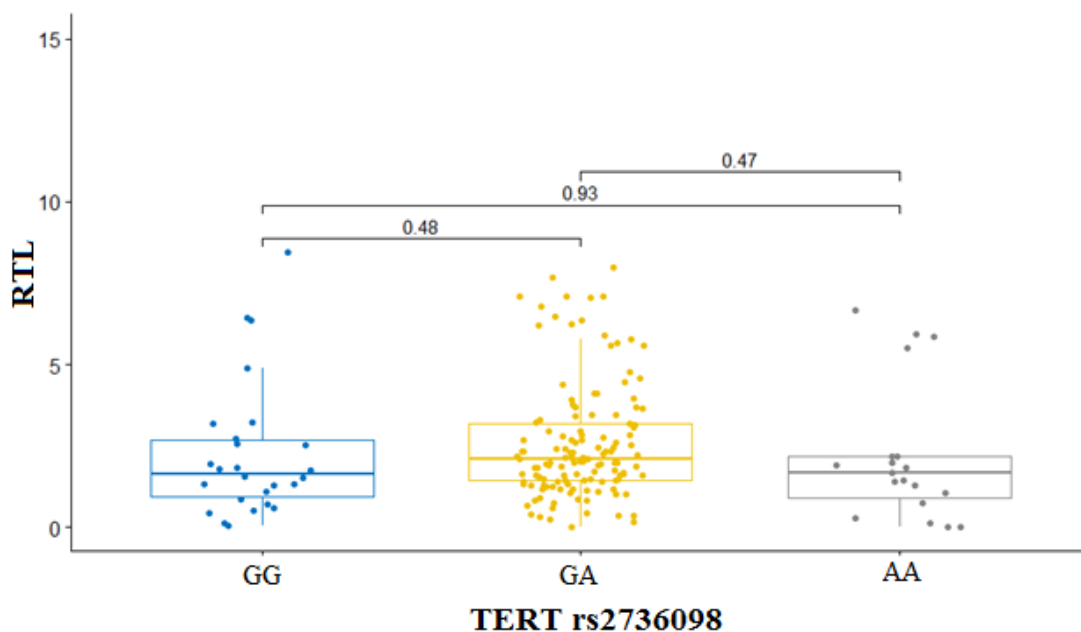
Slika 28. Elektroforeza TERT polimorfizama. A. TERT rs2736098. Kao rezultat digiranja PCR produkta dužine 374 bp restrikcionim enzimom *Bsp120I*, dobijaju se pojedinačni fragment dužine 379 bp, odnosno nema restrikcionog mesta u fragmentu (A alel) ili dva fragmenta dužine 289 i 90 bp (G alel). B. TERT rs2736100. Kao rezultat digiranja PCR produkta dužine 152 bp restrikcionim enzimom *BfmI* (*SfcI*), dobija se pojedinačni fragment dužine 152 bp, odnosno nema restrikcionog mesta u fragmentu (A alel) ili dva fragmenta dužine 104 i 48 bp (C alel).

Dobijene i očekivane učestalosti genotipova TERT rs2736098 su se značajno razlikovale, pa se može zaključiti da genotipovi nisu u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži ($p < 0.0001$). Dobijene i očekivane učestalosti genotipova TERT rs27362100 se nisu značajno razlikovale, pa se zaključuje da genotipovi jesu u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži ($p = 0.2443$). Učestalosti genotipova ispitivanih TERT polimorfizama i njihove RTL su prikazane u Tabeli 10.

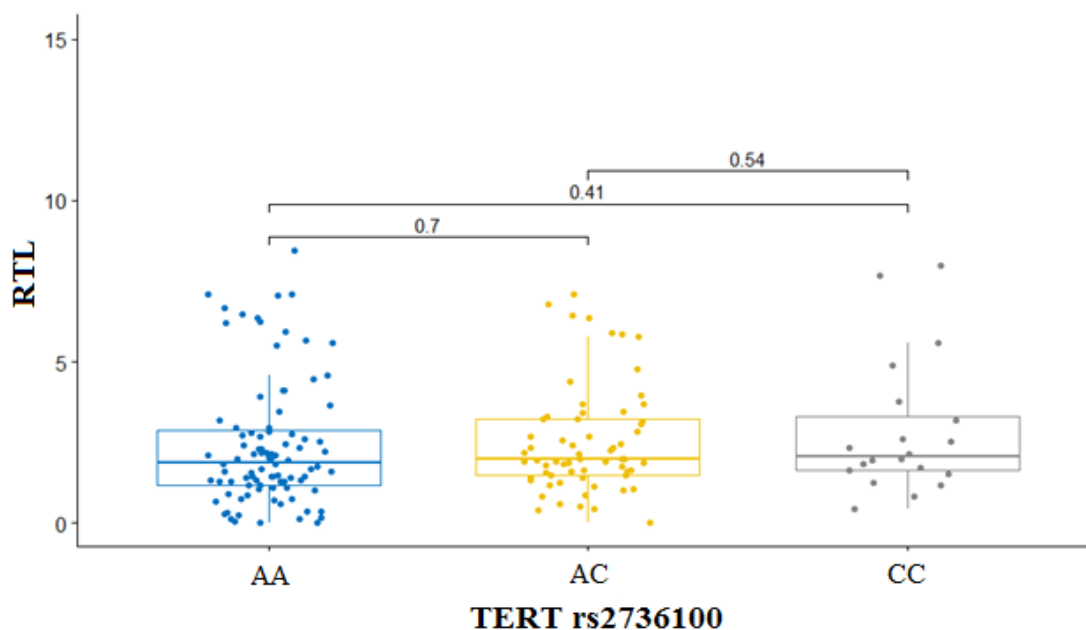
Tabela 10. Učestalosti genotipova: TERT rs2736098 i TERT rs2736100 polimorfizama i vrednosti RTL.

Polimorfizam	Genotip	Broj pacijenata (%)	χ^2_{HWE}	p^{HWE}	RTL	χ^2_{RTL}	p^{RTL}
TERT rs2736098	GG	27 (15,3)	40,6064	< 0,0001	2,27 ± 2,06	4,2542	0,119
	GA	130 (73,9)			2,59 ± 1,80		
	AA	19 (10,8)			2,21 ± 2,13		
TERT rs2736100	AA	92 (52,3)	2,8187	0,2443	2,41 ± 1,96	1,9141	0,384
	AC	64 (36,4)			2,52 ± 1,66		
	CC	20 (11,3)			2,85 ± 2,12		

Rezultati Kruskal-Volisoovog testa nisu pokazali značajnost u razlici RTL između nosilaca različitih genotipova TERT rs2736098 (GG/GA/AA), a ni TERT rs27362100 polimorfizma (AA/AC/CC), Slike 29 i 30.



Slika 29. Rezultati Kruskal-Volisovog testiranja uticja TERT rs2736098 genotipa na RTL pacijenata.



Slika 30. Rezultati Kruskal-Volisovog testiranja uticja TERT rs2736100 genotipa na RTL pacijenata.

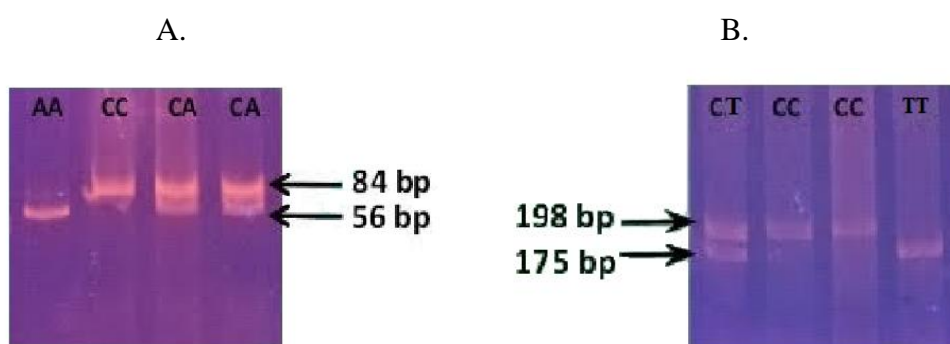
Međutim, nosioci TERT rs2736098 GG+AA genotipova su imali značajno kraće telomere ($p = 0,049$) u poređenju sa pacijentima koji su nosioci GA genotipa (Tabela 11), tj. heterozigoti su pokazali biološku prednost u odnosu na dominantne i recesivne homozigote. U okviru TERT rs2736100 polimorfizma, s druge strane, nijedna kombinacija genotipova nije pokazala povezanost sa RTL. Treba ipak napomenuti da je postojalo postepeno povećanje RTL sa svakim C alelom, ali bez statističkog značaja.

Tabela 11. Povezanost različitih kombinacija genotipova TERT rs2736098 i TERT rs2736100 polimorfizama sa RTL.

Polimorfizam	Kombinacije genotipova	Broj pacijenata	RTL	<i>p</i> vrednost
TERT rs2736098	GG + GA	157	2,00 ± 1,86	0,153
	AA	19	1,66 ± 1,44	
	AA + GA	149	2,00 ± 1,84	0,431
	GG	27	1,75 ± 1,85	
	GG + AA	46	1,70 ± 1,77	
TERT rs2736100	AA + AC	156	1,96 ± 1,85	0,404
	CC	20	2,06 ± 2,05	
	CC + AC	84	1,98 ± 1,73	0,182
	AA	92	1,88 ± 1,75	
	AA + CC	112	1,96 ± 1,69	
	AC	64	1,98 ± 1,76	0,403

4.8. Uticaj polimorfizama MTHFR gena na RTL

Umnožavanje fragmenata MTHFR gena je rađeno PCR metodom. Nakon umnožavanja, PCR produkti su podvrgnuti digestiji restrikcioniim enzimima, a genotipovi očitani vizuelno po izvršenoj elektroforezi na akril amidnom gelu (Slika 31).



Slika 31. Elektroforeza MTHFR polimorfizama. A. MTHFR rs1801131. Kao rezultat digeriranja PCR produkta dužine 163 bp restrikcioniim enzimom *Mbo II*, dobijaju se četiri fragmenata dužine 84, 31, 30 i 18 bp (C alel) ili pet fragmenata dužine 56, 31, 30, 28 i 18 bp (A alel). B. MTHFR rs 1801133.

Kao rezultat digeriranja PCR produkta dužine 198 bp restrikcioniim enzimom *Hinf I*, dobija se pojedinačni fragment dužine 198 bp, odnosno nema restrikcionog mesta u fragmentu (C alel) ili dva fragmenta dužine 175 i 23 bp (T alel).

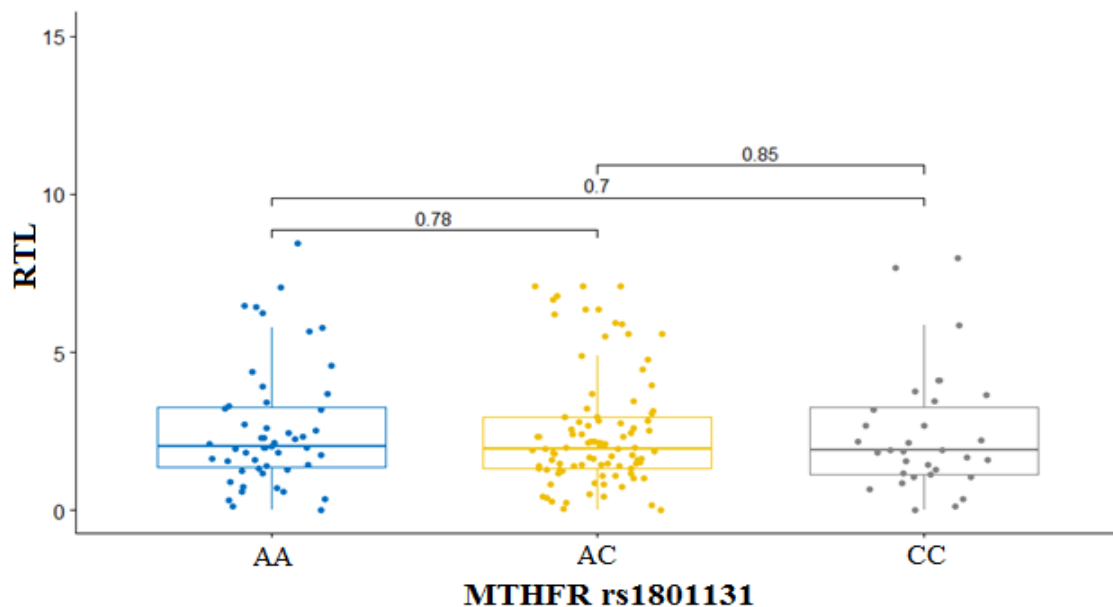
Dobijene i očekivane učestalosti genotipova MTHFR rs1801131 i MTHFR rs1801133 polimorfizama se nisu značajno razlikovale, pa se zaključuje da genotipovi oba polimorfizma

jesu u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži ($p = 0,618$ i $p = 0,096$, respektivno). Učestalosti genotipova ispitivanih MTHFR polimorfizama i njihove RTL su prikazane u Tabeli 12.

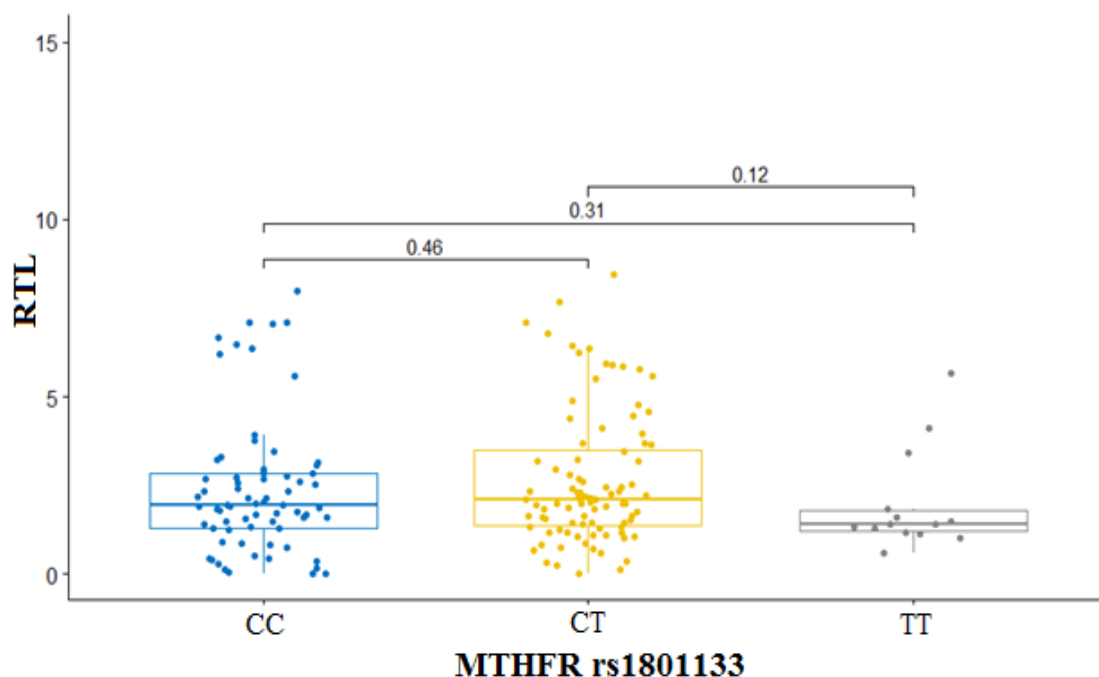
Tabela 12. Učestalosti genotipova: MTHFR rs1801131 i MTHFR rs1801133 poliorfizama.

Polimorfizam	Genotip	Broj pacijenata (%)	χ^2_{HWE}	p^{HWE}	RTL	χ^2_{RTL}	p^{RTL}
MTHFR rs1801131	AA	51 (29,0)	0,9641	0,618	$2,58 \pm 1,93$	2,9155	0,233
	AC	93 (52,8)			$2,49 \pm 1,84$		
	CC	32 (18,2)			$2,41 \pm 1,92$		
MTHFR rs1801133	CC	70 (39,8)	4,6887	0,096	$2,42 \pm 1,93$	1,9141	0,384
	CT	92 (52,2)			$2,65 \pm 1,89$		
	TT	14 (8,0)			$1,96 \pm 1,42$		

Rezultati Kruskal-Volisovog testa nisu pokazali značajnost u razlici RTL među nosiocima različitih genotipova MTHFR rs1801131, kao ni MTHFR rs1801133 polimorfizma, Slike 32 i 33.



Slika 32. Rezultati Kruskal-Volisovog testiranja uticaja MTHFR rs1801131 genotipa na RTL pacijenata.



Slika 33. Rezultati Kruskal-Volisovog testiranja uticaja MTHFR rs1801133 genotipa na RTL pacijenata.

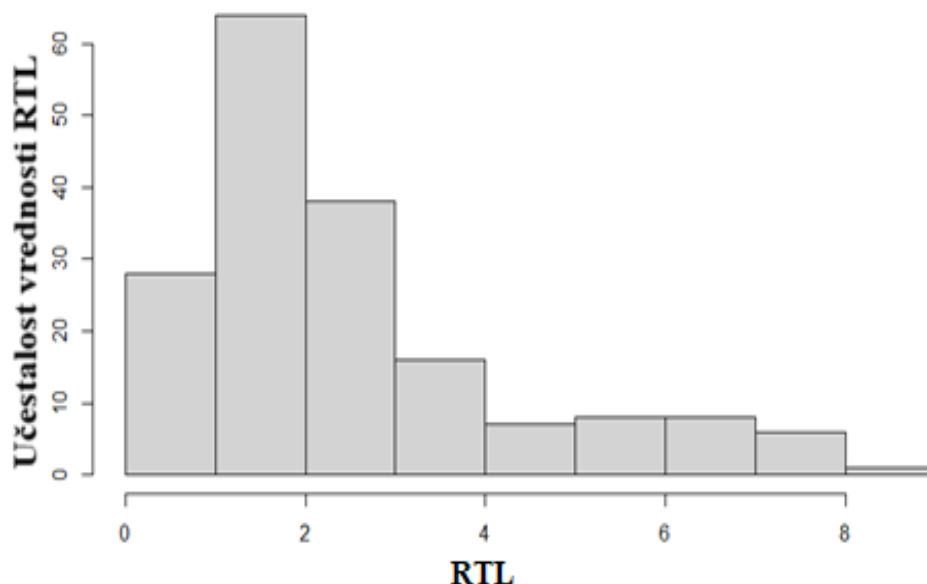
Nijedna kombinacija genotipova MTHFR rs1801131 i MTHFR rs1801133 polimorfizama nije pokazala povezanost sa RTL, Tabela 13. U okviru polimorfizma rs1801131 se uočava izvesno povećanje RTL sa svakim A alelom, međutim, bez statističkog značaja.

Tabela 13. Povezanost MTHFR rs1801131 i MTHFR rs18011313 polimorfizama sa RTL.

Polimorfizam	Kombinacije genotipova	Broj pacijenata	RTL	<i>p</i> vrednost
MTHFR rs1801131	AA + AC	144	2,52 ± 1,87	0,592
	CC	32	2,41 ± 1,92	
	AC + CC	125	2,47 ± 1,85	0,829
	AA	51	2,58 ± 1,93	
MTHFR rs1801133	AA + CC	83	2,52 ± 1,92	0,9468
	AC	93	2,49 ± 1,84	
	CC + CT	162	2,55 ± 1,90	0,805
	TT	14	1,96 ± 1,42	
	CT + TT	106	2,55 ± 1,84	0,171
	CC	70	2,42 ± 1,93	
CC + TT	84	2,34 ± 1,85	0,2597	
CT	92	2,65 ± 1,80		

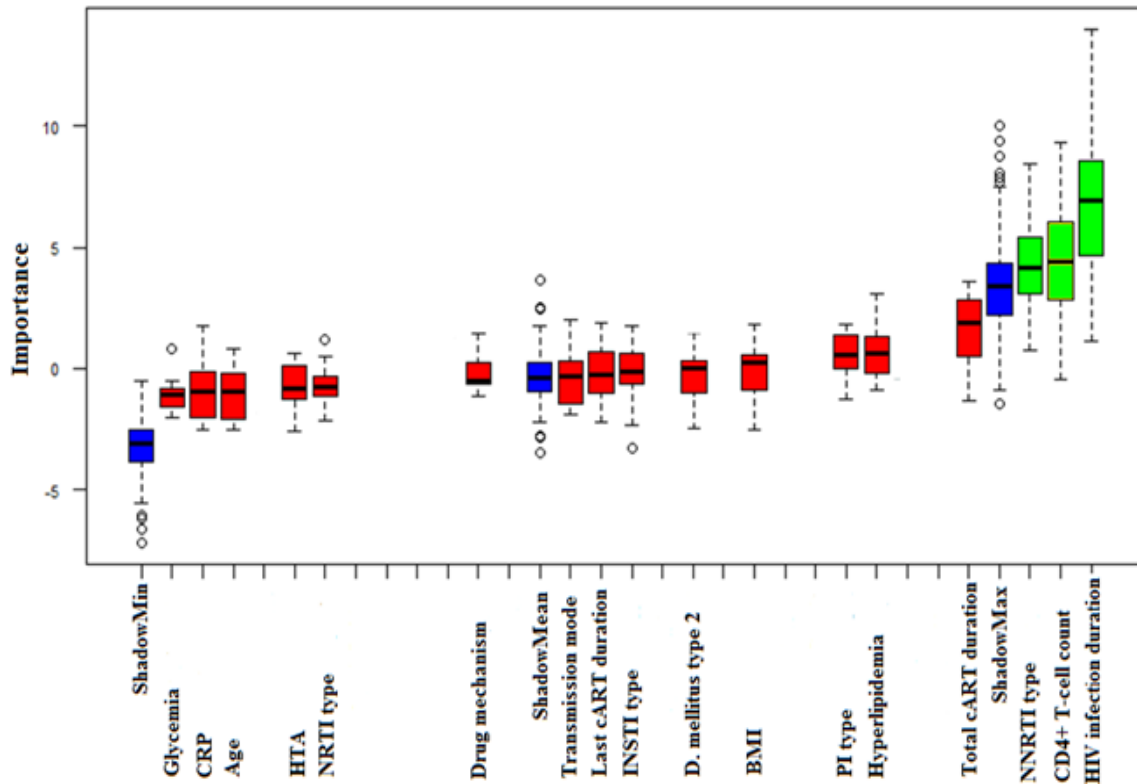
4.9. Varijable od značajnog uticaja na RTL

Kako bi se na najobjektivniji način otkrile nezavisne varijable koje su značajno povezane sa zavisnom varijablom RTL, podaci su podvrgnuti mašinskom učenju bez nadzora, prilikom kojeg je kao ishod određena vrednost RTL veća ili manja od 4, a na osnovu histograma raspodele RTL, Slika 34.



Slika 34. Raspodela učestalosti RTL.

Rezultati mašinskog učenja dobijeni korišćenjem *R* softverskih paketa '*randomForest*' i '*Boruta*', sugerisali su postojanje tri varijable koje bi mogle imati značajni uticaj na RTL: trajanje HIV-infekcije, broj CD4+ T-ćelija i cART koja sadrži NNIRT. Ovi rezultati su prikazani na Slici 35. Kendalov korelacioni test nije dokazao značajnu povezanost između trajanja HIV-infekcije i RTL ($p = 0,220$). Zatim, Kendalov korelacioni test nije uspeo da potvrdi broj CD4+ T-ćelija kao promenljivu koja je značajno povezana sa RTL ($p = 0,536$). Međutim, terapijski režim u okviru NNIRT koji su pacijenti primali bio je varijabla čiju povezanost sa RTL je potvrdio Mann-Vitnijev test. Preciznije, HIV-om inficirani pacijenti koji su koristili efavirenz imali su značajno kraće telomere ($2,10 \pm 1,55$) u poređenju sa pacijentima koji su uzimali nevirapin ($3,33 \pm 1,63$) u okviru cART-a ($p = 0,018$).



Slika 35. Rezultati mašinskog učenja, uticaj različitih varijabli na RTL. *ShadowMax*, *ShadowMean* i *ShadowMin* predstavljaju vrednosti Z-skora u dupliranim i nasumično izmešanim podacima u prvim koracima 'Boruta' algoritma, koji se koristi za određivanje značaja varijable u skupu podataka koji se proučava, prikazane su plavom bojom. Varijable na koje mašinsko učenje nije ukazalo kao na značajne su prikazane crvenom bojom na grafikonu, dok su varijable prepoznate kao značajne prikazane zelenom bojom.

5. DISKUSIJA

Poslednjih godina je prerano starenje HIV-om inficiranih pacijenata (tj. nehnološko biološko starenje posredovano ubrzanim ćelijskim starenjem) postalo važno pitanje. Da bi se premostio jaz između hronološke i biološke starosti, potrebni su efikasni i validirani biomarkeri starenja koji bi predvideli zdravstvene ishode osoba sa HIV-infekcijom, posebno imajući u vidu da te osobe danas mogu da dožive starost kao i zdrave osobe. Telomere predstavljaju strukture na krajevima hromozoma koje se skraćuju sa svakom deobom ćelije, što posledično dovodi do skraćivanja telomera u tkivima čije se ćelije aktivno dele. U većini neaktivnih tkiva, faktori ćelijskog okruženja, kao što su zapaljenje i oksidativni stres, doprinose gubitku telomera (209).

Jedna od glavnih karakteristika koja utiče na validnost rezultata statističkog testa jeste njegova veličina. Odnos veličine uzorka korišćenog u ovoj studiji i moći statističkog testiranja je analiziran multivarijantnom regresijom. Statistička moć je dostigla 78% na nivou značajnosti od 0,05 i prilagođena je za veoma malu veličinu efekta (0,1), tako da je model osetljiv čak i za varijansu zavisne varijable od 10% i može se zaključiti da je veličina uzorka zadovoljavajuća.

Odabir pacijenata donosi još prednosti ovom istraživanju. Ispitanici su bili belci, muškarci, čime je isključen nezanemarljiv uticaj rase i pola na dužinu telomera (210). Snaga ove studije se takođe ogleda u veoma strogim kriterijumima za uključivanje i kriterijumima isključenja, sa ciljem da se eliminiše potencijalni uticaj svih mogućih remetećih faktora na RTL.

Uvidom u podatke Republičkog zavoda za statistiku, moguće je izvršiti poređenje prosečne starosti uzorka korišćenog u ovoj studiji sa starošću opšte populacije. Prosečna starost u opštoj populaciji u Srbiji iznosi 43,85 godina prema objavljenim podacima skupljenim 2022. godine (211). Srednja vredost starosti srpske populacije je veoma slična prosečnoj vrednosti starosti pacijenata uključenih u ovu studiju, koja iznosi 42,7 godine, dok je koeficijent varijacije 0,3 sa maksimalnim i minimalnim vrednostima od 22 i 91, respektivno. S tim u vezi, može se zaključiti da je opseg starosti pacijenata u korišćenom uzorku, odnosno varijabilnost uzorka dovoljno velika da bi rezultati ispitivanja bili relevantni.

Strategija SZO-a, koju sprovodi i Republika Srbija, obuhvata dva ključna pristupa za suzbijanje epidemije HIV-a: rano i redovno testiranje na prisustvo HIV-a u organizmu i pružanje hitne antiretrovirusne terapije, bez obzira na broj CD4+ T-ćelija, svim osobama kojima je dijagnostikovana HIV infekcija (70). Dakle, u Srbiji lečenje počinje brzo, a, shodno tome, relativno brzo se uspostavlja suzbijanje HIV replikacije i dostizanje tzv. "nedetektabilnosti", odnosno, broj kopija HIV RNK u plazmi pacijenata je ispod nivoa detekcije. Postizanje i održavanje supresije HIV infekcije od izuzetnog je značaja jer doprinosi poboljšanju zdravlja pacijenta i sprečava širenje infekcije seksualnim putem (14). Zabeleženo je da se upotrebom cART supresija može postići već nakon 5 do 10 nedelja (212). Početak terapije sledi u roku od 24 do 48 sati od postavljanja dijagnoze. Iz navedenog razloga, nema mogućnosti da se obezbedi eventualna grupa HIV-om inficiranih pacijenata koji dolaze na redovne preglede, a nisu započeli lečenje i održavaju nelečenu HIV infekciju. Pacijenti bi morali da imaju HIV infekciju i da budu naivni na lečenje barem neko vreme da bi bilo smisleno njihove dužine telomera upoređivati sa dužinom telomera lečenih pacijenata. Na taj način bi se potencijalno mogao izolovati uticaj HIV infekcije na dužinu telomera od uticaja terapije.

Pretpostavimo da je lekovima u okviru cART-a potrebno od jednog do šest meseci da bi se postigao nivo HIV RNK /ml plazme ispod nivoa detekcije. Pacijenti uključeni u studiju su uzimali svoje trenutne terapije duže od 4 meseca da bi uopšte bili uključeni u studiju. Zapravo, skoro svi pacijenti (sa izuzetkom dva pacijenta) su uzimali cART duže od 6 meseci, a samo jedan pacijent je uzimao trenutni režim prethodna 4 meseca i jedan pacijent je uzimao trenutni režim 5 meseci. Možemo zaključiti da je prosečno vreme koje su pacijenti provodili u stanju HIV virusnog opterećenja ispod 50 kopija iznosilo bar $76,02 \pm 64,81$ meseci (razlikuje se od 1 do 264 meseca).

Svi pacijenti su bili zaraženi sa HIV-1 tipom virusa. Ova studija nije proveravala prisustvo evolutivno različitih sojeva. Ne očekuje se da bi moguće prisustvo evolutivno različitih sojeva virusa imalo uticaja na dužinu telomera, imajući u vidu da je virusna replikacija uspešno potisnuta kod svih pacijenata i da je kod svih pacijenata uključenih u studiju, trajno održavano ≤ 50 kopija HIV RNK/ml plazme.

Dužina telomera, kao parametar ili varijabla, pokazala je sinhronizovanost između tkiva kod iste osobe. Iz tog razloga, dužina telomera se može smatrati indikatorom ćelijskog starenja i može se prihvatiti kao efikasan i pouzdan biomarker starenja (213, 214).

Aktivnost telomeraze se može razlikovati u različitim tipovima krvnih ćelija. Identifikovane su specifične razlike u dužini telomera između šest tipova krvnih ćelija, kod kojih je, takođe, primećena i različita podložnost starenju (215). Stope skraćivanja telomera razlikuju se ne samo između CD4+ T-ćelija, CD8+ T-ćelija i B-ćelija, već i unutar ovih ćelijskih linija, odnosno između naivnih i memorijskih ćelija. Da bi se izbegao eventualni gubitak informacija odabirom pojedinačnih ćelijskih linija, odlučili smo da u ovom ispitivanju koristimo skup mononuklearnih ćelija. Dodatni razlozi za korišćenje mononuklearnih ćelija u ovoj studiji bili su njihova dinamična priroda, njihova sposobnost da veoma dobro predstavljaju trenutno fiziološko stanje organizma i dokazana činjenica da njihova dužina telomera generalno odražava stanje održavanja telomera u drugim tkivima (115).

Deobni potencijal normalne humane somatske ćelije je ograničen ćelijskim starenjem. Replikacija DNK, do koje dolazi prilikom deobe, je polukonzervativna, a posledica toga je progresivno skraćivanje krajeva hromozoma sa svakom replikacijom. Segmenti koji postaju sve kraći, telomere, imaju ključnu ulogu u zaštiti integriteta svih hromozoma, samim tim i celog genoma, mogu se izdužiti delovanjem telomeraze (216). Aktivacija telomeraze omogućava održavanje dužine telomera, time obezbeđujući zaštitu krajeva hromozoma i produžavanje životnog veka ćelija (217).

U većini somatskih ćelija odraslih osoba, TERT katalitička subjedinicu zadužena za reverznu transkripciju telomera, generalno nije eksprimirana, što rezultira niskom aktivnošću telomeraze. Aktivnost telomeraze u perifernim T-limfocitima je indukovana aktivacijom limfocita, u korelaciji je sa proliferacijom ćelija i nije ograničena fazom ćelijskog ciklusa. Ovo saznanje ukazuje na to da ekspresija telomeraze u T-limfocitima može imati permisivnu ulogu u određivanju kapaciteta limfoidnih ćelija za klonalnu ekspanziju (218).

Naivne CD4+ T-ćelije se aktiviraju po kontaktu sa HIV-om, tj. dolazi do stimulacije antigenom. Sledi diferencijacija u memorijske T-ćelije i proliferacija iz jedne u mnogo ćelija. Stvaraju se klonovi T-ćelija. Ova klonska ekspanzija memorijskih CD4+ T-ćelija je normalan imuni odgovor na stimulaciju antigenom (219). U uslovima tekuće replikacije virusa, CD8+ T-ćelije dospevaju u stanje funkcionalne iscrpljenosti koje karakteriše ćelijska hipoproliferacija, stanje povezano sa erozijom telomera. CD8+ T-ćelije ostaju metabolički aktivne i sposobne su da izvršavaju svoje efektorske funkcije, ali je njihova prosečna dužina telomera u ovom stadijumu približno jednaka dužini kod ćelija u terminalnoj ćelijskoj starosti. Aktivnost

telomerase u T-ćelijama doprinosi očuvanju ćelijskog imuniteta štiteći ih od iscrpljenosti i starenja (220). Skraćivanje telomera može biti antagonizovano dejstvom telomerase, enzimom koji je visoko selektivno eksprimiran u matičnim ćelijama, tumorskim ćelijama i aktiviranim limfocitima (221).

Mehanizam održavanja dužine telomera u okruženju hronične virusne infekcije je predmet brojnih ispitivanja. Međutim, nema dovoljno podataka o tome kojim sve načinima HIV-infekcija doprinosi ubrzavanju kliničke starosti i o tome kako se uticaji HIV-infekcije međusobno preklapaju sa drugim mehanizmima koji se povezuju sa pojavom komorbiditeta povezanih sa starenjem koji se i inače javljaju u organizmima u odsustvu HIV-infekcije.

Mehanizam transmisije, kao što se i očekivalo, nije doprineo razlici u dužini telomera između pacijenata koji su na različite načine inficirani HIV-om. Takođe, pretragom *MedlinePlus* i *PubMed* biblioteka, nisu pronađene studije u kojima su autori mehanizam transmisije povezali sa dužinom telomera.

Slično ovom ispitivanju, Zanet i saradnici nisu ustanovili vezu između RTL i vremena od postavljanja dijagnoze HIV-a, broja CD4+ T-ćelija, cART tipa ili trajanja hronične inflamacije. Autori su zaključili da imuni odgovor na HIV uzima svoj danak rano nakon HIV infekcije i da se ne pogoršava uvek, u zavisnosti od jačine imunog sistema. Takođe su sugerisali da bi efekat HIV infekcije na skraćivanje telomera mogao biti maskiran godinama, pušenjem ili koinfekcijom HCV-om (132). Gonzalez-Serna i autori su značajnu promenu, kada telomere mononuklearnih ćelija krvi podležu rapidnom skraćivanju, uočili ubrzo nakon HIV-serokonverzije (137). Nasuprot njima, Brin i saradnici su naglasili, u studiji koja je pratila pacijente, da ubrzano starenje počinje u roku od tri godine nakon HIV infekcije. Zaključke su doneli na osnovu procene vrednosti metilacije DNK koju su prilagodili starosti, dužini telomera i drugim epigenetskim parametrima starenja (222). Dalzini i saradnici su, s druge strane, izvestili da vreme početka cART-a igra glavnu ulogu u kontroli rezervoara HIV-a, što je direktno povezano sa imunosenescijom i skraćivanjem telomera (223).

Oštećenja telomera mogu biti uzrokovana direktnim delovanjem ROS. U organizmu osoba svih starosnih uzrasta, posledica održavanja metabolizma i homeostaze mitohondrija je oslobađanje ROS koji mogu da dostignu štetne koncentracije i difunduju u jedro (224). U leukocitima HIV-om inficiranih pacijenata, pod dugotrajnim uticajem oksidativnog stresa, katalitička subjedinica telomerase se translocira iz jedra u mitohondrije, ostavljajući malo ili nimalo telomerase za održavanje telomera u jezgru. Prioritet tada ćelija daje zaštitnoj ulozi telomerase, odnosno njenoj borbi protiv oksidativnog oštećenja mitohondrijalne DNK, a po cenu zanemarivanja održavanja dužine telomera (225).

Eksperimentalno je dokazano da prisustvo virusnog Vpr smanjuje ekspresiju TERT subjedinice na post-translacionom nivou, stimuliše ubikvitinizaciju TERT subjedinice pomoću domaćinove E2 ligaze, a produkciju slobodnih radikala uvećava za 15 puta. Svi nabrojani događaji mogu dovesti do skraćivanja telomera (146, 226).

Prisustvo regulatornog HIV Tat proteina u ćeliji stimuliše ekspresiju virusnih gena i smanjuje aktivnost telomerase, sprečava pravilno sklapanje telomeraznog kompleksa, inhibira translokaciju telomerase iz citoplazme u jedro i dovodi do degradacije telomerase (145). Virusni Vpr, ključan za infekciju CD4+T-ćelija i makrofaga, utiče na regulaciju ekspresije TERT subjedinice na posttranslacionom nivou, promoviše ubikvitinaciju TERT subjedinice regrutovanjem E2 ligaze domaćina i učestvuje u indukovanju proizvodnje slobodnih radikala do 15 puta veću u poređenju sa ćelijama koje nisu inficirane HIV-om (146, 226, 227).

Negativnu kontrolu aktivnosti telomeraze u CD4+ T-ćelijama Tat ostvaruje kroz nekoliko mehanizama. Indukuje oslobađanje faktora nekroze tumora, inflamatornog citokina koji redukuje telomeraznu aktivnost. Dalje, Tat interferira sa ekspresijom proteina temperaturnog šoka - HSP90, šaperonom neophodnim za pravilno asembliranje telomeraznog kompleksa i održavanje stabilnosti sklopljenog kompleksa. Takođe, Tat interaguje sa protein kinazom B, tako da ona ne može da učestvuje u translokaciji telomeraze u jedro. Tat stimuliše degradaciju telomeraze u proteazomima (145). Ne treba izostaviti ni podatak da Tat indukuje produkciju ROS inhibiranjem ekspresije mitohondrijalne mangan zavisne superoksid dismutase, enzima neophodnog za odbranu mitohondrije od posledica oksidativnog stresa (146).

U HIV-om inficiranim i susednim neinficiranim ćelijama, u čiju citoplazmu virusni protein Tat dospeva parakrinim putem, on dovodi do aktivacije inflamatornih gena i citotoksičnosti primećene kod nekoliko komorbiditeta povezanih sa HIV-om (228). Osobe koje žive sa HIV infekcijom imaju značajno veću prevalencu komorbiditeta i stopu mortaliteta u poređenju sa HIV-om neinficiranim osobama (229). Razvoj komorbiditeta može uticati na skraćivanje telomera kroz mehanizme specifične za pridruženu bolest i kroz delovanje lekova koji se koriste za lečenje pridružene bolesti.

Rezultati ove studije nisu povezali RTL sa kliničkim karakteristikama pacijenata, uključujući BMI, hipertenziju, hiperlipidemiju, glikemijski status ili dijabetes melitus tipa 2.

Pacijenti zaraženi HIV-om imaju dvostruko veći rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti (230). Uzrok nastanka kardiovaskularnih oboljenja kod HIV-om inficiranih pacijenata su inflamacija i poremećaj u regulaciji imunog sistema (231). Kardiovaskularne bolesti mogu biti izazvane od strane nekoliko uobičajenih faktora rizika i većina njih doprinosi skraćivanju telomera povezanom sa povećanom infamacijom tkiva i oksidativnim stresom (232). Iako su statini efikasan element terapije pri lečenju kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze, oni su povezivani sa skraćivanjem telomera (114). Meta analiza koja je obuhvatila 3097 učesnika je pokazala značajno nižu srednju vrednost dužine telomera kod grupe hipertenzivnih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (233). Meta analiza koja je ispitala uzorak od 55 917 osoba sa hipertenzijom i 162 837 zdravih kontrola, pretežno evropskog porekla, došla je do rezultata da su duže telomere značajno povezane sa povećanim rizikom od hipertenzije (234). Osim pomenute dve meta analize, objavljen je znatan broj studija koje su ispitivale odnos dužine telomera i hipertenzije, ali rezultati su kontradiktorni i ne može se zaista doneti zaključak. Autori Koriati i Peng nisu dokazali vezu između krvnog pritiska i dužine telomera (235-237). Na značajnu negativnu korelaciju su ukazali Telehea, Čeng, Ju i Žeib (233, 238-240). Duže telomere su sa višim krvnim pritiskom povezali Bekart i Rosero-Biksbi (241, 242).

Dislipidemija i pojava gojaznosti kod HIV-om inficiranih pacijenata su posledica inflamacije, poremećaja u metabolizmu glukoze i lipida i upotrebe cART, prevashodno tenofovira i integraznih inhibitora (243). U meta-analizi izvršenoj na podacima poreklom od blizu 150.000 ispitanika, ne samo da je prikazana inverzna veza između BMI i dužine telomera, već se dobio rezultat da je za svako jedinično povećanje BMI, doprinelo skraćivanju dužine telomera za 3,99 bp (152). Takođe, treba napomenuti da uprkos opšte prihvaćenom mišljenju da veće vrednosti BMI utiču na skraćivanje telomera (244, 245), postoje studije u kojima je izostao odnos između BMI i dužine telomera kod muškaraca (246, 247). Veza između viših vrednosti BMI i skraćivanja telomera potencijalno leži u oksidativnom stresu i upali prisutnim kod gojaznih ljudi (248, 249). Stoga, možda trajno stanje oksidativnog stresa i hronične upale kod pacijenata zaraženih HIV-om može prikriti stvarni uticaj BMI na RTL. Svakim porastom

BMI od 1,0 kg/m² se za 12 % povećava rizik od pojave dijabetesa koji je, takođe povezan sa skraćanjem telomera (250).

Metabolizam lipida i masnih kiselina može uticati na dužine telometra kroz oksidativni stres. Metabolizam lipida je usko povezan i sa inflamatornim procesima, a zapaljenje je jedan od faktora koji može da utiče na dužine telomera u krvotoku (251). Zaključak o odnosu između lipida i dužine telomera još uvek nije generalno postignut. Epidemiološke i kliničke studije nisu došle do konačnih nalaza. Dve studije su ukazale na vezu HDL, ukupnog holesterola i triglicerida dužinom telomera (252, 253), dok druga studija potvrđuje vezu HDL i dužine telomera, ali opovrgava vezu između triglicerida i dužine telomera (254). Kraće telomere su povezane sa hiperholesterolemijom (255).

Pacijenti zaraženi HIV-om imaju i do četiri puta veći rizik od pojave dijabetesa (256). Dok je dijabetes nesumnjivo povezan sa skraćivanjem telomera, najčešći lekovi u upotrebi kod pacijenata sa dijabetesom, insulin, metformin i derivati sulfonilureje, takođe mogu da dovedu do skraćivanja telomera (149, 257, 258). Hiperglikemija može povećati nivo oksidativnog stresa, što dovodi do jednolančanih prekida u telomerama, čime se ubrzava njihovo skraćivanje (257).

Rezultati meta-analize sprovedene na 17 kohorti koja je obuhvatila ukupno 5575 osoba obolelih od dijabetes melitusa i 6349 zdravih kontrola, pokazuju da su telomere kraće kod pacijenata sa dijabetesom nego kod zdravih osoba (151). U studiji Čenga i saradnika je zaključeno da RTL može biti prediktor glikemijske progresije dijabetes melitusa tipa 2, a skraćivanje RTL je bilo povezano sa progresijom glikemije (259). Skraćivanje telomera je povezano sa pojavom komplikacija uzrokovanih dijabetesom i većom smrtnošću kod pacijenata sa dijabetesom (260, 261). Verma i saradnici su izvestili da dijabetes može promovirati skraćivanje telomera i tako uticati na zdravlje i životni vek pacijenata (262).

Starenje je normalno postepeno vremenski-progresivno opadanje fiziološke funkcije organa i posledica je akumulacije senescentnih ćelija koja se dešava uporedo sa iscrpljivanjem ćelija kompetentnih za replikaciju, neophodnih za održavanje homeostaze, popravku i regeneraciju ćelija i tkiva (263). Pomenuti pad regenerativnog potencijala je sam po sebi uzrok, ali i faktor koji doprinosi razvoju bolesti povezanih sa starenjem, pogotovo u kombinaciji sa infamacijom (264). Neinfektivni komorbiditeti povezani sa starenjem su češći kod HIV-om inficiranih pacijenata nego u opštoj populaciji (265). HIV-om inficirane osobe žive u stanju hronične upale (266). HIV infekcija oponaša stanje imunosenescencije koje može ubrzati starenje mononuklearnih ćelija periferne krvi i skraćivanje telomera (267).

Skraćivanje telomera je obeležje starenja povezano sa drugim obeležjima koja obuhvataju starenje ćelija, iscrpljenost matičnih ćelija, genomsku nestabilnost, mitohondrijalnu disfunkciju, epigenetsku disregulaciju, gubitak homeostaze proteaze, izmenjenu apsorpciju hranljivih materija i izmenjene inflamatorne obrasce. Nabrojani mehanizmi promovišu pojavu i razvoj starenja i bolesti povezanih sa starenjem, čime utiču na životni vek ljudi. Skraćivanje telomera deluje kao mitotički sat za brojanje ćelijskih deoba i ograničavanje životnog veka ćelije i organizma (268, 269).

Pored nekoliko već navedenih parametara koji mogu negativno da utiču na telomere, kod HIV-om inficiranih pacijenata, ne mogu se zanemariti potencijalni negativni efekti određenih lekova u okviru cART.

Iako su studije starijeg datuma ukazivale na negativan efekat cART-a na dužinu telomera (270, 271), nekoliko nedavnih studija je dalo drugačije rezultate. Nedavni nalazi su

pokazali da pokretanje supresivnog cART-a ima pozitivan efekat na telomere i preokreće njihovo skraćivanje (158, 272, 273). Ne samo da se dužina telomera povećava tokom supresije postignute primenom cART-a, već i T-ćelije povećavaju svoj replikativni potencijal (270). Važnost cART-a potvrđuje i činjenica da njen prekid može da neutrališe ostvarene korisne efekte na dužinu telomera (274).

U ovoj studiji, trajanje cART nije uticalo na RTL. Mehanizam delovanja cART nije uticao na RTL. Pacijenti na različitim režimima unutar jedne klase antiretrovirusnih lekova nisu imali značajno različite RTL, osim u grupi NNIRT.

Uprkos rezultatima mašinskog učenja, koje je prvobitno istaklo broj CD4+ T-ćelija, dužinu trajanja infekcije i režim unutar NNIRT grupe kao varijable od značajnog uticaja na RTL, konačna analiza je pokazala da je samo cART koja sadrži NNIRT imala statistički značajan uticaj na dužinu telomera: konkretno, pacijenti koji su primali efavirenz imali su značajno kraće telomere od pacijenata koji su primali nevirapin. Koliko nam je poznato, do danas ne postoje objavljeni podaci o poređenju dužine telomera kod pacijenata koji uzimaju efavirenz ili nevirapin u okviru cART-a. Iako efavirenz i nevirapin više nisu poželjni lekovi prve linije u opcijama lečenja u međunarodnim smernicama, ovi lekovi se i dalje široko koriste širom sveta i imaju potencijal da čine deo globalne prakse propisivanja (275).

Poznato je da efavirenz ima štetne efekte na ćelije iniciranjem izmena u homeostazi kalcijuma, smanjivanjem aktivnosti kreatin kinaze i povećavanjem nivoa proinflammatoryh citokina, što sve dovodi do skraćivanja telomera (153, 274, 276, 277). Efavirenz, korišćen u terapijskim dozama, vezuje se i za moduliranje otvaranja i zatvaranja rianodinskih receptora prisutnih u membranama endoplazmatskog i sarkoplazmatskog retikuluma u ćelijama skoro svih tkiva (278-280). Po aktivaciji rianodinskih receptora sledi povećavanje koncentracije jona Ca^{2+} u citoplazmi, a joni Ca^{2+} uskladišteni u endoplazmatskim retikulumima se iscrpljuju i to čak pet puta brže od bazalne brzine (281).

Efavirenz može značajno da poveća prisustvo reaktivnih vrsta kiseonika (u daljem tekstu: ROS, engl. *reactive oxygen species*) (154). U osnovi procesa je inhibiranje kompleksa I mitohondrijalnog lanca transporta elektrona, što rezultuje smanjenjem potrošnje kiseonika u mitohondriji i snižavanjem potencijala membrane. Navedene promene dovode do povećanja proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika (282). Infekcija HIV-om, takođe, pokreće masovnu proizvodnju i oslobađanje ROS. Virusni Tat, Vpr, Nef i Gp 120 proteini iniciraju produkciju ROS, svaki od njih putem više različitih mehanizama (283). Oksidativni stres pokreće apoptozu. Reakcija na gubitak ćelijske populacije je kompenzacija. Preživele ćelije će proći kroz seriju intenzivnih deoba, čime će se, iz deobe u deobu, telomere skraćivati (284). ROS mogu direktno indukovati lezije (oštećene purinske i pirimidinske baze) i jednoničane prekide (abazna mesta) na DNK lancu (285). Lezije i prekidi stvaraju nereplikativne DNK sekvence na krajevima hromozoma, odnosno telomerama. Doćiće do zastoja u napredovanju replikativne viljuške, čime je održavanje telomera onemogućeno (286). Slobodni dezoksinukleozid trifosfati (dNTP) su podložniji oksidaciji od strane ROS u odnosu na dNTP-ove ugrađene u DNK lanac (287). Oksidovani dNTP-ovi se preferencijalno ugrađuju u DNK tokom replikacije i ekstenzije telomera u odnosu na neoksidovane dNTP-ove. Oksidovani dNTP, ugrađen u rastući DNK lanac, zaustavlja replikaciju i inhibira produžavanje telomera (288).

Efavirenz je povezan sa degradacijom proteina p53, koji se vezuje za mesta hromozoma osetljive stabilnosti, kao što su telomere, da bi povećao sposobnost ovih regiona da podlegnu *reper* mehanizmima i replikaciji da bi, na taj način, omogućio stabilizaciju telomera kao odgovor na DNK oštećenja (156, 157). Pošto efavirenz sprečava intracelularno preživljavanje

proteina uključenog u održavanje dužine telomera, telomere će se neizbežno skratiti. S druge strane, u literaturi se navodi da nevirapin nije uticao na nivo p53 u kultiviranim ćelijama (289), ali je značajno povećao ekspresiju transkripcionog faktora PAX8 (290). PAX8 je poznat po svojoj ulozi u transaktivaciji promotora gena koji kodiraju TERT i TERC. Povećanjem ekspresije PAX8 se posleđično povećava ekspresija telomeraze (291).

Broj istraživanja koja su proučavala uticaj dolutegravira na dužinu telomera nije velik. Studija koja je pratila dužinu telomera u mikrogliji HIV-om inficiranih pacijenata je pokazala da cART koja sadrži dolutegravir može da dovede do skraćenja telomera od 40 % i do povećanja ekspresije telomeraze i TRF-1 proteina od 47 %, odnosno 37 %, respektivno, u odnosu na HIV-om inficirane pacijente koji nisu primali cART. Overekspresijom TRF-1 proteina, koji predstavlja inhibitora telomeraze, došlo je do skraćivanja telomera. U istoj studiji, po dodavanju dolutegravir i Tat proteina ćelijskoj kulturi, došlo je do povećane produkcije ROS, procesa za koji je dokazano da uzrokuje skraćivanje telomera (135).

Lombardi i saradnici su sprovedli longitudinalnu prospektivnu studiju koja je pratila dve grupe osoba koje žive sa HIV-om. U obe grupe je bio jednak broj odraslih pacijenata, virusološki suprimiranih, uparenih po godinama, polu, vremenu proteklom od uspostavljanja dijagnoze HIV-infekcije, vremenu trajanja cART, sa međusobno uporedivim srednjim vrednostima telomera (koje nisu bile značajno različitih dužina). Istovremeno, jedna grupa pacijenata je počela da koristi dualnu terapiju koja se sastojala od dolutegravira i lamivudina, dok je druga grupa počela da koristi 2NIRT + još jedan lek iz sklopa cART. Posle 48 nedelja, primećen je porast u dužini telomera kod svih pacijenata, a porast je bio značajno veći kod pacijenata na dolutegraviru. Rezultati sugerišu da dolutegraviru kombinaciji salamivudinom može imati pozitivan efekat na dužinu telomera (292).

Stela-Askariz i saradnici su pratili dve grupe HIV-om inficiranih pacijenata sa međusobno uparenim osnovnim karakteristikama među kojima nije bilo razlike. Posle 96 nedelja provedenih na dva različita terapijska režima, nije bilo razlike u imunološkom odgovoru pacijenata na virusnu infekciju, a više od 90 % učesnika je postiglo virusološku supresiju u obe grupe. Kod obe grupe pacijenata je primećena veća dužina telomera u odnosu na vrednost u početku studije, a učesnici grupe koja je primala ritonavir/darunavir/emtricitabin/TDF imali su veće povećanje telomera nego učesnici grupe koja je primala darunavir/ritonavir/raltegravir (159).

Kako u ovoj studiji, tako ni kod Solomona i saradnika nije bilo razlike u dužini telomera između pacijenata koji su uzimali PI i pacijenata koji su uzimali NNIRT (293).

U do sada dostupnoj literaturi nema podataka o uticaju amprenavira, fosamprenavira i kobicistata na dužinu telomera.

Pored modela prikazanog u Rezultatima, sprovedena je još jedna multivarijantna regresija na modelu u kome RTL zavisi od trajanja izloženosti cART-u prilagođena za varijable koje predstavljaju uticaj pojedinačnih tipova lekova (NIRT, NNIRT, PI ili II klasa lekova). Međutim, pomenuti model nije imao značaj ni u celosti ni za nijednu od pojedinačnih varijabli (dužina trajanja terapije u odnosu na klasu leka). Prethodni antiretrovirusni tretmani nisu razmatrani da bi se izbeglo stvaranje još manjih podgrupa.

S obzirom na činjenicu da razni parametri povezani sa HIV-om i cART mogu doprineti smanjenju aktivnosti telomeraze, bilo je važno istražiti polimorfizme TERT gena koji, takođe, mogu dovesti do daljeg ometanja funkcije enzima.

Tenofovir se direktno vezuje za telomerazu i najmoćniji je inhibitor telomeraze u poređenju sa svim drugim lekovima u okviru cART (171). Efavirenz i dolutegravir pokreću povećano oslobađanje reaktivnih vrsta kiseonika i indirektno negativno regulišu aktivnost telomeraze (135, 154, 282). Dakle, moguće razlike u dužini telomera kod HIV-om inficiranih pacijenata, koje su posledica eksprimiranja određenih TERT genotipova, mogu uticati na izbor cART-a, sa ciljem individualizacije terapijskog režima, odnosno favorizovanja lekova za koje se pokazalo da su farmakogenetski bezbedni za nosioce datog genotipa. SNP se odnose na varijaciju jedne baze u molekulu DNK i mogu uticati na ekspresiju i strukturu informacione RNK i proteina (168). Studije asocijacija sprovedene na nivou genoma su otkrile da su varijante gena povezane sa dužinom telomera povezane sa predispozicijom za različite bolesti (294).

Nijedna studija nije ispitivala uticaj genotipova TERT rs2736100 i TERT rs2736098 na RTL kod HIV-om inficiranih pacijenata u neafričkoj populaciji. Ova studija je utvrdila vezu između polimorfizma TERT rs2736098 i dužine telomera. Naime, heterozigotni genotip (GA) je povezan sa dužom RTL, što ukazuje na izvesnu biološku prednost heterozigota u odnosu na dominantne (GG) i recesivne (AA) homozigote u pogledu sporijeg ćelijskog starenja. Međutim, mora se naglasiti da je došlo do odstupanja od HWE ravnoteže za ovaj polimorfizam. Kako je isključena netačna genotipizacija, visoka učestalost heterozigota i odstupanje od HWE su najverovatnije posledica slučajnosti, odnosno posledica relativno malog uzorka (295), kao što se već događalo (296). Odstupanje od Hardi-Veinbergove ravnoteže predstavlja ograničenje ovog ispitivanja u smislu zaključaka o povezanosti TERT rs2736098 sa dužinom telomera kod HIV-om inficiranih pacijenata.

Postoji znatan nesklad u literaturi u pogledu povezanosti rs2736098 i RTL-a. Rafnar i saradnici su identifikovali alel A polimorfizma rs2736098 kao značajnog doprinosioca postepenom skraćivanju telomera tokom vremena (297). Studija de Martina i saradnika koja je ispitivala polimorfizme TERT gena kao faktore rizika za nastanak karcinoma bubrežnih ćelija, pokazala je da se srednja dužina telomera povećava sa svakim G alelom polimorfizma rs2736098. Ista studija nije pokazala značajnu povezanost između RTL i rs2736100 polimorfizma (166).

Rampaco i saradnici su istraživali efekat varijanti gena TERT na RTL kod pacijenata sa kancerom rektuma i otkrili da je rs2736100 CC povezan sa dužim telomerama kod AC i AA genotipova, ali nisu pronađene razlike među genotipovima rs2736098 (298). Soerensen i saradnici nisu pronašli značajnu povezanost bilo kog SNP kandidata TERT gena, uključujući rs2736098, niti njihove haplotipove, sa RTL ili dugovečnosti u njihovoj studiji koja je uključivala 865 učesnika (299). Liu je sa svojim saradnicima pokazao da je svaki alel C rs2736100 polimorfizma povezan sa dužim srednjim vrednostima dužine telomera i to doprinosom od po 0,026, što je bilo ekvivalentno približno trogodišnjem trošenju telomera u zavisnosti od starosti (300). Lan i saradnici su, takođe, istakli da je C alel rs2736100 povezan sa dužim telomerima (301). Integrisana studija 21 genske varijante, koja pokriva 90% varijabilnosti hTERT gena, otkrila je da je srednja vrednost RTL životnog doba od 60 godina bio povezan sa rs2736100 genskim varijantama TERT gena, ali nije bio povezan u dobi od 50 godina (215). Nosioci genotipa AA rs2736100 u studiji Al-Dehainija i saradnika imali su značajno više nivoe TERT u plazmi u poređenju sa nosiocima CA i AA, a alel A je bio povezan sa niskim koncentracijama TERT (302). Po dostupnim podacima, ovo je jedina studija do sada koja je istraživala efekte polimorfizma rs2736098 na dužinu telomera kod HIV-om inficiranih pacijenata. Osim ove studije, ne raspolazemo drugim eksperimentalno potvrđenim podacima. Nije poznato da li TERT gen ili pomenuti polimorfizam utiču na progresiju HIV infekcije. Ovo nije iznenađujuće uzimajući u obzir da telomeraza nije protein čiji se put preklapa sa bilo kojim parametrom koji utiče na napredovanje HIV infekcije u organizmu.

Napredovanje HIV-infekcije može biti povezano sa metabolizmom folata i izmenjenom DNK metilacijom.

Nedostatak folata je uočen kod većeg broja HIV-om inficiranih pacijenata (303). Posledica nedovoljne koncentracije folata u organizmu je umanjena efikasnost ćelijskog imuniteta uzrokovana smanjenjem proliferacije CD4+ T-ćelija i indukovanjem ćelijske apoptoze, što objašnjava nisku otpornost organizma na infekciju i brzo napredovanje infekcije do stadijuma AIDS-a (304). Postoje dokazi da je apsorpcija folata značajno snižena u prisustvu HIV-infekcije u organizmu, bez obzira na stadijum infekcije (305). Suplementacija folnom kiselinom dovodi do porasta broja CD4+ T-ćelija i obnavlja proliferaciju limfocita kod HIV-om inficiranih osoba (304, 306).

Ključni enzim u metabolizmu folata, metilentetrahidrofolat reduktaza, katalizuje ireverzibilnu redukciju 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat, koji je neophodan za remetilaciju homocisteina u metionin (307). Normalna aktivnost metilentetrahidrofolat reduktaze održava koncentraciju metionina i folata u krvotoku na konstantnom nivou i tako sprečava akumulaciju homocisteina (308). Akumulacija homocisteina indirektno indukuje DNK hipometilaciju povećavanjem nivoa S-adenozilhomocisteina, inhibitora transmetilacije. Povišen nivo homocisteina je povezan sa hipometilacijom TERT promotora i redukcijom ekspresije iRNK, što rezultuje skraćanjem RTL (176).

Dva najčešća polimorfizma u MTHFR genu koji kodira metilentetrahidrofolat reduktazu, rs1801131 i rs1801133, dovode do znatnog smanjenja aktivnosti i termolabilnosti enzima, što dovodi do remećenja remetilacije homocisteina u metionin. Posledica je pojava hiperhomocisteinemije (309). Aktivnost homocisteina podrazumeva mehanizme koji uključuju oksidativna oštećenja (310), za koja je već navedeno da dovode do skraćanja telomera.

Na proces remetilacije homocisteina utiču polimorfizmi. Do sada su objavljeni rezultati samo jedne studije koja je za cilj imala ispitivanje eventualne veze MTHFR gena i napredovanja HIV-infekcije do AIDS-a. Baba i saradnici su nedavno objavili da u njihovom ispitivanju polimorfizam rs1801133 u MTHFR genu nije pokazao povezanost sa osetljivošću na HIV-1 infekciju, razvojem AIDS-a i terapijskim ishodom (311). Smanjenje aktivnosti enzima kod nosilaca TT genotipa je uzrok značajno povišenog nivoa homocisteina u serumu (312).

Polimorfizam rs1801133 MTHFR je povezan sa niskim nivoima folata. Posledica niskog nivoa folata je promena u obrascu metilacije DNK ćelija domaćina i u genomu HIV-a. Promene indukovane u ekspresiji gena mogu dovesti do perzistentnosti infekcije. S druge strane, integritet DNK može biti ugrožen jer se povećava mogućnost integracije HIV-1 genetičkog materijala u DNK domaćina i mogućnost retrovirusne replikacije. Na opisani način dolazi do povećane replikacije HIV-1 i oslobađanja brojnih novih kopija virusa, što dovodi do širenja infekcije na druge ćelije (311). Treba napomenuti da cART ne utiče na varijacije nivoa folata u serumu (313).

Do sada je objavljen mali broj studija koje su ispitivale povezanost polimorfizama rs1801131 i rs1801133 sa dužinom telomera.

Tokom ispitivanja povezanosti MTHFR polimorfizama rs1801131 i rs1801133 sa dužinom telomera kod žena u postmenopauzi, zaključeno je da su oba polimorfizma povezana sa kraćim telomerama. Efekat skraćivanja je bio još izraženiji kod žena koje su na oba lokusa bile homozigoti za mutirane alele. Rezultati su objašnjeni slabljenjem aktivnosti enzima, usled uticaja mutiranih alela, što još više doprinosi hiperhomocisteinemiji, inače prisutnoj kod žena u postmenopauzi. Hiperhomocisteinemija doprinosi povećanju oksidativnog stresa, što dovodi

do ubrzanog skraćivanja telomera. Zaključci su objavljeni uz napomenu da nisu izvršena merenja nivoa homocisteina koja bi potvrdila ponuđeno objašnjenje (314).

Nijedan od polimorfizama rs1801131 i rs1801133 nije bio statistički značajno povezan sa relativnom dužinom telomera leukocita periferne krvi tokom ispitivanja veze između dijetetskih i genetskih faktora u biohemijском putu generisanja metil donora (315).

Polimorfizam rs1801133 nije povezan sa dužinom telomera prilikom ispitivanja uticaja metabolita biohemijского puta generisanja metil donora kod starijih osoba koje su tokom godinu dana koristile suplemente vitamina B i D. Veza polimorfizma i dužine telomera nije utvrđena ni na početku ispitivanja, ni nakog jednogodišnje suplementacije (316).

Polazeći od činjenice da je dužina telomera epigenetski regulisana metilacijom DNK, koja je modulirana statusom folata, Paul i saradnici su ispitivali da li status folata i polimorfizam rs1801133 imaju uticaj na dužinu telomera mononuklearnih ćelija periferne krvi kod zdravih muškaraca. Rezultati su pokazali da je polimorfizam bio slabo povezan sa dužim telomerama kada je koncentracija folata u serumu bila ispod svoje medijane, pa su pretpostavili da status folata može da utiče na dužinu telomera menjanjem integriteta DNK i epigenetskom regulacijom dužine telomera preko DNK metilacije (317).

Doslednija povezanost između RTL i HIV-a možda bi se mogla naći testiranjem dodatnih polimorfizama ili korišćenjem većih kohorti. Potrebno je praćenje i ponovljeno uzorkovanje da bi se pratilo i otkrile buduće promene u dužini telomera u toku starenja HIV-om inficiranih pacijenata (318). Razumevanje biologije telomera moglo bi da ponudi nove terapijske modalitete za lečenje kancera, na prvom mestu (115), i niz stanja povezanih sa starenjem. Pošto se dužina telomera pojavila kao pouzdan indikator starenja, takođe treba uzeti u obzir njen prognostički potencijal za stanja vezana za HIV. Nesumnjivo, neophodne su studije koje će potvrditi ili demantovati moguću korisnost dužine telomera kod pacijenata sa HIV-om kao markera za praćenje statusa starenja i progresije bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. Mehanizam delovanja cART nema presudan uticaj na dužinu telomera, iako je zapažen izvestan negativan efekat inhibitora integraze na RTL.
2. Različiti terapijski režimi u grupama II, PI i NIRT ne utiču na dužinu telomera.
3. Različit terapijski režim u grupi NNIRT značajno utiče na dužinu telomera, tj. pacijenti koji su primali nevirapin imaju duže telomere od pacijenata koji su primali efavirenz.
4. Polimorfizam TERT rs2736098 je povezan sa dužinom telomera; pacijenti GA genotipa imaju značajno duže telomere od GG i AA genotipova ukazujući na izvesnu biološku prednost heterozigota u odnosu na homozigote, u smislu ćelijskog starenja.
5. Polimorfizam TERT rs2736100 nije povezan sa RTL.
6. Polimorfizmi rs1801131 i rs1801131 u MTHFR genu nisu povezani sa RTL.

7. LITERATURA

1. World Health organization. Epidemiological fact sheet. HIV statistics, globally and by WHO region, 2023 [citirano 12.12.2023. godine]. Dostupno: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/j0294-who-hiv-epi-factsheet-v7.pdf>.
2. Coomer CA, Padilla-Parra S. HIV-1 transmission: modelling and direct visualization in the third dimension. *Microscopy (Oxf)*. 2023; 72(3):164-177.
3. Chawla A, Wang C, Patton C, Murray M, Puneekar Y, de Ruiter A, et al. A Review of Long-Term Toxicity of Antiretroviral Treatment Regimens and Implications for an Aging Population. *Infect Dis Ther*. 2018; 7(2):183-195.
4. Luciw PA: Human immunodeficiency viruses and their replication. 3rd ed. Philadelphia: Virology, Lippincott-Raven; 1996.
5. German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother*. 2016 May;43(3):203-22.
6. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011; 1(1):a006841.
7. Greene WC. A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur J Immunol*. 2007; 37 Suppl 1:S94-102.
8. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Science*. 1983; 220,868–871.
9. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1987; 317(4):185-91.
10. World Health organization. HIV estimates. [citirano 12.12.2023. godine] Dostupno: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/hiv-estimates-ppt-2023-final.pdf?sfvrsn=51c4d01c_9
11. UNAIDS. Country factsheets SERBIA 2022. [citirano 12.12.2023. godine] Dostupno: <https://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/serbia>
12. Heath K, Levi J, Hill A. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS 95-95-95 targets: worldwide clinical and cost benefits of generic manufacture. *AIDS*. 2021;35(Suppl 2):S197-S203.
13. UNAIDS. Understanding fast-track accelerating action to end the AIDS epidemic by 2030. [citirano 12.05.2024. godine] Dostupno: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/201506_JC2743_Understanding_Fast_Track_en.pdf
14. Seale A, Baggaley R, Vojnov L, Doherty M. Role of viral suppression in HIV treatment and prevention and its potential in addressing harmful laws and discrimination. *Sex Health*. 2023; 20(3):181-185.
15. Kalinichenko S, Komkov D, Mazurov D. HIV-1 and HTLV-1 Transmission Modes: Mechanisms and Importance for Virus Spread. *Viruses*. 2022; 14(1):152.
16. Chen B. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry. *Trends Microbiol*. 2019; 27(10):878-891.
17. Seelamgari A, Maddukuri A, Berro R, de la Fuente C, Kehn K, Deng L, et al. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci*. 2004; 9:2388-413.
18. Adler MW, Williams I, Miller RF. ABC of AIDS. Oxford: Wiley-Blackwell; 2012.
19. Jolly C, Sattentau QJ. Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic*. 2004; 5(9):643-50.

20. Morcilla V, Bacchus-Souffan C, Fisher K, Horsburgh BA, Hiener B, Wang XQ, et al. HIV-1 Genomes Are Enriched in Memory CD4⁺ T-Cells with Short Half-Lives. *mBio*. 2021; 12(5):e0244721.
21. Majerová T, Konvalinka J. Viral proteases as therapeutic targets. *Mol Aspects Med*. 2022; 88:101159.
22. Showa SP, Nyabadza F, Hove-Musekwa SD. On the efficiency of HIV transmission: Insights through discrete time HIV models. *PLoS One*. 2019 Sep 18;14(9):e0222574.
23. Khanal S, Tang Q, Cao D, Zhao J, Nguyen LN, Oyedeji OS, et al. Telomere and ATM Dynamics in CD4 T-Cell Depletion in Active and Virus-Suppressed HIV Infections. *J Virol*. 2020; 94(22):e01061-20.
24. Burin des Roziers N, Sotto A, Arnaud A, Saissi G, Nasar O, Jourdan J. Kinetics of detection of antibodies to HIV-1 and plasma p24 antigens during a severe primary HIV-1 infection. *AIDS*. 1995; 9:528–529.
25. Lindbäck S, Thorstensson R, Karlsson AC, von Sydow M, Flamholz L, Blaxhult A, et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure: Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. *AIDS*. 2000; 14:2333–2339.
26. Vermeulen M, Coleman C, Mitchel J, Reddy R, van Drimmelen H, Fickett T, et al. Comparison of human immunodeficiency virus assays in window phase and elite controller samples: viral load distribution and implications for transmission risk. *Transfusion*. 2013; 53:2384–2398.
27. World Health organization. Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service delivery and monitoring: recommendations for a public health approach. [citirano 12.12.2023. godine] Dostupno: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240031593>.
28. Craig JC, Duncan IB, Hockley D, Grief C, Roberts NA, Mills JS. Antiviral properties of Ro 31-8959, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase. *Antiviral Res*. 1991; 16(4):295-305.
29. Tseng A, Seet J, Phillips EJ. The evolution of three decades of antiretroviral therapy: challenges, triumphs and the promise of the future. *Br J Clin Pharmacol*. 2015; 79(2):182-94.
30. Matthew AN, Leidner F, Lockbaum GJ, Henes M, Zephyr J, Hou S, et al. Drug design strategies to avoid resistance in direct-acting antivirals and beyond. *Chem Rev*. 2021; 121(6):3238–3270.
31. Gueler A, Moser A, Calmy A, Günthard HF, Bernasconi E; Furrer H, et al. Life expectancy in HIV-positive persons in Switzerland: Matched comparison with general population. *AIDS*. 2017; 31:427–436.
32. European AIDS Clinical Society. [citirano 12.01.2023. godine] Dostupno: https://www.eacsociety.org/media/guidelines-11.1_final_09-10.pdf
33. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim EY, Archer J, Pond SLK, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature*. 2016; 530,51–56.
34. Wang PF, Neiner A, Kharasch ED. Efavirenz Metabolism: Influence of Polymorphic CYP2B6 Variants and Stereochemistry. *Drug Metab Dispos*. 2019; 47(10):1195-1205.
35. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(4):a007161.
36. Immunopaedia. ARV mode of action [citirano 15.05.2024. godine] Dostupno: <https://www.immunopaedia.org.za/treatment-diagnostics/hiv-infection-treatment/arv-mode-of-action/>.
37. Bhana N, Ormrod D, Perry CM, Figgitt DP. Zidovudine: a review of its use in the management of vertically-acquired pediatric HIV infection. *Paediatr Drugs*. 2002;4(8):515-53.
38. National library of medicine. StatPearls Publishing. Didanosine (Archived) [citirano 15.05.2024. godine] Dostupno: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557863/>

39. Lea AP, Faulds D. Stavudine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical potential in HIV infection. *Drugs*. 1996; 51(5):846-64.
40. Perry CM, Faulds D. Lamivudine. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*. 1997; 53(4):657-80.
41. Hervey PS, Perry CM. Abacavir: a review of its clinical potential in patients with HIV infection. *Drugs*. 2000; 60(2):447-79.
42. UK Collaborative HIV Cohort Study Steering Committee. HLA B*5701 status, disease progression, and response to antiretroviral therapy. *AIDS*. 2013; 27(16):2587-92.
43. Wassner C, Bradley N, Lee Y. A Review and Clinical Understanding of Tenofovir: Tenofovir Disoproxil Fumarate versus Tenofovir Alafenamide. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2020; 19:2325958220919231.
44. Pilkington V, Hughes SL, Pepperrell T, McCann K, Gotham D, Pozniak AL, Hill A. Tenofovir alafenamide vs. tenofovir disoproxil fumarate: an updated meta-analysis of 14894 patients across 14 trials. *AIDS*. 2020; 34(15):2259-2268.
45. Frampton JE, Perry CM. Emtricitabine: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs*. 2005; 65(10):1427-48.
46. Kis O, Robillard K, Chan GN, Bendayan R. The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends Pharmacol Sci*. 2010; 31(1):22-35.
47. Bardsley-Elliot A, Perry CM. Nevirapine: a review of its use in the prevention and treatment of paediatric HIV infection. *Paediatr Drugs*. 2000 Sep-Oct;2(5):373-407.
48. Sharaf NG, Ishima R, Gronenborn AM. Conformational Plasticity of the NNRTI-Binding Pocket in HIV-1 Reverse Transcriptase: A Fluorine Nuclear Magnetic Resonance Study. *Biochemistry*. 2016; 55(28):3864-73.
49. Ståhle L, Moberg L, Svensson JO, Sönnnerborg A. Efavirenz plasma concentrations in HIV-infected patients: inter- and intraindividual variability and clinical effects. *Ther Drug Monit*. 2004; 26(3):267-70.
50. McDonagh EM, Lau JL, Alvarellos ML, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: Efavirenz pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics*. 2015; 25(7):363-76.
51. Lee KY, Lin SW, Sun HY, Kuo CH, Tsai MS, Wu BR, et al. Therapeutic drug monitoring and pharmacogenetic study of HIV-infected ethnic Chinese receiving efavirenz-containing antiretroviral therapy with or without rifampicin-based anti-tuberculous therapy. *PLoS One*. 2014; 9(2):e88497.
52. Croxtall JD. Etravirine: a review of its use in the management of treatment-experienced patients with HIV-1 infection. *Drugs*. 2012; 72(6):847-69.
53. Schafer JJ, Short WR. Rilpivirine, a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor for the management of HIV-1 infection: a systematic review. *Antivir Ther*. 2012; 17(8):1495-502.
54. Rock AE, Lerner J, Badowski ME. Doravirine and Its Potential in the Treatment of HIV: An Evidence-Based Review of the Emerging Data. *HIV AIDS (Auckl)*. 2020; 12:201-210.
55. Adamson CS. Protease-Mediated Maturation of HIV: Inhibitors of Protease and the Maturation Process. *Mol Biol Int*. 2012; 2012:604261.
56. Ryom L, Cotter A, De Miguel R, Béguelin C, Podlekareva D, Arribas JR, et al; EACS Governing Board. 2019 update of the European AIDS Clinical Society Guidelines for treatment of people living with HIV version 10.0. *HIV Med*. 2020; 21(10):617-624.
57. la Porte CJ. Saquinavir, the pioneer antiretroviral protease inhibitor. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009; 5(10):1313-22.
58. Kumar GN, Rodrigues AD, Buko AM, Denissen JF. Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut*. 1996; 277(1):423-431.

59. Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M, Pelkonen O. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Arch. Toxicol.* 2020; 94(11):3671–3722.
60. Velozo CT, Cabral LM, Pinto EC, de Sousa VP. Lopinavir/Ritonavir: A Review of Analytical Methodologies for the Drug Substances, Pharmaceutical Formulations and Biological Matrices. *Crit Rev Anal Chem.* 2022; 52(8):1846-1862.
61. Wire MB, Shelton MJ, Studenberg S. Fosamprenavir: clinical pharmacokinetics and drug interactions of the amprenavir prodrug. *Clin. Pharmacokinet.* 2006; 45(2):137–168.
62. Croom KF, Dhillon S, Keam SJ. Atazanavir: a review of its use in the management of HIV-1 infection. *Drugs.* 2009; 69(8):1107-40.
63. National Center for Biotechnology Information. StatPearls. Atazanavir. [Citirano 15.05.2024. godine] Dostupno: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551608/>
64. King JR, Acosta EP. Tipranavir: a novel nonpeptidic protease inhibitor of HIV. *Clin Pharmacokinet.* 2006; 45(7):665-82.
65. Deeks ED. Darunavir: a review of its use in the management of HIV-1 infection. *Drugs.* 2014 Jan;74(1):99-125.
66. Richetta C, Thierry S, Thierry E, Lesbats P, Lapaillerie D, et al. Two-long terminal repeat (LTR) DNA circles are a substrate for HIV-1 integrase. *J Biol Chem.* 2019; 294(20):8286-8295.
67. DHHS Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents – A Working Group of the Office of AIDS Research Advisory Council (OARAC). Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and adolescents living with HIV. [citirano 01.04.2024. godine] Dostupno: <https://files.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/AdultandAdolescentGL.pdf>.
68. World Health Organization. Updated recommendations on first-line and second-line antiretroviral regimens and post-exposure prophylaxis and recommendations on early infant diagnosis of HIV: interim guidelines. Supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. Geneva: World Health Organization; 2018 (WHO/CDS/HIV/18.51). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [citirano 01.04.2024. godine] Dostupno: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/277395/WHO-CDS-HIV-18.51-eng.pdf?sequence=1>
69. Croxtall JD, Keam SJ. Raltegravir: a review of its use in the management of HIV infection in treatment-experienced patients. *Drugs.* 2009 May 29;69(8):1059-75.
70. World Health organization. WHO HIV policy adoption and implementation status in countries, 2023. [citirano 12.12.2023. godine] Dostupno: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/hiv-estimates-ppt-2023-final.pdf?sfvrsn=51c4d01c_9.
71. Barcelo C, Aouri M, Courlet P, Guidi M, Braun DL, Günthard HF, et al; Swiss HIV Cohort Study. Population pharmacokinetics of dolutegravir: influence of drug-drug interactions in a real-life setting. *J Antimicrob Chemother.* 2019; 74(9):2690-2697.
72. Gebremedhin T, Aynalem M, Adem M, Geremew D, Aleka Y, Kiflie A. Dolutegravir based therapy showed CD4⁺ T cell count recovery and viral load suppression among ART naïve people living with HIV AIDS: a pilot evaluation. *Sci Rep.* 2024; 14(1):3297.
73. Nickel K, Halfpenny NJA, Snedecor SJ, Punekar YS. Comparative efficacy, safety and durability of dolutegravir relative to common core agents in treatment-naïve patients infected with HIV-1: an update on a systematic review and network meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2021; 21(1):222.
74. Deeks ED. Elvitegravir: a review of its use in adults with HIV-1 infection. *Drugs.* 2014; 74(6):687-97.
75. Deeks ED. Bictegravir/Emtricitabine/Tenofovir Alafenamide: A Review in HIV-1 Infection. *Drugs.* 2018; 78(17):1817-1828.

76. Cattaneo D, Gervasoni C. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cabotegravir, a Long-Acting HIV Integrase Strand Transfer Inhibitor. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2019; 44(3):319-327.
77. Langley DR, Kimura SR, Sivaprakasam P, Zhou N, Dicker I, McAuliffe B, et al. Homology models of the HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529 bound to gp120 suggest a unique mechanism of action. *Proteins.* 2015; 83(2):331-50.
78. Muccini C, Canetti D, Castagna A, Spagnuolo V. Efficacy and Safety Profile of Fostemsavir for the Treatment of People with Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1): Current Evidence and Place in Therapy. *Drug Des Devel Ther.* 2022; 16:297-304.
79. Oldfield V, Keating GM, Plosker G. Enfuvirtide: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs.* 2005; 65(8):1139-60.
80. Chahine EB. Fostemsavir: The first oral attachment inhibitor for treatment of HIV-1 infection. *Am J Health Syst Pharm.* 2021; 78(5):376-388.
81. Kozal M, Aberg J, Pialoux G, Cahn P, Thompson M, Molina JM, et al, BRIGHT Trial Team. Fostemsavir in Adults with Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* 2020; 382(13):1232-1243.
82. Woollard SM, Kanmogne GD. Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 5447-68.
83. National HIV Curriculum. Antiretroviral Medications and Initial Therapy [citirano 15.05.2024. godine] Dostupno: <https://cdn.hiv.uw.edu/doc/558-1/mechanism-action-ccr5-antagonists.jpg>.
84. National HIV Curriculum. Antiretroviral Medications and Initial Therapy [citirano 15.05.2024. godine] Dostupno: <https://www.hiv.uw.edu/go/antiretroviral-therapy/general-information/core-concept/all>.
85. Deeks ED. Cobicistat: a review of its use as a pharmacokinetic enhancer of atazanavir and darunavir in patients with HIV-1 infection. *Drugs.* 2014; 74(2):195-206.
86. Doyle T, Smith C, Vitiello P, Cambiano V, Johnson M, Owen A, et al. Plasma HIV-1 RNA detection below 50 copies/ml and risk of virologic rebound in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2012; 54(5):724-32.
87. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, Markowitz M, Ho DD. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature.* 1997 May 8;387(6629):188-91.
88. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, et al. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:13193-7.
89. Rosenthal J, Tyor W. Aging, comorbidities, and the importance of finding biomarkers for HIV-associated neurocognitive disorders. *J Neurovirol.* 2019; 25(5):673-685.
90. Nah K, Nishiura H, Tsuchiya N, Sun X, Asai Y, Imamura A. Test-and-treat approach to HIV/AIDS: a primer for mathematical modeling. *Theor Biol Med Model.* 2017; 14(1):16.
91. Roomaney RA, van Wyk B, Pillay-van Wyk V. Aging with HIV: Increased Risk of HIV Comorbidities in Older Adults. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Feb 18;19(4):2359.
92. Domingo P, Giralt M, Gavaldà-Navarro A, Blasco-Roset A, Delgado-Anglés A, Gallego-Escuredo JM, et al. Adipose tissue aging partially accounts for fat alterations in HIV lipodystrophy. *Adipocyte.* 2022; 11(1):143-152.
93. Ghosh AK, Mau T, O'Brien M, Garg S, Yung R. Impaired autophagy activity is linked to elevated ER-stress and inflammation in aging adipose tissue. *Aging (Albany, NY).* 2016; 8(10):2525–2537.
94. Kumar M, Singh H, Chakole S. Exploring the Relation Between Diabetes and HIV: A Narrative Review. *Cureus.* 2023; 15(8):e43909.

95. Musekwa R, Hamooya BM, Koethe JR, Nzala S, Masenga SK. Prevalence and correlates of hypertension in HIV-positive adults from the Livingstone Central Hospital, Zambia. *Pan Afr Med J.* 2021; 39:237.
96. Engel T, Raffenberg M, Marzolini C, Cavassini M, Kovari H, Hasse B, Tarr PE. HIV and Aging - Perhaps Not as Dramatic as We Feared? *Gerontology.* 2018; 64(5):446-456.
97. Paula AA, Falcão MC, Pacheco AG. Metabolic syndrome in HIV-infected individuals: underlying mechanisms and epidemiological aspects. *AIDS Res Ther.* 2013;10(1):32.
98. Lundgren JD, Battegay M, Behrens G, De Wit S, Guaraldi G, Katlama C, , et al; EACS Executive Committee. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines on the prevention and management of metabolic diseases in HIV. *HIV Med.* 2008;9(2):72-81.
99. Kimmel PL, Barisoni L, Kopp JB. Pathogenesis and treatment of HIV-associated renal diseases: lessons from clinical and animal studies, molecular pathologic correlations, and genetic investigations. *Ann Intern Med.* 2003; 139(3):214-26.
100. Hasse B, Tarr PE, Marques-Vidal P, Waeber G, Preisig M, Mooser V, et al. Strong Impact of Smoking on Multimorbidity and Cardiovascular Risk Among Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals in Comparison With the General Population. *Open Forum Infect Dis.* 2015; 2(3):ofv108.
101. Brown TT, Qaqish RB. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS.* 2006; 20(17):2165-74.
102. Triant VA, Brown TT, Lee H, Grinspoon SK. Fracture prevalence among human immunodeficiency virus (HIV)-infected versus non-HIV-infected patients in a large U.S. healthcare system. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(9):3499-504.
103. Simm A, Nass N, Bartling B, Hofmann B, Silber R-E, Navarrete Santos A. Potential biomarkers of ageing. *Biol Chem.* 2008; 389:257–265.
104. De Francesco D, Wit FW, Bürkle A, Oehlke S, Kootstra NA, Winston A, et al; the Co-morbidity in Relation to AIDS (COBRA) Collaboration. Do people living with HIV experience greater age advancement than their HIV-negative counterparts? *AIDS.* 2019; 33(2):259-268.
105. Schoepf IC, Esteban-Cantos A, Thorball CW, Rodés B, Reiss P, Rodríguez-Centeno J, et al; Swiss HIV Cohort Study. Epigenetic ageing accelerates before antiretroviral therapy and decelerates after viral suppression in people with HIV in Switzerland: a longitudinal study over 17 years. *Lancet Healthy Longev.* 2023; 4(5):e211-e218.
106. Nasi M, De Biasi S, Gibellini L, Bianchini E, Pecorini S, Bacca V, et al. Ageing and inflammation in patients with HIV infection. *Clinical & Experimental Immunology.* 2016; 187(1):44-52.
107. Lagathu C, Cossarizza A, Béréziat V, Nasi M, Capeau J, Pinti, M. Basic science and pathogenesis of ageing with HIV. *AIDS.* 2017; 31:105–119.
108. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013; 14(10):R115.
109. Horvath S, Lin DTS, Kobor MS, Zoller JA, Said JW, Morgello S, et al. HIV, pathology and epigenetic age acceleration in different human tissues. *Geroscience.* 2022 Jun;44(3):1609-1620.
110. Horvath S, Levine AJ. HIV-1 Infection Accelerates Age According to the Epigenetic Clock. *J Infect Dis.* 2015 Nov 15;212(10):1563-73.
111. Justice AC, Erlandson KM, Hunt PW, Landay A, Miotti P, Tracy RP. Can Biomarkers Advance HIV Research and Care in the Antiretroviral Therapy Era? *J Infect Dis.* 2018; 217(4):521-528.
112. Diebel LWM, Rockwood K. Determination of Biological Age: Geriatric Assessment vs Biological Biomarkers. *Curr Oncol.* 2021; 23(9):104.
113. Gorenjak V, Akbar S, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S. The future of telomere length in personalized medicine. *Front Biosci.* 2018; 23:1628-1654.

114. Alejos B, Stella-Ascariz N, Montejano R, Rodriguez-Centeno J, Schwimmer C, et al. Determinants of blood telomere length in antiretroviral treatment-naïve HIV-positive participants enrolled in the NEAT 001/ANRS 143 clinical trial. *HIV Med.* 2019; 20(10):691-8.
115. Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers (Basel).* 2020; 12(3):558.
116. Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells.* 2019; 19;8(1):73.
117. Wang Z, Deng Z, Tutton S, Lieberman PM. The Telomeric Response to Viral Infection. *Viruses.* 2017; 9(8):218.
118. Liu J, Wang L, Wang Z, Liu JP. Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing. *Cells.* 2019; 8(1):54.
119. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005 Sep 15;19(18):2100-10.
120. Sumida T, Hamakawa H. Telomerase and oral cancer. *Oral Oncology.* 2001; 37(4),333-340.
121. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(18):6622-6626.
122. Leão R, Apolónio JD, Lee D et al. Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *J Biomed Sci.* 2018; 25:22.
123. Armstrong CA, Tomita K. Fundamental mechanisms of telomerase action in yeasts and mammals: Understanding telomeres and telomerase in cancer cells. *Open Biology.* 2017; 7:160338.
124. Button L, Rogers B, Thomas E, Bradfield A, Alnafakh R, Drury J, Hapangama DK. Telomere and Telomerase-Associated Proteins in Endometrial Carcinogenesis and Cancer-Associated Survival. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(2):626.
125. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc).* 2010; 75(13):1563-83.
126. Chen CH, Chen RJ. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc.* 2011; 110(5):275-89.
127. Wang Y, Feigon J. Structural biology of telomerase and its interaction at telomeres. *Curr Opin Struct Biol.* 2017; 47:77-87.
128. Mitchell M, Gillis A, Futahashi M, Fujiwara H, Skordalakes E. Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nat Struct Mol Biol.* 2010; 17(4):513-8.
129. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med.* 2009; 361(24):2353-65.
130. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11: 171-181.
131. Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis.* 2010; 1(2):72-74.
132. Zanet DL, Thorne A, Singer J, Maan EJ, Sattha B, Le Campion A, et al. Association between short leukocyte telomere length and HIV infection in a cohort study: No evidence of a relationship with antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2014; 58(9):1322-1332.
133. Dragovic G, Andjic M, Toljic B, Jevtovic Dj, Lukic R, de Luka S, et al. Correlation between metabolic syndrome and relative telomere length shortening in HIV/AIDS patients on combined antiretroviral therapy. *Experimental Gerontology.* 2021; 147:111269.
134. Rodríguez-Centeno J, Esteban-Cantos A, Montejano R, Stella-Ascariz N, De Miguel R, Mena-Garay B, et al. Effects of tenofovir on telomeres, telomerase and T cell maturational subset distribution in long-term aviraemic HIV-infected adults. *J Antimicrob Chemother.* 2022; 31:77(4):1125-1132.

135. Hsiao CB, Bedi H, Gomez R, et al. Telomere Length Shortening in Microglia: Implication for Accelerated Senescence and Neurocognitive Deficits in HIV. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(7):721.
136. Wong LS, Huzen J, de Boer RA, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, van der Harst P. Telomere length of circulating leukocyte subpopulations and buccal cells in patients with ischemic heart failure and their offspring. *PLoS One*. 2011; 6(8):e23118.
137. Gonzalez-Serna A, Ajaykumar A, Gadawski I, Muñoz-Fernández MA, Hayashi K, Harrigan PR, et al. Rapid Decrease in Peripheral Blood Mononucleated Cell Telomere Length After HIV Seroconversion, but Not HCV Seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2017;76(1):e29-e32.
138. Jiménez VC, Wit FW, Joerink M, Maurer I, Harskamp AM, Schouten J, et al. T-Cell Activation Independently Associates with Immune Senescence in HIV-Infected Recipients of Long-term Antiretroviral Treatment. *J. Infect. Dis*. 2016; 214:216–225.
139. Blanco JR, Jarrin I, Martinez A, Siles E, Larrayoz IM, Cañuelo A, et al. Shorter telomere length predicts poorer immunological recovery in virologically suppressed HIV-1-infected patients treated with combined antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2015; 68:21–29.
140. National Library of Medicine. Acquired Immune Deficiency Syndrome CD4+ Count [citirano 12.10.2023. godine]. Dostupno: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513289/>.
141. Prasad, K. C-reactive protein increases oxygen radical generation by neutrophils. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther*. 2004; 9:203–209.
142. Wong JY, De Vivo I, Lin X, Fang SC, Christiani DC. The relationship between inflammatory biomarkers and telomere length in an occupational prospective cohort study. *PLoS One*. 2014; 9(1):e87348.
143. Mazidi, M.; Shekoohi, N.; Katsiki, N.; Rakowski, M.; Mikhailidis, D.P.; Banach, M. Serum anti-inflammatory and inflammatory markers have no causal impact on telomere length: A Mendelian randomization study. *Arch. Med. Sci*. 2021; 17, 739–751.
144. Arkus N. A mathematical model of cellular apoptosis and senescence through the dynamics of telomere loss. *J Theor Biol*. 2005; 235:13–32.
145. Comandini A, Naro C, Adamo R, Akbar AN, Lanna A, Bonmassar E, et al. Molecular mechanisms involved in HIV-1-Tat mediated inhibition of telomerase activity in human CD4(+) T lymphocytes. *Mol Immunol*. 2013; 54(2):181-92.
146. Deshmane SL, Mukerjee R, Fan S, Del Valle L, Michiels C, Sweet T, et al. Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1alpha expression. *J Biol Chem*. 2009; 284(17):11364-73.
147. Wang X, Singh S, Jung HY, Yang G, Jun S, Sastry KJ, et al. HIV-1 Vpr protein inhibits telomerase activity via the EDD-DDB1-VPRBP E3 ligase complex. *J Biol Chem*. 2013; 288(22):15474-80.
148. Boccard V, Paolisso G. The association between statins and telomere shortening. *Clin Lipidol*. 2017; 9:311–315.
149. Zeng JB, Liu HB, Ping F, Li W, Li YX. Insulin treatment affects leukocyte telomere length in patients with type 2 diabetes: 6-year longitudinal study. *J. Diabetes Complicat*. 2019; 33:363–7.
150. Genis-Mendoza, A.D. Telomere Shortening in Three Diabetes Mellitus Types in a Mexican Sample. *Biomedicines*. 2023; 11:730.
151. Wang J, Dong X, Cao L, Sun Y, Qiu Y, Zhang Y, et al. Association between telomere length and diabetes mellitus: A meta-analysis. *J. Int. Med. Res*. 2016; 44:1156–73.
152. Gielen M, Hageman GJ, Antoniou EE, Nordfjall K, Mangino M, Balasubramanyam M, et al. Body mass index is negatively associated with telomere length: A collaborative cross-sectional meta-analysis of 87 observational studies. *Am J Clin Nutr*. 2018; 108:453–75.

153. O'Callaghan NJ, Bull C, Fenech M. Elevated plasma magnesium and calcium may be associated with shorter telomeres in older South Australian women. *J. Nutr. Health Aging.* 2014; 18:131–136.
154. Brown LA, Jin J, Ferrell D, Sadic E, Obregon D, Smith, A.J, et al. Efavirenz promotes β -secretase expression and increased A β 1-40,42 via oxidative stress and reduced microglial phagocytosis: Implications for HIV associated neurocognitive disorders (HAND). *PLoS ONE.* 2014; 9:e95500.
155. Surnar B, Shah AS, Park M, Kalathil AA, Kamran MZ, Ramirez Jaime R, et al. Brain-Accumulating Nanoparticles for Assisting Astrocytes to Reduce Human Immunodeficiency Virus and Drug Abuse-Induced Neuroinflammation and Oxidative Stress. *ACS Nano.* 2021; 15:15741-53.
156. Dong Q, Oh J, Yi JK, Kim RH, Shin K, Mitsuyasu R, et al. Efavirenz induces autophagy and aberrant differentiation in normal human keratinocytes. *Int J Mol Med.* 2013; 31:1305–1312.
157. Tutton S, Lieberman PM. A role for p53 in telomere protection. *Mol. Cell Oncol.* 2016; 4:e1143078.
158. Hukezalie KR, Thumati NR, Côté HC, Wong JM. In vitro and ex vivo inhibition of human telomerase by anti-HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) but not by non-NRTIs. *PLoS ONE.* 2012; 7:e47505.
159. Stella-Ascariz N, Montejano R, Rodriguez-Centeno J, Alejos B, Schwimmer C, Bernardino JJ, et al. Blood Telomere Length Changes After Ritonavir-Boosted Darunavir Combined with Raltegravir or Tenofovir-Emtricitabine in Antiretroviral-Naive Adults Infected with HIV-1. *J. Infect. Dis.* 2018; 218:1523–30.
160. Rodríguez-Centeno J, Esteban-Cantos A, Montejano R, Stella-Ascariz N, De Miguel R, Mena-Garay B, et al. Effects of tenofovir on telomeres, telomerase and T cell maturational subset distribution in long-term aviraemic HIV-infected adults. *J. Antimicrob. Chemother.* 2022; 77:1125–32.
161. Akincilar SC, Unal B, Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(8):1659-70.
162. Wen L, Zhao C, Song J, Ma L, Ruan J, Xia X, et al. CRISPR/Cas9-Mediated TERT Disruption in Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(2):653.
163. Oliver GR, Marcano-Bonilla S, Quist J, Tolosa EJ, Iguchi E, Swanson AA, et al. LPCAT1-TERT fusions are uniquely recurrent in epithelioid trophoblastic tumors and positively regulate cell growth. *PLoS One.* 2021; 16(5):e0250518.
164. Snetselaar R, van Oosterhout MFM, Grutters JC, van Moorsel CHM. Telomerase Reverse Transcriptase Polymorphism rs2736100: A Balancing Act between Cancer and Non-Cancer Disease, a Meta-Analysis. *Front Med.* 2018; 5:41.
165. Zhou M, Jiang B, Xiong M and Zhu X. Association Between TERT rs2736098 Polymorphisms and Cancer Risk-A Meta-Analysis. *Front Physiol.* 2018; 9:377.
166. de Martino M, Taus C, Lucca I, Hofbauer SL, Haitel A, Shariat SF, et al. Association of human telomerase reverse transcriptase gene polymorphisms, serum levels, and telomere length with renal cell carcinoma risk and pathology. *Mol Carcinog.* 2016; 55(10):1458-66.
167. Bukic E, Dragovic G, Toljic B, Obradovic B, Jadzic J, Jevtovic D, Milasin JM. TERT single nucleotide polymorphism rs2736098 but not rs2736100 is associated with telomere length in HIV-infected patients on cART. *Mol Biol Rep.* 2024; 51(1):147.
168. Wang S, Chang E, Byanyima P, Huang P, Sanyu I, Musisi, et al. Association between common telomere length genetic variants and telomere length in an African population and impacts of HIV and TB. *J Hum Genet.* 2019; 64:1033–1040.
169. Kalungi A, Kinyanda E, Womersley JS, Joloba ML, Ssembajjwe W, Nsubuga RN, et al. TERT rs2736100 and TERC rs16847897 genotypes moderate the association between

- internalizing mental disorders and accelerated telomere length attrition among HIV+ children and adolescents in Uganda. *BMC Med Genomics*. 2021; 14(1):15.
170. Engel T, Raffenberg M, Schoepf IC, Kootstra NA, Reiss P, Thorball CW, et al; Swiss HIV Cohort Study. Telomere Length, Traditional Risk Factors, Factors Related to Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Coronary Artery Disease Events in Swiss Persons Living With HIV. *Clin Infect Dis*. 2021; 73(7):e2070-e2076.
171. Auld E, Lin J, Chang E, Byanyima P, Ayakaka I, Musisi E, et al. HIV Infection Is Associated with Shortened Telomere Length in Ugandans with Suspected Tuberculosis. *PLoS One*. 2016; 11(9):e0163153.
172. Malan-Müller S, Hemmings SM, Spies G, Kidd M, Fennema-Notestine C, Seedat S. Shorter telomere length - A potential susceptibility factor for HIV-associated neurocognitive impairments in South African women. *PLoS One*. 2013; 8(3):e58351.
173. Iyengar S, Côté HCF, Fitch KV, Torriani M, Feldpausch M, Srinivasa S. Relationship of Telomere Length to Fat Redistribution in HIV. *Open Forum Infect Dis*. 2020; 7(12):ofaa5.
174. Johnson AA, Akman K, Calimport SR, Wuttke D, Stolzing A, de Magalhães JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res*. 2012; 15(5):483-94.
175. Shu C, Jaffe AE, Sabunciyar S, Ji H, Astemborski J, Sun J, et al. Epigenome-wide association scan identifies methylation sites associated with HIV infection. *Epigenomics*. 2020; 12(21):1917-1927.
176. Zhang D, Wen X, Zhang L, Cui W. DNA methylation of human telomerase reverse transcriptase associated with leukocyte telomere length shortening in hyperhomocysteinemia-type hypertension in humans and in a rat model. *Circ J*. 2014;78(8):1915-23.
177. Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR. Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *J Inherit Metab Dis*. 2019;42(4):673-85.
178. Gonzalez-Mercado MG, Rivas F, Gallegos-Arreola MP, Moran-Moguel MC, Salazar-Paramo M, et al. MTRR A66G, RFC1 G80A, and MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms and Disease Activity in Mexicans with Rheumatoid Arthritis Treated with Methotrexate. *Gen Test and Mol Biomarkers*. 2017;21(11):698–704.
179. Spellacy CJ, Northrup H, Fletcher JM, Cirino PT, Dennis M, Morrison AC, et al. Folate metabolism gene 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ADHD in myelomeningocele patients. *PLoS One*. 2012 ;7(12):e51330.
180. Mocketla MB, Wadley AL, Kamerman P, de Assis Rosa D. Pharmacogenetic variation influences sensory neuropathy occurrence in Southern Africans treated with stavudine-containing antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2018;13(10):e0204111.
181. Coppedè F, Stoccoro A, Tannorella P, Gallo R, Nicolì V, Migliore L. Association of Polymorphisms in Genes Involved in One-Carbon Metabolism with *MTHFR* Methylation Levels. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(15):3754.
182. Chen J, Akhtari FS, Wagner MJ, Suzuki O, Wiltshire T, Motsinger-Reif AA, et al. Pharmacogenetic Analysis of the Model-Based Pharmacokinetics of Five Anti-HIV Drugs: How Does This Influence the Effect of Aging? *Clin Transl Sci*. 2018; 11(2):226-236.
183. International Ethical Guidelines for Health-related Research Involving Humans, Fourth Edition. Geneva: Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS); 2016.
184. Liew CC, Ma J, Tang HC, Zheng R, Dempsey AA. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med*. 2006; 147(3):126-32.
185. Charm SE, Landau S, Williams B, Horowitz B, Prince AM, Pascual D. High-temperature short-time heat inactivation of HIV and other viruses in human blood plasma. *Vox Sang*. 1992;62(1):12-20.

186. Wigginton KR, Pecson BM, Sigstam T, Bosshard F, Kohn T. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ Sci Technol*. 2012 Nov 6;46(21):12069-78.
187. Gu X, Cao T, Mou J, Liu J. Water bath is more efficient than hot air oven at thermal inactivation of coronavirus. *Virology*. 2023;20(1):84.
188. Cell Culture Dish. Isolation of Mononuclear and Polymorphonuclear Leukocytes from Blood with Density Separation Media. Dostupno: <https://cellculturedish.com/isolation-of-mononuclear-and-polymorphonuclear-leukocytes-from-blood-with-density-separation-media/> (pristupljeno 17.11.2023.)
189. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
190. Jerram A, Guy TV, Beutler L, Gunasegaran B, Sluyter R, Fazekas de St Groth B, et al. Effects of storage time and temperature on highly multiparametric flow analysis of peripheral blood samples; implications for clinical trial samples. *Biosci Rep*. 2021;41(2):BSR20203827.
191. Linggi B, Cremer J, Wang Z, Van Viegen T, Vermeire S, Lefevre P, et al. Effect of storage time on peripheral blood mononuclear cell isolation from blood collected in vacutainer CPT™ tubes. *J Immunol Methods*. 2023;519:113504.
192. Isolation of mononuclear cells, Methodology and applications. GE Healthcare Life Sciences; 2014.
193. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
194. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012;(63):e3998.
195. Zhang C, Tian YP, Wang Y, Guo FH, Qin JF. hTERT rs2736098 genetic variants and susceptibility of hepatocellular carcinoma in the Chinese population: a case-control study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2013;12,74-79.
196. Cyril C, Rai P, Chandra N, Gopinath PM, Satyamoorthy K. MTHFR Gene variants C677T, A1298C and association with Down syndrome: A Case-control study from South India. *Indian J Hum Genet*. 2009;15(2):60–64.
197. Jin G, Xu L, Shu Y, Tian. Common genetic variants on 5p15.33 contribute to risk of lung adenocarcinoma in a Chinese population. *Carcinogenesis*. 2009;30(6):987-90.
198. Romac S. PCR u kliničkoj dijagnostici. Beograd: Biološki fakultet; 1999.
199. Sigmon J, Larcom LL. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1996;17(10):1524-7.
200. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Dostupno: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/> (pristupljeno 17.11.2023.)
201. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:e47.
202. Lan Q, Cawthon R, Shen M, Weinstein SJ, Virtamo J, Lim U, Hosgood HD 3rd, Albanes D, Rothman N. A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 1;15(23):7429-33.
203. Shamout F, Zhu T, Clifton DA. Machine Learning for Clinical Outcome Prediction. *IEEE Rev Biomed Eng*. 2021; 14:116-126.
204. The Comprehensive R Archive Network. Dostupno: <https://CRAN.R-project.org/package=gpubr> (pristupljeno 06.05.2023.)
205. FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods. Dostupno: <https://github.com/droglenc/FSA> (pristupljeno 06.05.2023.).

206. Agencija za Akreditaciju Zdravstvenih Ustanova Republike Srbije. Dostupno: <http://www.azus.gov.rs/wp-content/uploads/2011/04/Vodic-za-dijagnostikovanje-i-lecenje-lipidskih-poremecaja1.pdf> (pristupljeno 17.11.2023.).
207. Ministarstvo Zdravlja Republike Srbije. Dostupno: https://www.zdravlje.gov.rs/view_file.php?file_id=552&cache=sr (pristupljeno 17.11.2023.).
208. Ministarstvo Zdravlja Republike Srbije. Dostupno: <https://www.zdravlje.gov.rs/viewfile.php?fileid=667&cache=sr> (pristupljeno 17.11.2023.).
209. Minami R, Takahama S, Yamamoto M. Correlates of telomere length shortening in peripheral leukocytes of HIV-infected individuals and association with leukoaraiosis. *PLoS One*. 2019; 14(6):e0218996.
210. Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, et al. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol*. 2014; 51:15-27.
211. Popis Srbija 2022. Stanovništvo prema starosti i polu, po opštinama i gradovima. Dostupno: <https://popis2022.stat.gov.rs/sr-cyrl/popisni-podaci-eksel-tabele/> (pristupljeno 07.04.2024.)
212. Patel D, Cortina-Borja M, Thorne C, Newell ML. European Collaborative Study. Time to undetectable viral load after highly active antiretroviral therapy initiation among HIV-infected pregnant women. *Clin Infect Dis*. 2007; 44(12):1647-56.
213. von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med*. 2005; 5(2):197-203.
214. Kimura M, Gazitt Y, Cao X, Zhao X, Lansdorp PM, Aviv A. Synchrony of telomere length among hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2010; 38(10):854-9.
215. Melin BS, Nordfäll K, Andersson U, Roos G. hTERT cancer risk genotypes are associated with telomere length. *Genet Epidemiol*. 2012; 36(4):368–372.
216. de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(8):2882–2885.
217. de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science (New York, NY)*. 2009; 326(5955):948–952.
218. Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J Exp Med*. 1996; 183(6):2471-9.
219. Yeh YJ, Yang K, Razmi A, Ho YC. The Clonal Expansion Dynamics of the HIV-1 Reservoir: Mechanisms of Integration Site-Dependent Proliferation and HIV-1 Persistence. *Viruses*. 2021; 13(9):1858.
220. Williams K, Seiss K, Beamon J, Pereyra F, Rosenberg ES, Walker BD, et al. Epigenetic regulation of telomerase expression in HIV-1-specific CD8+ T cells. *AIDS*. 2010; 24(12):1964-6.
221. Hodes RJ, Hathcock KS, Weng NP. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:699–706.
222. Breen EC, Sehl ME, Shih R, Langfelder P, Wang R, Horvath S, et al. Accelerated aging with HIV begins at the time of initial HIV infection. *iScience*. 2022; 25(7):104488.
223. Dalzini A, Ballin G, Dominguez-Rodriguez S, Rojo P, Petrara MR, Foster C, et al. Size of HIV-1 reservoir is associated with telomere shortening and immunosenescence in early-treated European children with perinatally acquired HIV-1. *J Int AIDS Soc*. 2021; 24(11):e25847.
224. Qian W, Kumar N, Roginskaya V, Fouquerel E, Opresko PL, et al. Chemoptogenetic damage to mitochondria causes rapid telomere dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019; 116(37):18435-18444.
225. Hsieh AYY, Kimmel E, Pick N, Sauvé L, Brophy J, Kakkar F, et al. Inverse relationship between leukocyte telomere length attrition and blood mitochondrial DNA content loss over time. *Aging*. 2020; 12(15):15196-15221.

226. Wang X, Singh S, Jung HY, Yang G, Jun S, Sastry KJ, et al. HIV-1 Vpr protein inhibits telomerase activity via the EDD-DDB1-VPRBP E3 ligase complex. *J Biol Chem.* 2013; 288(22):15474-80.
227. Kogan M, Rappaport J. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology.* 2011; 8:25.
228. Ajasin D, Eugenin EA. HIV-1 Tat: Role in Bystander Toxicity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:61.
229. Pourcher V, Gourmelen J, Bureau I, Bouee S. Comorbidities in people living with HIV: An epidemiologic and economic analysis using a claims database in France. *PLoS One.* 2020; 15(12):e0243529.
230. Triant VA. Cardiovascular disease and HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2013; 10(3):199-206.
231. Feinstein MJ. HIV and Cardiovascular Disease: From Insights to Interventions. *Top Antivir Med.* 2021; 29(4):407-411.
232. Yeh JK, Wang CY. Telomeres and Telomerase in Cardiovascular Diseases. *Genes (Basel).* 2016; 7(9):58.
233. Tellechea ML, Pirola CJ. The impact of hypertension on leukocyte telomere length: a systematic review and meta-analysis of human studies. *J Hum Hypertens.* 2017; 31(2):99-105.
234. Deng Y, Li Q, Zhou F, Li G, Liu J, Lv J, et al. Telomere length and the risk of cardiovascular diseases: A Mendelian randomization study. *Front Cardiovasc Med.* 2022; 9:1012615.
235. Koriath M, Müller C, Pfeiffer N, Nickels S, Beutel M, Schmidtman I, et al. Relative Telomere Length and Cardiovascular Risk Factors. *Biomolecules.* 2019; 9(5):192.
236. Peng H, Mete M, Desale S, Fretts AM, Cole SA, Best LG, et al. Leukocyte telomere length and ideal cardiovascular health in American Indians: the Strong Heart Family Study. *Eur J Epidemiol.* 2017; 32(1):67-75.
237. Morgan RG, Ives SJ, Walker AE, Cawthon RM, Andtbacka RH, Noyes D, et al. Role of arterial telomere dysfunction in hypertension: relative contributions of telomere shortening and telomere uncapping. *J Hypertens.* 2014; 32(6):1293-9.
238. Cheng G, Wang L, Dai M, Wei F, Xu D. Shorter Leukocyte Telomere Length coupled with lower expression of Telomerase Genes in patients with Essential Hypertension. *Int J Med Sci.* 2020; 17(14):2180-2186.
239. Yu SN, Chen SQ, Fan GQ, Pan WZ, Jia J, Wang Q, et al. Relative Telomere Length in Peripheral Blood Cells and Hypertension Risk among Mine Workers: A Case-Control Study in Chinese Coal Miners. *Biomed Res Int.* 2020; 2020:5681096.
240. Zgheib NK, Sleiman F, Nasreddine L, Nasrallah M, Nakhoul N, Isma'eel H, et al. Short Telomere Length is Associated with Aging, Central Obesity, Poor Sleep and Hypertension in Lebanese Individuals. *Aging Dis.* 2018; 9(1):77-89.
241. Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Langlois M, et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging Cell.* 2007; 6(5):639-47.
242. Rosero-Bixby L, Rehkopf DH, Dow WH, Lin J, Epel ES, Azoifeifa J, et al. Correlates of longitudinal leukocyte telomere length in the Costa Rican Longevity Study of Healthy Aging (CRELES): On the importance of DNA collection and storage procedures. *PLoS One.* 2019; 14(10):e0223766.
243. Bailin SS, Gabriel CL, Wanjalla CN, Koethe JR. Obesity and Weight Gain in Persons with HIV. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2020; 17(2):138-150.
244. Khosravaniardakani S, Bokov DO, Mahmudiono T, Hashemi SS, Nikrad N, Rabieemotmaen S, et al. Obesity Accelerates Leukocyte Telomere Length Shortening in Apparently Healthy Adults: A Meta-Analysis. *Front Nutr.* 2022; 9:812846.

245. Li J, Wang W, Yang Z, Qiu L, Ren Y, Wang D, et al. Causal association of obesity with epigenetic aging and telomere length: a bidirectional mendelian randomization study. *Lipids Health Dis.* 2024; 23(1):78.
246. Nordfjäll K, Eliasson M, Stegmayr B, Melander O, Nilsson P, Roos G. (2008), Telomere Length Is Associated With Obesity Parameters but With a Gender Difference. *Obesity*, 16: 2682-2689.
247. Brouillette SW, Moore JS, McMahan AD et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 2007;369:107–114.
248. Razavi A, Baghshani MR, Ardabili HM, et al. Obese subjects have significantly higher serum prooxidant/antioxidant balance values compared to normal-weight subjects. *Clin Lab* 2013; 59: 257- 261.
249. Deloach S, Keith SW, Gidding SS, Falkner B. Obesity associated inflammation in African American adolescents and adults. *Am J Med Sci* 2013; 347: 357- 363.
250. Kumar S, Samaras K. The Impact of Weight Gain During HIV Treatment on Risk of Pre-diabetes, Diabetes Mellitus, Cardiovascular Disease, and Mortality. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:705.
251. Zhu G, Xu J, Guo G, Zhu F. Association between Lipids, Apolipoproteins and Telomere Length: A Mendelian Randomization Study. *Nutrients*. 2023; 15(21):4497.
252. Rehkopf DH, Needham BL, Lin J, Blackburn EH, Zota AR, Wojcicki JM, et al. Leukocyte Telomere Length in Relation to 17 Biomarkers of Cardiovascular Disease Risk: A Cross-Sectional Study of US Adults. *PLoS Med*. 2016; 13(11):e1002188.
253. Chen W, Gardner JP, Kimura M, Brimacombe M, Cao X, Srinivasan SR, et al. Leukocyte telomere length is associated with HDL cholesterol levels: The Bogalusa heart study. *Atherosclerosis*. 2009 Aug;205(2):620-5.
254. Melamed S, Ugarten U, Shirom A, Kahana L, Lerman Y, Froom P. Chronic burnout, somatic arousal and elevated salivary cortisol levels. *J Psychosom Res*. 1999; 46(6):591-8.
255. Ngwa NE, Peer N, Matsha TE, de Villiers A, Sobngwi E, Kengne AP. Associations of leukocyte telomere length with cardio-metabolic risk profile in a South African HIV-infected population. *Medicine (Baltimore)*. 2022; 101(5):e28642.
256. Brown TT, Cole SR, Li X, Kingsley LA, Palella FJ, Riddler SA, et al. Antiretroviral therapy and the prevalence and incidence of diabetes mellitus in the multicenter AIDS cohort study. *Arch Intern Med*. 2005; 165(10):1179-84.
257. Cheng F, Carroll L, Joglekar MV, Januszewski AS, Wong KK, Hardikar AA, et al. Diabetes, metabolic disease, and telomere length. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2021; 9(2):117-126.
258. Liu J, Ge Y, Wu S, Ma D, Xu W, Zhang Y, et al. Association between antidiabetic agents use and leukocyte telomere shortening rates in patients with type 2 diabetes. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(2):741-755.
259. Cheng F, Luk AO, Shi M, Huang C, Jiang G, Yang A, et al. Shortened Leukocyte Telomere Length Is Associated With Glycemic Progression in Type 2 Diabetes: A Prospective and Mendelian Randomization Analysis. *Diabetes Care*. 2022; 45(3):701-709.
260. Kidanie BB, Alem G, Zeleke H, Gedfew M, Edemealem A, Andualem A. Determinants of Diabetic Complication Among Adult Diabetic Patients in Debre Markos Referral Hospital, Northwest Ethiopia, 2018: Unmatched Case Control Study. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020; 13:237-245.
261. Cheng F, Luk AO, Wu H, Lim CKP, Carroll L, Tam CHT et al. Shortened relative leukocyte telomere length is associated with all-cause mortality in type 2 diabetes- analysis from the Hong Kong Diabetes Register. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021; 173:108649.

262. Verma AK, Singh P, Al-Saeed FA, Ahmed AE, Kumar S, Kumar A, et al. Unravelling the role of telomere shortening with ageing and their potential association with diabetes, cancer, and related lifestyle factors. *Tissue Cell*. 2022; 79:101925.
263. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. 2015; 21(12):1424-35.
264. Jenny NS. Inflammation in aging: cause, effect, or both? *Discov Med*. 2012; 13(73):451-60.
265. Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, et al. Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clin Infect Dis*. 2011; 53(11):1120-6.
266. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med*. 2011; 62:141-55.
267. Bestilny LJ, Gill MJ, Mody CH, Riabowol KT. Accelerated replicative senescence of the peripheral immune system induced by HIV infection. *AIDS*. 2000; 14(7):771-80.
268. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023; 186(2):243-278.
269. Chakravarti D, LaBella KA, DePinho RA. Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell*. 2021; 184(2):306-322.
270. Montejano R, Stella-Ascariz N, Monge S, Bernardino JI, Pérez-Valero I, Montes ML, et al. Impact of Antiretroviral Treatment Containing Tenofovir Difumarate on the Telomere Length of Aviremic HIV-Infected Patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2017; 76,102–109.
271. Leeansyah E, Cameron PU, Solomon A, Tennakoon S, Velayudham P, Gouillou M, et al. Inhibition of telomerase activity by human immunodeficiency virus (HIV) nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors: A potential factor contributing to HIV-associated accelerated aging. *J. Infect. Dis*. 2013; 207,1157–65.
272. Montejano R, Stella-Ascariz N, Monge S, Bernardino JI, Pérez-Valero I, Montes ML, et al. Impact of Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitors on Blood Telomere Length Changes in a Prospective Cohort of Aviremic HIV-Infected Adults. *J. Infect. Dis*. 2018; 218,1531–1540.
273. Schoepf IC, Thorball CW, Ledergerber B, Kootstra NA, Reiss P, Raffenberg M, et al. Telomere Length Declines in Persons with Human Immunodeficiency Virus Before Antiretroviral Therapy Start but Not after Viral Suppression: A Longitudinal Study over >17 Years. *J. Infect. Dis*. 2022; 225,1581–1591.
274. Raffenberg M, Engel T, Schoepf IC, Kootstra NA, Reiss P, Braun DL, et al. Impact of Delaying Antiretroviral Treatment During Primary Human Immunodeficiency Virus Infection on Telomere Length. *J. Infect. Dis*. 2021; 224,1775–1784.
275. Clinton Health Access Initiative. [citirano 23.04.2024.] Dostupno: <https://chai19.wpenginepowered.com/wp-content/uploads/2022/12/2022-CHAI-HIV-Market-Report-12.8.22.pdf> github.com/droglenc/FSA (accessed on 6 February 2023).
276. Surnar B, Shah AS, Park M, Kalathil AA, Kamran MZ, Ramirez Jaime R, et al. Nanoparticles for Assisting Astrocytes to Reduce Human Immunodeficiency Virus and Drug Abuse-Induced Neuroinflammation and Oxidative Stress. *ACS Nano*. 2021; 15(10):15741-15753.
277. Babu H, Ambikan AT, Gabriel EE, Svensson Akusjärvi S, Palaniappan AN, et al. Systemic Inflammation and the Increased Risk of Inflamm-Aging and Age-Associated Diseases in People Living With HIV on Long Term Suppressive Antiretroviral Therapy. *Front Immunol*. 2019; 10:1965.

278. Alomar FA, Tian C, Bidasee SR, Venn ZL, Schroder E, Palermo NY, et al. HIV-Tat Exacerbates the Actions of Atazanavir, Efavirenz, and Ritonavir on Cardiac Ryanodine Receptor (RyR2). *Int J Mol Sci.* 2022; 24(1):274.
279. Loke J, MacLennan DH. Malignant hyperthermia and central core disease: disorders of Ca²⁺ release channels. *Am J Med.* 1998; 104(5):470-86.
280. Giannini G, Conti A, Mammarella S, Scrobogna M, Sorrentino V. The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol.* 1995; 128(5):893-904.
281. Alomar FA, Tian C, Dash PK, McMillan JM, Gendelman HE, Gorantla S, et al. Efavirenz, atazanavir, and ritonavir disrupt sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscles. *Antiviral Res.* 2021; 187:104975.
282. Benedicto AM, Fuster-Martínez I, Tosca J, Esplugues JV, Blas-García A, Apostolova N. NNRTI and Liver Damage: Evidence of Their Association and the Mechanisms Involved. *Cells.* 2021; 10(7):1687.
283. Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Ivanova ON, Kochetkov SN, Starodubova ES, Bartosch B, et al. Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 8910396.
284. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev.* 2019; 177:37-45.
285. Cadet J, Wagner JR. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(2):a012559.
286. Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL, et al. Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell.* 2009; 138(1):90-103.
287. Rudd SG, Valerie NCK, Helleday T. Pathways controlling dNTP pools to maintain genome stability. *DNA Repair (Amst).* 2016; 44:193-204.
288. Aeby E, Ahmed W, Redon S, Simanis V, Lingner J. Peroxiredoxin 1 Protects Telomeres from Oxidative Damage and Preserves Telomeric DNA for Extension by Telomerase. *Cell Rep.* 2016; 17(12):3107-3114.
289. Fang JL, Beland FA. Differential responses of human hepatocytes to the non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine. *J Toxicol Sci.* 2013; 38(5):741-52.
290. Shang H, Zhao J, Yao J, Wang H, Dong J, Liao L. Nevirapine Increases Sodium/Iodide Symporter-Mediated Radioiodide Uptake by Activation of TSHR/cAMP/CREB/PAX8 Signaling Pathway in Dedifferentiated Thyroid Cancer. *Front Oncol.* 2020; 10:404.
291. Chen YJ, Campbell HG, Wiles AK, Eccles MR, Reddel RR, Braithwaite AW, et al. PAX8 regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase RNA component in glioma. *Cancer Res.* 2008; 68(14):5724-32.
292. Lombardi F, Sanfilippo A, Fabbiani M, Borghetti A, Ciccullo A, Tamburrini E, Di Giambenedetto S. Blood telomere length gain in people living with HIV switching to dolutegravir plus lamivudine versus continuing triple regimen: a longitudinal, prospective, matched, controlled study. *J Antimicrob Chemother.* 2023; 78(9):2315-2322.
293. Solomon A, Tennakoon S, Leeansyah E, Arribas J, Hill A, Van Delft Y, et al. No difference in the rate of change in telomere length or telomerase activity in HIV-infected patients after three years of darunavir/ritonavir with and without nucleoside analogues in the MONET trial. *PLoS One.* 2014; 9(11):e109718.
294. Fasching CL. Telomere length measurement as a clinical biomarker of aging and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018; 55(7):443-465.
295. Elston RC, Forthofer R. Testing for Hardy-Weinberg equilibrium in small samples. *Biometrics.* 1977; 33(3):536-542.

296. Milosevic O, Nikolic N, Carkic J, Majstorovic N, Glisic B, Milasin J. Analysis of COL1A1 and MMP9 single nucleotide polymorphisms in mandibular prognathism. *Genetika*. 2022; 54(2):777–786.
297. Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, et al. Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet*. 2009; 41(2):221-7.
298. Rampazzo E, Cecchin E, Del Bianco P, Menin C, Spolverato G, Giunco S, et al. Genetic Variants of the *TERT* Gene, Telomere Length, and Circulating *TERT* as Prognostic Markers in Rectal Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(11):3115.
299. Soerensen M, Thinggaard M, Nygaard M, Dato S, Tan Q, Hjelmborg J, et al. Genetic variation in TERT and TERC and human leukocyte telomere length and longevity: a cross-sectional and longitudinal analysis. *Aging Cell*. 2012; 11(2):223-7.
300. Liu Y, Cao L, Li Z, Zhou D, Liu W, Shen Q, et al. A genome-wide association study identifies a locus on TERT for mean telomere length in Han Chinese. *PLoS One*. 2014; 9(1):e85043
301. Lan Q, Cawthon R, Gao Y, Hu W, Hosgood HD 3rd, Barone-Adesi F, et al. Longer telomere length in peripheral white blood cells is associated with risk of lung cancer and the rs2736100 (CLPTM1L-TERT) polymorphism in a prospective cohort study among women in China. *PLoS One*. 2013; 8(3):e59230.
302. Al-Dehaini DMB, Al-Bustan SA, Malalla ZHA, Ali ME, Sater M, Giha HA. The influence of TERC, TERT and ACYP2 genes polymorphisms on plasma telomerase concentration, telomeres length and T2DM. *Gene*. 2021; 766:145127.
303. Tilkian SM, Lefevre G. Altered folate metabolism in early HIV infection. *JAMA*. 1988; 259(21):3128–3129.
304. Courtemanche C, Elson-Schwab I, Mashiyama ST, Kerry N, Ames BN. Folate deficiency inhibits the proliferation of primary human CD8+ T lymphocytes in vitro. *J Immunol*. 2004; 173(5):3186–3192.
305. Revell P, O'Doherty MJ, Tang A, Savidge GF. Folic acid absorption in patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Intern Med*. 1991; 230(3):227–231.
306. Adhikari PM, Chowta MN, Ramapuram JT, Rao SB, Udupa K, Acharya SD. Effect of vitamin B12 and folic acid supplementation on neuropsychiatric symptoms and immune response in HIV-positive patients. *J Neurosci Rural Pract*. 2016; 7(3):362–367.
307. Miner SES, Evrovski J, Cole DEC. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem*. 1997; 30(3):189–201.
308. Park W-C, Chang J-H. Clinical implications of methylenetetrahydrofolate reductase mutations and plasma homocysteine levels in patients with thromboembolic occlusion. *Vasc Specialist Int*. 2014; 30(4):113–119.
309. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2007; 13(3):225-38.
310. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 1996; 98(1):5-7.
311. Baba H, Bouqdayr M, Saih A, Bensghir R, Ouladlahsen A, Sodqi M, et al. Association between Methylene-Tetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Morocco. *Lab Med*. 2023; 54(1):23-29.
312. Brattström L, Wilcken DE. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(2):315–323.
313. Malavazi I, Abrão EP, Mikawa AY, Tagliavini SA, da Costa PI. Avaliação do polimorfismo no gene da metilenotetrahidrofolato redutase e concentração de folato e vitamina B12 em pacientes portadores do HIV-1 em tratamento com anti-retrovirais [Evaluation of the

polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene and the levels of folate and B12 in HIV-infected patients under antiretroviral therapy]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004; 37(6):469-75.

314. Cerne JZ, Pohar-Perme M, Cerkovnik P, Gersak K, Novakovic S. Functional variants in CYP1B1, KRAS and MTHFR genes are associated with shorter telomere length in postmenopausal women. *Mech Ageing Dev.* 2015; 149:1-7.

315. Liu JJ, Prescott J, Giovannucci E, Hankinson SE, Rosner B, De Vivo I. One-carbon metabolism factors and leukocyte telomere length. *Am J Clin Nutr.* 2013; 97(4):794-9.

316. Pusceddu I, Herrmann M, Kirsch SH, Werner C, Hübner U, Bodis M, et al. One-carbon metabolites and telomere length in a prospective and randomized study of B- and/or D-vitamin supplementation. *Eur J Nutr.* 2017; 56(5):1887-1898.

317. Paul L, Cattaneo M, D'Angelo A, Sampietro F, Fermo I, Razzari C, et al. Telomere length in peripheral blood mononuclear cells is associated with folate status in men. *J Nutr.* 2009; 139(7):1273-8.

318. Toljić B, Milašin J, De Luka SR, Dragović G, Jevtović D, Maslač A, et al. HIV-Infected Patients as a Model of Aging. *Microbiol Spectr.* 2023; 11(3):e0053223.

Biografija kandidata

Ena Bukić je rođena u Beogradu 12.04.1985. godine, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu (smer Molekularna biologija i fiziologija, odsek Primenjena genetika) je upisala 2004. godine, a diplomirala 2014. godine sa prosečnom ocenom 8.18. U periodu od 2013. do 2014. godine je kao diplomac bila deo tima u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu Instituta za molekularnu genetiku i genetički inženjering. Laboratorija se bavi istraživanjem molekularne osnove bolesti i zdravlja. Od 2014. godine je zaposlena u Bezbednosno-informativnoj agenciji gde obavlja forenzička ispitivanja biološkog materijala za potrebe pravosudnih organa. Autor je 2 naučne publikacije koje su štampane u celini u časopisima indeksiranim u Journal Citation Reports listi.

Publikovani radovi iz teze:

1. **Bukic E**, Dragovic G, Toljic B, Obradovic B, Jadzic J, Jevtovic D, Milasin JM. Association between Combination Antiretroviral Therapy and Telomere Length in People Living with Human Immunodeficiency Virus. *Biology*. 2023 Sep 5;12(9):1210. (M21, IF 4.2)
2. **Bukic E**, Milasin JM, Toljic B, Obradovic B, Jadzic J, Jevtovic D, Dragovic G. TERT single nucleotide polymorphism rs2736098 but not rs2736100 is associated with telomere length in HIV-infected patients on cART. *Mol Biol Rep*. 2024; 51(1):147. (M23, IF 2.8)

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Ена Букић

Број индекса _____ МФ 09/15

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

УТИЦАЈ АНТИРЕТРОВИРУСНИХ ЛЕКОВА И ГЕНСКИХ ВАРИЈАНТИ *TERT* И
MTHFR ГЕНА НА ДУЖИНУ ТЕЛОМЕРА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ХИВ
ИНФЕКЦИЈОМ

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 12.06.2024.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ена Букић

Број индекса МФ 09/15

Студијски програм Медицинска фармакологија

Наслов рада

УТИЦАЈ АНТИРЕТРОВИРУСНИХ ЛЕКОВА И ГЕНСКИХ ВАРИЈАНТИ *TERT* И
MTHFR ГЕНА НА ДУЖИНУ ТЕЛОМЕРА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ХИВ
ИНФЕКЦИЈОМ

Ментори проф. др Гордана Драговић Лукић и проф. др Јелена Милашин

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду

Потпис аутора

У Београду, 12.06.2024.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

УТИЦАЈ АНТИРЕТРОВИРУСНИХ ЛЕКОВА И ГЕНСКИХ ВАРИЈАНТИ *TERT* И *MTHFR* ГЕНА НА ДУЖИНУ ТЕЛОМЕРА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ХИВ ИНФЕКЦИЈОМ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA) (Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 12.06.2024.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.