
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Modelarea răspunsului imun umoral la pacienții infectați cu virusul imunodeficienței umane dobândite

Doctorand: **Cristian JIANU**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Sorana D. BOLBOACĂ**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
1. Infecția cu virusul imunodeficienței umane dobândite	5
1.1. La nivelul globului	6
1.2. Europa	7
1.3. România	9
2. Etiologie	15
3. Ciclul de viață și patogenеза infecției HIV	19
4. Răspunsul imun la infecția HIV	23
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	27
1. Obiective	29
2. Metodologie generală	31
2.1. Clasificarea infecției cu HIV	31
2.2. Tratamentul infecției cu HIV	31
3. Studiul 1: Cercetări asupra infecției cu virusul imunodeficienței umane dobândite în regiunea de nord-vest a României	35
3.1. Introducere	35
3.2. Scop	36
3.3. Material și metodă	36
3.3.1. Design-ul studiului	36
3.3.2. Analiza statistică	37
3.4. Rezultate	38
3.5. Discuții	45
3.6. Concluzii	47
4. Studiul 2. Cascada îngrijirilor pacienților care trăiesc cu infecție HIV din județul Cluj	49
4.1. Introducere	49
4.2. Scop	50
4.3. Material și metodă	50
4.3.1. Design-ul studiului	50
4.3.2. Analiza statistică	51
4.4. Rezultate	51
4.5. Discuții	53
4.6. Concluzii	56
5. Studiul 3. Evaluarea a patru interleukine serice ca markeri ai eficacității tratamentului la pacienții naivi infectați cu HIV: studiu pilot	57
5.1. Introducere	57
5.2. Scop	58
5.3. Material și metodă	59

5.3.1. Designul studiului	59
5.3.2. Colectarea probelor și măsurători	59
5.3.3. Analiza statistică	60
5.4. Rezultate	60
5.4.1. Caracteristici clinice și date demografice	60
5.4.2. Nivelurile serice ale markerilor imuni înainte și după 6 luni tratament	60
5.4.3. Comparație între parametrii inițiali versus cei după 6 luni de tratament antiretroviral combinat cu inhibitori de integrază și inhibitori de protează	62
5.4.4. Raltegravir vs. Dolutegravir vs. Elvitegravir vs. Darunavir/r	66
5.5. Discuții	68
5.6. Concluzii	71
6. Studiul 4. Evaluarea a patru interleukine serice la pacienții infectați cu HIV aflați în tratament antiretroviral: studiu pilot	73
6.1. Introducere	73
6.2. Material și metodă	74
6.2.1. Design-ul studiului	74
6.2.2. Colectarea probelor și realizarea determinărilor	74
6.2.3. Analiza statistică	74
6.3. Rezultate	75
6.4. Discuții	78
6.5. Concluzii	80
7. Concluzii generale	81
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	83
REFERINȚE	85

Cuvinte cheie: Virusul imunodeficienței umane (HIV - *Human Immunodeficiency Virus*), interleukine, terapie antiretrovirală combinată (cART - *combined antiretroviral therapy*)

INTRODUCERE

Infecția HIV rămâne o problemă de sănătate publică, în ciuda celor 30 de ani care au trecut de la identificarea virusului imunodeficienței umane dobândite de către Luc Montaigner. Modificările sistemului imun umoral la pacienții care trăiesc cu infecție HIV prezintă relevanță clinică atât în contextul pacienților la care se inițiază tratamentul specific cât și la cei care sunt sub tratament antiretroviral.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Secțiunea *Stadiul actual al cunoașterii* prezintă actualizarea cunoștințelor asupra infecției HIV atât din punct de vedere epidemiologic cât și patogenetic. La nivel global trăiau 37,7 milioane de persoane infectate HIV la sfârșitul anului 2020, iar în cursul anului s-au înregistrat 1,5 milioane de cazuri noi și 680.000 de decese. Comparativ cu 2010, numărul de cazuri noi a scăzut la 1,5 milioane de la 2,1 milioane, cea mai importantă scădere înregistrându-se la grupa de vârstă 0-14 ani (53%). În regiunea europeană, la sfârșitul anului 2019 s-au înregistrat 136.449 de cazuri noi, cele mai multe fiind raportate în sectorul estic al acestei regiuni. Numărul de cazuri noi raportate în cadrul Uniunii Europene este de 24801. În România, la sfârșitul anului 2020 trăiau 16848 de persoane infectate cu HIV. O particularitate a epidemiologiei infecției HIV în România o constituie persoanele infectate la sfârșitul anilor 1980 și începutul anilor 1990, prin manopere medicale, consecința unui accident epidemiologic, și care, în prezent, fac parte din grupa de vârstă 30-34 ani reprezentând așa-numita Cohortă românească. Din numărul total de pacienți aflați în evidență activă, 70% se află în tratament antiretroviral.

Patogenia infecției HIV este încă incomplet cunoscută. Cele mai importante celule afectate sunt limfocitele T și macrofagele, dar pot fi infectate și celule intestinale, pulmonare, cardiace, hepatice, de la nivelul glandelor salivare, sau celulele microgliale. Răspunsul imun eficient la infecția HIV este datorat limfocitelor CD8 citotoxice specifice virusului. Cantitatea mare de copii virale produse zilnic (10 miliarde) depășește capacitatea de epurare a limfocitelor CD8 HIV-specifice care treptat dispar înainte de a putea realiza eliminarea completă a agentului patogen. Astfel se realizează o infecție persistentă. În procesul de inflamație cronică sunt implicați mulți mediatori imuni celulari și umorali, între citokinele implicate fiind atât cele cu rol pro-inflamator cât și cele cu rol anti-inflamator.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1: Cercetări asupra infecției cu virusul imunodeficienței umane dobândite în regiunea de nord-vest a României

Scop: Caracterizarea populația care trăiește cu infecție HIV în zona de nord-vest a României pentru realizarea unor grupe de persoane țintă în vederea îmbunătățirii accesului la consiliere privind prevenția și testarea HIV și accesul la servicii medicale.

Material și metode: Studiul a fost retrospectiv, de cohortă și s-au urmărit toți pacienții cu infecție HIV care au fost monitorizați și tratați în Centrul Regional de Monitorizare și Supraveghere a infecției HIV/SIDA Cluj. Au fost luați în studiu toți pacienții care s-au adresat serviciului între 1989 și 2018.

Rezultate: Au fost evaluați un total de 914 pacienți infectați HIV, cu vârste cuprinse între 0 (nou-născuți din mame infectate cu HIV) până la 72 de ani. Majoritatea persoanelor au fost bărbați (bărbați:femei = 596:318). Raportul bărbați (B) față de femeii (F) s-a schimbat de la 1:1 la începutul anilor 2000 la aproape 2:1 (B:F = 596:318), ceea ce ar putea fi explicat prin creșterea numărului de bărbați care fac sex cu bărbați (BSB). În majoritatea cazurilor, calea de transmitere cea a infecției HIV a fost cea sexuală, pacienții infectați prin utilizarea drogurilor intravenoase fiind <1%. Infecția cu virusul hepatitic B (10,7%, majoritatea aparținând cohorții românești) a fost mai frecventă comparativ cu infecția cu virusul hepatitic C (3,39%). Un număr semnificativ mai mare de pacienți din cohorta românească au avut co-morbidități asociate (83,1%) comparativ cu cei cu HIV cu transmitere sexuală (63,3%). Cea mai frecventă infecție oportunistă rămâne tuberculoza cu localizare pulmonară și extrapulmonară, urmată de pneumonia bacteriană. Până la 31 decembrie 2018 s-au înregistrat 160 de decese în rândul pacienților luați în studiu (~20%). Principalele cauze de deces au fost tuberculoza pulmonară și extrapulmonară, urmată de pneumonia cu *Pneumocystis jirovecii* și infecțiile bacteriene severe (sepsis). Șaizeci și opt de copii s-au născut din mame infectate HIV și se află în observație, iar 17 dintre ei au fost infectați (25%). Doi din cei 17 copii au murit, unul din cauza tuberculozei și celălalt datorită sindromului de detresă respiratorie. Toți copiii HIV-pozitivi s-au născut înainte de 2014, aproape un sfert (23,5%) s-au născut înainte de 2004. Rata de transmitere verticală (mamă-copil) a scăzut în perioada de studiu, de la 60% în perioada 1998-2004 la 45% în perioada 2005-2011 și 7% în perioada 2012-2018. Niciun copil născut după 2015 nu a fost infectat cu HIV.

Concluzii: Principala cale de transmitere a infecției HIV a fost cea sexuală, cazurile noi fiind depistate în stadii precoce ale infecției. Tuberculoza rămâne principala infecție oportunistă la persoanele infectate HIV la sfârșitul anilor 1980 (cohorta românească). Principalele cauze de deces au fost reprezentate de tuberculoză și pneumonia cu *Pneumocystis jirovecii*.

Studiu 2. Cascada îngrijirilor pacienților care trăiesc cu infecție HIV din județul Cluj

Scop: Evaluarea nivelului de atingere a obiectivelor trasate de Organizația Mondială a Sănătății penru anul 2020 (Fast Track Tagets: 90-90-90) în rândul pacienților infectați HIV care trăiesc în județul Cluj.

Material și metode: Studiul a fost retrospectiv, de cohortă și s-au urmărit toți pacienții cu infecție HIV care au fost monitorizați și tratați în Centrul Regional de Monitorizare și Supraveghere a infecției HIV/SIDA Cluj, cu domiciliu în județul Cluj, în dorința de a evalua nivelul de atingere a obiectivelor propuse de OMS pentru anul 2020 comparativ cu anul 2016.

Rezultate: La sfârșitul anului 2016 erau în evidență 254 pacienți cu infecție HIV care locuiau în județul Cluj dintr-un număr de 467 (54,38%) de persoane care erau în evidența Centrului Regional Cluj. La sfârșitul anului 2020, numărul pacienților în evidență din județul Cluj a fost de 368 dintr-un total de 738 (49,86%). Numărul de persoane care trăiesc cu HIV din județul Cluj a crescut între 2016 și 2020 cu 114.

În România, la sfârșitul anului 2016 83% din totalul pacienților cu infecție HIV erau diagnosticați. În decembrie 2020 acest procent a crescut la 88%. La sfârșitul anului 2016, 87,88% din pacienți erau în evidență activă dintr-un număr de 289, pentru ca în decembrie 2020, 95,58% din persoanele diagnosticate să fie în evidență activă dintr-un număr de 385. Primul obiectiv „90” al Organizației Mondiale a Sănătății a fost realizat.

Procentul de pacienți care se află în tratament antiretroviral a crescut de la 88,98% în 2016 la 97,28% în 2020, astfel încât al doilea obiectiv „90” a fost atins.

Procentul pacienților care se află sub tratament antiretroviral și au o încărcătură virală sub 200 copii/ml a crescut de la 81,40% în 2016 la 91,62% în 2020, realizând și cel de-al treilea obiectiv „90”.

Procentul pacienților care au sarcină virală nedetectabilă raportat la numărul total al persoanelor aflate în evidență a crescut de la 72,44% în 2016 la 89,13% în 2020, depășind astfel obiectivul de „73%” de persoane cu supresie virală recomandat de OMS.

Referitor la medicamentele antiretrovirale folosite, la nivelul județului Cluj, procentul de pacienți tratați cu inhibitori de integrază a crescut de la 17,25% în 2016 la 45,8% în 2020. Procentul pacienților aflați în tratament cu inhibitori de protează a scăzut de la 51,8% în 2016 la 39,10% în 2020. Procentul pacienților tratați cu inhibitori non-nucleozidici de reverstranscriptază a scăzut de la 31% în 2016 la 15,1% în 2020. Un număr redus de pacienți (20) 5,58% se află în tratament cu o singură tabletă (single tabet regimen).

Concluzii: La sfârșitul anului 2020, toate cele trei obiective trasate de Organizația Mondială a Sănătății au fost atinse în cazul pacienților care locuiesc în județul Cluj. Procentul persoanelor tratate cu inhibitori de integrază a crescut de aproximativ 2,5 ori în detrimentul pacienților tratați cu inhibitori de integrază și inhibitori non-nucleozidici de reverstranscriptază.

Studiul 3. Evaluarea a patru interleukine serice ca markeri ai eficacității tratamentului la pacienții naivi infectați cu HIV: studiu pilot

Scop: Compararea impactul inhibitorilor de integrază (Dolutegravir, Raltegravir, Elvitegravir) și a unui inhibitor de protează (Darunavir boostat, Darunavir / r) asupra a patru markeri solubili ai activării imune (IL-4, IL -10, IL- 13, IL-21), la momentul inițial și după 6 luni de terapie antiretrovirală.

Material și metode: Am realizat un studiu de cohortă cu colectare prospectivă de date în cadrul Centrului Regional HIV/SIDA din Cluj, România, din iunie 2018 până în ianuarie 2020. Criteriile de includere au fost: pacienți nou diagnosticați cu infecție HIV, pacienți fără cART și fără nicio altă infecție virală sau bacteriană documentată.

Criteriile de excludere au fost: pacienți cu boli cardiovasculare, diabet zaharat, tumori maligne, boli inflamatorii sistemice, condiții de definitorii SIDA constatate în momentul diagnosticului.

Rezultate: Treizeci și unu de subiecți, cu vârsta între 19 și 54 de ani, au fost incluși în studiu. Cu o singură excepție, persoanele incluse în eșantionul studiat au fost bărbați, iar cel mai frecvent mod de transmitere a infecției HIV a fost pe cale sexuală (BSB - 61,29%, heterosexual -35,48%). Tuturor pacienților li s-a inițiat tratament antiretroviral combinat format din doi inhibitori nucleozidici de reverstranscriptază (emtricitabină/tenofovir sau lamivudina+ tenofovir) și un al treilea medicament.

Al treilea medicament din schema de tratament antiretroviral a fost un inhibitor de integrază pentru majoritatea subiecților (22/31) sau un inhibitor de protează (9/31). Alegerea celui de-al treilea medicament antiretroviral a fost după cum urmează: Raltegravir (15/31), Darunavir/ritonavir (9/31), Dolutegravir (4/31), Elvitegravir/cobicistat (3/31).

După 6 luni de tratament, sarcina virală a fost nedetectabilă în 13/15 pacienți tratați cu Raltegravir, 6/9 pacienți tratați cu Darunavir/ritonavir, 3/4 pacienți din brațul cu Dolutegravir și 3/3 pacienți tratați cu Elvitegravir/cobicistat.

În studiul nostru, nivelurile serice de IL-10 au fost corelate semnificativ cu un număr crescut de limfocite T CD4, cu raportul CD4 / CD8 și cu valoarea inițială a încărcăturii virale. După 6 luni de tratament antiretroviral, pacienții tratați cu Dolutegravir au avut o scădere semnificativă din punct de vedere statistic a valorii IL-10. Dintre inhibitorii de integrază, Elvitegravir/cobicistat și Dolutegravir au avut cel mai bun efect în scăderea nivelului seric al IL-10 după 6 luni de tratament.

Am constatat că sub Raltegravir și Darunavir/r, nivelurile serice de IL-13 au crescut, în timp ce la pacienții tratați cu Elvitegravir/cobicistat și Dolutegravir, nivelurile IL-13 au scăzut.

În studiul nostru, am raportat niveluri nedetectabile ale IL-21 la 30/31 de pacienți după 6 luni de tratament antiretroviral. Singurul pacient cu valoare detectabilă a IL-21 a fost tratat cu Darunavir/r și a avut viremie detectabilă după 6 luni de tratament antiretroviral.

Concluzii: Cea mai bună refacere imunologică în rândul pacienților din lotul studiat s-a înregistrat în rândul celor tratați cu dolutegravir prin creșterea numărului de limfocite T CD4, a raportului CD4/CD8 și scăderea semnificativ statistică a valorii serice a IL-10.

Toți inhibitorii de integrază folosiți au dus la valori serice nedetectabile a interleukinei proinflamatorii IL-21 după 6 luni de tratament, darunavir/r a redus semnificativ valoarea ei. Inhibitorii de integrază contribuie și la refacerea funcționalității sistemului imun, pe lângă efectul antiviral.

Studiul 4. Evaluarea a patru interleukine serice la pacienții infectați cu HIV aflați în tratament antiretroviral: studiu pilot

Scop: evaluarea valorilor serice a unei interleukine cu efect pro-inflamator (IL-21) și a trei interleukine cu efect anti-inflamator (IL-4, IL-10, IL-13) la pacienți infectați HIV aflați sub tratament antiretroviral și de a corela valorile obținute cu schema de tratament în încercarea de a determina care medicamente au cel mai bun efect în refacerea funcționalității sistemului imun.

Material și metode: Am realizat un studiu de cohortă cu colectare prospectivă de date în cadrul Centrului Regional HIV/SIDA din Cluj, România, din iunie 2018 până în ianuarie 2020. Criteriile de includere au fost: pacienți diagnosticați cu infecție HIV, pacienți cu cART și fără nicio altă infecție virală sau bacteriană documentată. Criteriile de excludere au fost: pacienți cu boli cardiovasculare, diabet zaharat, tumori maligne, boli inflamatorii sistemice, condiții de definitorii SIDA.

Rezultate: Nouăsprezece subiecți au fost incluși în studiu, 12 bărbați și 7 femei. Vârsta medie a pacienților înrolați a fost de 38,84 ani (22-68 ani). Durata medie care a trecut din momentul diagnosticului până la includerea în studiu a fost de 8,36 ani (2-18 ani). Cinci pacienți fac parte din Cohorta românească, iar restul de 14 recunosc calea de transmitere sexuală.

Schemele de tratament ale pacienților luați în studiu cuprindeau 2 inhibitori nucleozidici de revers transcriptază și un inhibitor de protează (7/19) sau un inhibitor de integrază (7/19) sau un inhibitor non-nucleozidic de reverstrascriptază (5/19). Viremia HIV a fost nedetectabilă în cazul tuturor pacienților incluși în studiu.

Numărul mediu de limfocite T CD4 este similar în cele trei grupe de tratament, diferențe înregistrându-se pentru valorile limfocitelor T CD8 și a raportului CD4/CD8, pacienții cu transmitere sexuală având valori mai bune ale acestui raport. Pacienții cu infecție veche au un raport CD4/CD8 subunitar în majoritatea cazurilor, spre deosebire de persoanele infectate pe cale sexuală la care raportul CD4/CD8 este majoritar supraunitar. De asemenea, valorile medii ale interleukinelor 4 și 10 sunt mai mari în rândul pacienților cu infecție HIV cu transmitere sexuală față de pacienții din cohorta românească. Valorile interleukinelor 13 și 21 sunt nedetectabile în rândul majorității pacienților din ambele grupuri studiate. Schemele de tratament antiretroviral au fost cu inhibitori de integrază 2/5 pacienți din cohorta românească și 4/14 pacienți din grupul celor cu transmitere sexuală a infecției HIV. În tratament cu inhibitori de protează au fost 2/5 față de 5/14. Un număr de 5 pacienți din grupul celor cu transmitere sexuală a infecției HIV sunt în tratament cu inhibitori non-nucleozidici de reverstrascriptază.

Pacienții care fac parte din cohorta românească, tratați cu inhibitori de protează au o refacere imunologică mai bună decât cei tratați cu inhibitori de integrază printr-o creștere mai mare a numărului de celule CD4 și CD8, un raport CD4/CD8 mai bun. În

ambele situații valorile IL-4 și IL-10 sunt similare. În cazul pacienților infectați pe cale sexuală, cea mai buna refacere imunologică s-a obținut în cazul celor tratați cu inhibitori de integrază și inhibitori non-nucleozidici de reverstranscriptază, prin creșterea numărului de limfocite T CD4, raport CD4/CD8 supraunitar. IL-4 este mai scăzută în cazul pacienților tratați cu inhibitori de integrază, iar IL-10 este mai scăzută în cazul celor tratați cu inhibitori non-nucleozidici de reverstranscriptază.

Concluzii: Pacienții cu infecție HIV veche au un răspuns imunologic mai bun la tratamentul cu inhibitori de protează, atât în ceea ce privește creșterea numărului de limfocite T CD4 cât și prin scăderea valorilor interleukinelor antiinflamatoare. Pacienții cu infecție HIV recentă au o refacere imunologică mai bună sub tratament cu inhibitori de integrază decât sub tratament cu inhibitori de protează. Rezultatele raportate pe subiecți sub tratament antiretroviral sugerează un posibil efect antiinflamator asociat celui antiviral în cazul inhibitorilor non-nucleozidici de reverstranscriptază.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Elementele originale ale acestei teze sunt date de prezentarea situației epidemiologice a infecției HIV în regiunea de nord-vest a României, care nu a mai fost prezentat până în prezent.

Raportarea atingerii celor trei obiective ale Organizației Mondiale a Sănătății în județul Cluj este prima de acest fel care s-a făcut la noi în țară și este printre puținele raportări din lume.

Sunt puține studii în lume iar în România nu am găsit niciunul care să evalueze modificările valorilor citokinelor după introducerea tratamentului antiretroviral combinat, astfel încât să se poată realiza și o apreciere asupra restabilirii funcționalității sistemului imun în cursul tratamentului antiretroviral. Rezultatele studiilor pilot realizate indică existența unor scheme terapeutice care se asociază cu o refacere imunologică mai bună (inhibitori de integrază la pacienții HIV pozitivi naivi) sau cu un efect antiinflamator asociat (inhibitorii non-nucleozidici de reverstranscriptază la pacienții cu cART). Aceste rezultate necesită însă validarea pe un eșantion mai mare, în cadrul unui studiu multicentric.

Cunoașterea aspectelor epidemiologice ale infecției HIV permite intervenții comportamentale asupra grupelor de risc și, prin aceasta, la scăderea transmiterii infecției și astfel eradicarea ei. Accesul la îngrijiri medicale și la tratament antiretroviral permite, de asemenea, scăderea încărcăturii virale comunitare și, în consecință, a transmiterii infecției.

PHD THESIS ABSTRACT

Modeling the humoral immune response in patients infected with the acquired human immunodeficiency virus

PhD Student: **Cristian JIANU**

PhD Scientific Coordinator: **Prof. Dr. Sorana D. BOLBOACĂ**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Contents of the PhD thesis

INTRODUCTION	1
CURRENT STATE OF ART	3
1. Acquired human immunodeficiency virus infection	5
1.1. Worldwide	6
1.2. Europe	7
1.3. Romania	9
2. Etiology	15
3. Life cycle and pathogenesis of HIV infection	19
4. Immune response to HIV infection	23
PERSONAL CONTRIBUTION	27
1. Objectives	29
2. General methodology	31
2.1. HIV infection classification	31
2.2. HIV infection treatment	31
3. Study 1: Research on human immunodeficiency virus acquired infection in the northwestern region of Romania	35
3.1. Introduction	35
3.2. Objectives	36
3.3. Material and method	36
3.3.1. Study design	36
3.3.2. Statistic analysis	37
3.4. Results	38
3.5. Discussions	45
3.6. Conclusions	47
4. Study 2. Cascade of care for patients living with HIV infection in Cluj County	49
4.1. Introduction	49
4.2. Objectives	50
4.3. Material and method	50
4.3.1. Study design	50
4.3.2. Statistic analysis	51
4.4. Results	51
4.5. Discussions	53
4.6. Conclusions	56
5. Study 3. Evaluation of four serum interleukins as markers of treatment efficacy in naïve HIV-infected patients: pilot study	57
5.1. Introduction	57
5.2. Objectives	58
5.3. Material and method	59

5.3.1. Study design	59
5.3.2. Collection of samples and measurements	59
5.3.3. Statistical analysis	60
5.4. Results	60
5.4.1. Clinical features and demographics	60
5.4.2. Serum levels of immune markers before and after 6 months of treatment	60
5.4.3. Comparison of baseline versus 6 months of combination antiretroviral therapy with integrase inhibitors and protease inhibitors	62
5.4.4. Raltegravir vs. Dolutegravir vs. Elvitegravir vs. Darunavir/r	66
5.5. Discussions	68
5.6. Conclusions	71
6. Study 4. Evaluation of four serum interleukins in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: pilot study	73
6.1. Introduction	73
6.2. Material and method	74
6.2.1. Study design	74
6.2.2. Collection of samples and measurements	74
6.2.3. Statistical analysis	74
6.3. Results	75
6.4. Discussions	78
6.5. Conclusions	80
7. General conclusions	81
8. Originality and innovative contributions of the thesis	83
REFERENCES	85

Keywords: Human Immunodeficiency Virus (HIV), interleukins (ILs), combined antiretroviral therapy (cART)

INTRODUCTION

HIV infection remains a public health problem, despite the 30 years that have passed since the identification of the acquired human immunodeficiency virus by Luc Montaigner. Changes in the humoral immune system in patients living with HIV infection are clinically relevant for patients initiating specific treatment as well as for those under antiretroviral therapy.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

The *Current State of Art* section presents the update of knowledge on HIV infection both from an epidemiological and pathogenetic point of view. Globally, 37.7 million people were infected with HIV at the end of 2020, and 1.5 million new cases and 680,000 deaths were recorded during the year. Compared to 2010, the number of new cases decreased to 1.5 million from 2.1 million, the most significant decrease being in the 0-14 age group (53%). In the European region, at the end of 2019, 136,449 new cases were registered, most of them from the eastern part of this region. The number of new cases reported in the European Union is 24801. In Romania, at the end of 2020, 16,848 people were living with HIV. A peculiarity of the epidemiology of HIV infection in Romania is the infected people in the late 1980s and early 1990s, through medical procedures, the consequence of an epidemiological accident, and who are currently part of the age group 30-34 years representing the so-called Romanian cohort. Of the total number of active patients, 70% are on antiretroviral therapy.

The pathogenesis of HIV infection is still incompletely known. The most critical affected cells are T lymphocytes and macrophages, but also intestinal, lung, cardiac, liver, salivary gland, or microglial cells can also be infected. The effective immune response to HIV infection is due to virus-specific cytotoxic CD8 lymphocytes. The large number of viral copies produced daily (10 billion) exceeds the ability to clear HIV-specific CD8 lymphocytes that gradually disappear before the pathogen can be completely eliminated. This creates a persistent infection. Many cellular and humoral immune mediators are involved in the process of chronic inflammation, among the cytokines involved being both those with a pro-inflammatory role and those with an anti-inflammatory role.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1: Research on human immunodeficiency virus acquired infection in the northwestern region of Romania

Aim: Characterization of the population living with HIV infection in the northwestern part of Romania to create evidence for improvement of the access to counseling on HIV prevention and testing and access to medical services.

Material and method: The study was retrospective, cohort type and evaluated all patients with HIV infection who were monitored and treated in the Regional Center for Monitoring and Surveillance of HIV / AIDS Cluj. All patients addressing medical care between 1989 and 2018 were included in the study.

Results: A total of 914 HIV-infected patients aged 0 (newborns of HIV-infected mothers) up to 72 years of age were included in the study. Most participants were men (men: women = 596: 318). The men (M) to women (W) changed from 1:1 in the early 2000s to almost 2:1 (M:W = 596:318), which could be explained by the increase in the number of men doing sex with men (MSM). In most cases, the route of transmission of HIV infection was sexual, with patients infected using intravenous drugs being <1%. Hepatitis B coinfection (10.7%, most belonging to the Romanian cohort) was more common than hepatitis C coinfection (3.39%). A significantly higher number of patients in the Romanian cohort had associated co-morbidities (83.1%) than those with sexually transmitted HIV (63.3%). The most common opportunistic infection remains tuberculosis with pulmonary and extra-pulmonary localization, followed by bacterial pneumonia. As of December 31, 2018, there were 160 deaths among the patients studied (~ 20%). The main causes of death were pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, followed by *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and severe bacterial infections (sepsis). Sixty-eight children were born from HIV-infected mothers and were under observation, and 17 of them were infected (25%). Two of the 17 children died, one from tuberculosis and the other from respiratory distress syndrome. All HIV-positive children were born before 2014, out of which almost a quarter (23.5%) were born before 2004. The vertical transmission rate (mother-child) decreased during the study period, from 60% in 1998-2004 to 45% in 2005-2011 and 7% in 2012-2018. No children born after 2015 have been infected with HIV.

Conclusions: The main route of transmission of HIV infection was sexual, with new cases being detected in the early stages of the disease. Tuberculosis remains the primary opportunistic infection in HIV-infected people in the late 1980s (Romanian cohort). The leading causes of death were tuberculosis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia.

Study 2. Cascade of care for patients living with HIV infection in Cluj County

Introduction: In Romania, at the end of 2016, 83% of all patients with HIV infection were diagnosed. In December 2020 this percentage increased to 88%.

Aim: Assessing the level of achievement of the objectives set by the World Health Organization for 2020 (Fast Track Targets: 90-90-90) among HIV-infected patients living in Cluj County.

Material and method: The study was retrospective, cohort type and included all patients with HIV infection who were monitored and treated in the Regional Center for Monitoring and Surveillance of HIV / AIDS in Cluj, based in Cluj County, to assess the level of achievement of the objectives proposed by the WHO for 2020, comparing the achievements in 2016 with those in 2020.

Results: At the end of 2016, 254 patients with HIV infection were living in Cluj County out of 467 (54.38%) people registered within the Cluj Regional Center. At the end of 2020, the number of registered patients in Cluj County was 368 out of a total of 738 (49.86%). The number of people living with HIV in Cluj County increased between 2016 and 2020 by 114.

At the end of 2016, 87.88% (n=289) of patients were under active surveillance; in December 2020, 95.58% (n=385) of Cluj County people diagnosed were under active surveillance. The first "90" WHO objective has been achieved.

The percentage of patients on antiretroviral therapy increased from 88.98% (2016) to 97.28% (2020), so that the second goal WHO "90" was reached.

The percentage of patients undergoing antiretroviral therapy and having a viral load below 200 copies / ml increased from 81.40% (2016) to 91.62% (2020), achieving the third goal WHO "90".

The percentage of patients with undetectable viral load compared to the total number of eligible registered persons increased from 72.44% in 2016 to 89.13% in 2020, thus exceeding the target of "73%" of people with viral suppression recommended by the WHO.

Regarding the antiretroviral drugs used in Cluj County, the percentage of patients treated with integrase inhibitors increased from 17.25% in 2016 to 45.8% in 2020. The percentage of patients treated with protease inhibitors decreased from 51.8% in 2016 to 39.10% in 2020. The percentage of patients treated with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors decreased from 31% in 2016 to 15.1% in 2020. A small number of patients (20) 5.58 % is being treated with a single tablet (single-tablet regimen).

Conclusions: At the end of 2020, all three objectives set by the World Health Organization were achieved in the case of patients living in Cluj County. The percentage of people treated with integrase inhibitors increased approximately 2.5-fold to the detriment of patients treated with integrase inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

Study 3. Evaluation of four serum interleukins as markers of treatment efficacy in naïve HIV-infected patients: a pilot study

Aim: Comparison of the impact of integrase inhibitors (Dolutegravir, Raltegravir, Elvitegravir) and a protease inhibitor (Darunavir boosted, Darunavir / r) on four soluble markers of immune activation (IL-4, IL-10, IL-13, IL-21), at baseline and after six months of antiretroviral therapy initiation.

Material and method: We conducted a cohort study with prospective data collection at the Regional HIV / AIDS Center in Cluj, Romania, from June 2018 to January 2020. The inclusion criteria were: newly diagnosed patients with HIV infection, patients without cART, or any other documented viral or bacterial infection. The exclusion criteria were: patients with cardiovascular disease, diabetes, malignancies, systemic inflammatory diseases, conditions defining AIDS found at the diagnosis.

Results: Thirty-one subjects, aged 19 to 54 years, were included in the study. With one exception, the people included in the sample studied were men, and the most common way of transmitting HIV infection was sexually (MSM -61.29%, heterosexual -35.48%). All patients received combination antiretroviral therapy consisting of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (emtricitabine / tenofovir or lamivudine + tenofovir) and a third drug.

The third drug in the antiretroviral regimen was an integrase inhibitor for most subjects (22/31) or a protease inhibitor (9/31). The choice of the third antiretroviral drug was as follows: Raltegravir (15/31), Darunavir / ritonavir (9/31), Dolutegravir (4/31), Elvitegravir / cobicistat (3/31).

After six months of treatment, viral load was undetectable in 13/15 patients treated with Raltegravir, 6/9 patients treated with Darunavir / ritonavir, 3/4 patients in the arm with Dolutegravir and 3/3 patients treated with Elvitegravir / cobicistat.

In our study, serum IL-10 levels were significantly correlated with increased CD4 T lymphocyte counts, CD4 / CD8 ratio, and baseline viral load. After 6 months of antiretroviral therapy, patients treated with Dolutegravir had a statistically significant decrease in IL-10. Among the integrase inhibitors, Elvitegravir / cobicistat and Dolutegravir had the best effect in lowering serum IL-10 levels after six months of treatment.

We found that under Raltegravir and Darunavir / r, serum IL-13 levels increased, while in patients treated with Elvitegravir / cobicistat and Dolutegravir, IL-13 levels decreased.

In our study, we reported undetectable levels of IL-21 in 30/31 patients after six months of antiretroviral therapy. The only patient with detectable IL-21 value was Darunavir / r and had detectable viremia after six months of antiretroviral therapy.

Conclusions: The best immunological restoration among patients in the study group was among those treated with dolutegravir by increasing the number of CD4 T lymphocytes, the CD4 / CD8 ratio and the statistically significant decrease in serum IL-

10. All integrase inhibitors used resulted in undetectable serum levels of the proinflammatory interleukin IL-21 after 6 months of treatment, but darunavir / r significantly reduced its value. Integrase inhibitors also contribute to the restoration of immune system function, in addition to the antiviral effect.

Study 4. Evaluation of four serum interleukins in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a pilot study

Aim: To evaluate the serum values of one pro-inflammatory interleukin (IL-21) and three anti-inflammatory interleukins (IL-4, IL-10, IL-13) in HIV-infected patients on antiretroviral therapy and to correlate the values obtained with the treatment regimen in an attempt to determine which drugs have the best effect in restoring the functionality of the immune system.

Material and method: The type and timing of study is identical with that presented in Study 3. The inclusion criteria were: patients diagnosed with HIV infection, patients with cART and no other documented viral or bacterial infection. The exclusion criteria were: patients with cardiovascular disease, diabetes, malignancies, systemic inflammatory diseases, conditions defining AIDS.

Results: Nineteen subjects were included in the study, 12 men and 7 women. The mean age of the enrolled patients was 38.84 years (22-68 years). From diagnosis to inclusion in the study, the mean duration was 8.36 years (2-18 years). Five patients are part of the Romanian Cohort, and the remaining 14 recognize the path of sexual transmission.

The treatment regimens of the studied patients included two nucleoside reverse transcriptase inhibitors and a protease inhibitor (7/19) or an integrase inhibitor (7/19) or a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (5/19). HIV viral load was undetectable in all patients included in the study.

The average number of CD4 T lymphocytes is similar in the three treatment groups, differences being registered for the values of CD8 T lymphocytes and the CD4 / CD8 ratio. The sexually transmitted patients have better values of this ratio. Patients with long-term infection have a subunit CD4 / CD8 ratio in most cases, as opposed to sexually infected individuals in whom the CD4 / CD8 ratio is predominantly over one. Also, the mean values of interleukins 4 and 10 are higher among patients with HIV infection with sexual transmission than patients in the Romanian cohort. Interleukin values 13 and 21 are undetectable in most patients in both groups studied. The antiretroviral treatment regimens were with integrase inhibitors 2/5 patients from the Romanian cohort and 4/14 patients from those with sexual transmission of HIV infection. In treatment with protease inhibitors were 2/5 compared to 5/14. Five patients in the group of those with sexual transmission of HIV infection are being treated with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

Patients who are part of the Romanian cohort treated with protease inhibitors have a better immunological recovery than those treated with integrase inhibitors by a higher increase in the number of CD4 and CD8 cells, a better CD4 / CD8 ratio. In both cases,

the IL-4 and IL-10 values are similar. In the case of sexually infected patients, the best immunological restoration was obtained in those treated with integrase inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, by increasing the number of CD4 T cells, CD4 / CD8 ratio over one. IL-4 is lower in patients treated with integrase inhibitors, and IL-10 is lower in those treated with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

Conclusions: Patients with long-term HIV infection have a better immune response to treatment with protease inhibitors, both in terms of increasing CD4 T lymphocytes and decreasing anti-inflammatory interleukin levels. Patients with recent HIV infection have a better immune restoration under treatment with integrase inhibitors than under treatment with protease inhibitors. The results reported in subjects on antiretroviral therapy suggest a possible anti-inflammatory effect associated with antiviral in the case of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

ORIGINALITY OF RESEARCH AND INNOVATIVE CONTRIBUTION

The original elements of this thesis are given by the presentation of the epidemiological situation of HIV infection in the northwestern region of Romania, which has not been presented so far.

Reporting on the achievement of the three objectives of the World Health Organization in Cluj County is the first of its kind in our country and is among the few reports in the world.

There are few studies in the world and Romania, we did not find any to evaluate changes in cytokine values after the introduction of combined antiretroviral treatment so that an assessment can be made on the restoration of immune system function during antiretroviral treatment. The results of the pilot studies indicate the existence of therapeutic regimens associated with better immunological recovery (integrase inhibitors in naive HIV-positive patients) or with an associated anti-inflammatory effect (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in patients with cART). However, these results require validation on a larger sample in a multicenter study.

Knowing the epidemiological aspects of HIV infection allows behavioral interventions on risk groups and, the intervention is expected to decrease the transmission rate and thus eradicate it. Access to healthcare and antiretroviral treatment also reduces the viral load in the community and, consequently, the transmission of the infection.