

**T.C.**

**SAKARYA ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**VİROLOJİ BİLİM DALI**

**BİYOBELİRTEÇLERİN YENİ TANILI HIV (+) BİREYLERİN  
PROGNOZUNU TAHMİN ETMEDEKİ ROLÜ**

**YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**DR. HANDE TOPTAN**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. MUSTAFA ALTINDİŞ**

**MART 2020**

## BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 16214662/050.01.04/26 sayılı kararı etik kurul onayı alınarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Mart 2020

Hande Toptan

## İçindekiler

	Sayfa
Beyan.....	1
İçindekiler .....	2
Tablolar Listesi .....	3
Kısaltmalar Listesi .....	4
ÖZET .....	5
ABSTRACT .....	6
1. AMAÇ ve KAPSAM .....	7
2. MATERYAL ve YÖNTEM .....	11
2.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler.....	11
2.2. Etik Kurul Onayı .....	11
2.3.Örneklerin Hazırlanması ve Analizi.....	11
2.3.1. CD4 (+) ve CD8 (+) T Hücrelerinde PD-1 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi:.....	12
2.3.2. Serum IP-10, IL-17 ve sCD-14 düzeylerinin belirlenmesi .....	13
2.3.3. RNA izolasyonu ve Kalite tayini.....	13
2.4. İstatistiksel Analiz.....	13
3. ANALİZ ve BULGULAR .....	14
4. TARTIŞMA.....	16
5. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	21
KAYNAKLAR .....	22

## Tablolar Listesi

	Sayfa
<b>Tablo 1.</b> Akım Sitometrisinde Yüzeyel Antikor boyaması	12
<b>Tablo 2.</b> PD1 düzeyi ve viral yüklerin tedavi ile değişimi	15



## Kısaltmalar Listesi

ART	Antiretroviral tedavi
HIV	Human Immunodeficiency Virus
PD-1	Programmed death-1
IP-10	IFN gama-induced protein 10
IL-17	Interlökin 17
sCD-14	Soluble cluster of differentiation 14
RNA	Ribonükleik asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
IFN	Interferon
TNF	Tümör nekroz faktörü
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
NAT	Nükleik asit testi

## ÖZET

Antiretroviral tedavi (ART), Human Immunodeficiency Virus (HIV) ile enfekte bireylerde viral yük ve immün sistem hücrelerini olumlu yönde etkileyerek yaşam beklentisini arttırmaktadır. Bu çalışmada yeni tanı almış HIV (+) hastalarda ART sonrası CD4 ve viral yük değişimleri ile PD-1 (Programmed death-1), IFN gama-induced protein 10'un (IP-10), interlökin 17 (IL-17) ve soluble cluster of differentiation 14 (sCD-14) molekül düzeylerinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamıza Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine başvuran, başka bir kronik hastalığı olmayan, yeni tanı almış ve ilk kez bu çalışma ile tedavisine başlanacak olan 30 ardışık HIV hastası dahil edilmiştir. Tüm hastaların izlem ve tedavi takibinde, tedavi öncesi ve tedavinin ilerleyen dönemlerinde (1. ve 3. aylarda); kantitatif HIV RNA düzeyleri ve CD4 (+) ve CD8 (+) T hücre seviyeleri belirlenmiştir. Çalışmamızda değerlendirilecek olan biyobelirteçlerden CD4 (+) ve CD8 (+) T hücrelerinden eksprese edilen PD-1 düzeylerinin akım sitometrisi kullanılarak, serum IP-10, IL-17 ve sCD-14 düzeylerinin ise ELISA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

CD4T hücrelerinden eksprese edilen PD-1 oranı ile viral yük değerleri arasında pozitif yönlü, orta düzeyde korelasyon ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ( $n=80$ ,  $r_s = 0.49614$ ,  $p<0.001$ ) bulunmuştur. CD8T'lerden eksprese edilen PD-1 oranı ile viral yük değerleri arasında pozitif yönlü, orta düzeyde korelasyon ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ( $n=80$ ,  $r_s = 0.50954$ ,  $p<0.001$ ) bulunmuştur. Hastaların hem tedavi almadığı hem tedavi altında olduğu dönemlerdeki IP-10, sCD-14 ve IL-17 düzeylerinin viral yük ile korele olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak PD-1'in viral yükün bir belirteci olabileceği; viremi ve tedavi yanıtındaki değişiklikleri izlemek için yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır. IP-10, IL-17, sCD14'ün de viral yükün bir belirteci olabildiği ve viremideki değişiklikleri izlemek için yararlı olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** HIV, PD-1, IP-10, IL-17, sCD14

## ABSTRACT

Antiretroviral therapy (ART) increases the life expectancy by affecting the viral load and immune system cells in individuals infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV). In this study, PD-1 (Programmed death-1), IFN gamma-induced protein 10 (IP-10), interleukin 17 (IL-17), with CD4 and viral load changes after ART in newly diagnosed HIV (+) patients Soluble cluster of differentiation 14 (sCD-14) is aimed to investigate the molecular levels.

In our study, 30 consecutive HIV patients who were admitted to Sakarya University Training and Research Hospital Infectious Diseases Outpatient Clinic, who did not have any other chronic disease, were diagnosed with this study for the first time and were included in this study. In all patients before and after treatment (1st and 3rd months); quantitative HIV RNA levels and CD4 (+) and CD8 (+) T cell levels were determined. The biomarkers to be evaluated in our study were determined by using flow cytometry of PD-1 levels expressed from CD4 (+) and CD8 (+) T cells, and serum IP-10, IL-17 and sCD-14 levels were determined using ELISA method.

A positive, moderate correlation and statistically significant relationship ( $n = 80$ ,  $r_s = 0.49614$ ,  $p < 0.001$ ) was found between the PD-1 ratio expressed from CD4T cells and the viral load values. A positive, moderate correlation and statistically significant relationship ( $n = 80$ ,  $r_s = 0.50954$ ,  $p < 0.001$ ) was found between the PD-1 ratio expressed from CD8T cells and the viral load values. It was found that IP-10, sCD-14 and IL-17 levels correlated with viral load during the treatment naive and on-treatment periods.

As a result, PD-1 may be a marker of viral load; It has been concluded that it may be useful for monitoring viremia and changes in treatment response. IP-10, IL-17, sCD14 are also thought to be a marker of viral load and are useful for monitoring changes in viremia.

**Keywords:** HIV, PD-1, IP-10, IL-17, sCD14

## 1. AMAÇ VE KAPSAM

Kazanılmış immünyetmezlik sendromu (acquired immunodeficiency syndrome/AIDS) olarak adlandırılan enfeksiyon hastalığının etyolojik ajanı olan HIV, önemli bir halk sağlığı problemidir. HIV/AIDS hastalığı ilk olarak 1981 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tanımlanmış, viral izolasyonu ise ilk olarak 1983 yılında gerçekleştirilmiştir. Virüsün, günümüzde, HIV-1 ve HIV-2 olarak isimlendirilen iki büyük serotipi bulunmaktadır. Dünya genelinde daha yaygın görülmekte olan HIV-1 serotipi, M, N, O ve P olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (1-3).

HIV'in neden olduğu enfeksiyonlar, asemptomatik taşıyıcılıktan hayatı tehdit eden fırsatçı enfeksiyonlar ve malignite gelişimine kadar değişiklik gösteren geniş bir klinik tabloya sahiptir (1). Virüse maruziyet sonrası, başta T lenfositler olmak üzere CD4 (+) hücrelerde sürekli viral replikasyona bağlı hücresel immünite progresif olarak baskılanmaktadır (4). Enfeksiyonun tanısı, enfekte kişiye antiretroviral tedavinin zamanında başlanması, başka bireylere bulaşın engellenmesi için önem taşımaktadır. HIV enfeksiyonunun laboratuvar tanısında, duyarlılığı yüksek tarama testleri ile reaktif çıkan sonuçların alternatif özgül bir test ile doğrulanması gerekmektedir. Plazmada HIV-1 RNA düzeyi hastalığın düzeyi ile ilişkili olup semptomatik ya da AIDS aşamasındaki hastalarda, asemptomatik hastalara göre daha yüksek viral yük izlenmektedir. Antiretroviral tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi açısından da önemli olan viral yük ölçümü, günümüzde, özellikle gelişmiş ülkelerde hastaların tedavilerinin izlenmesinde rutin olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, hastalık evresinin belirlenmesinde, antiretroviral tedavi ve fırsatçı enfeksiyon profilaksi uygulamalarının başlamasında ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde viral yük takibini tamamlayıcı parametre olarak CD4 (+) T hücre sayımı gereklidir.

İmmün sistem tarafından kontrol altına alınamayan HIV gibi kronik viral enfeksiyon durumlarında, sürekli viral antijen uyarısı, "T hücre tükenmesi" olarak adlandırılan, T hücre proliferasyonu ve sitokin sekresyonu gibi T hücre fonksiyonlarının ilerleyici kaybına neden olur. Bu durum efektif olmayan immün

yanıtlara ve viral temizlenmede defektlere yol açmaktadır. Hayvan modellerinde ve insanlarda yapılan çalışmalarda, kronik antijen maruziyeti durumlarında, aktif ve potansiyel olarak geri dönebilen T hücre bozulmalarına neden olan inhibitör yolakların upregülasyonu yoluyla immun fonksiyonların baskılandığı gösterilmiştir. T hücre tükenmesinde majör bir faktör olarak, bu immun düzenleyici moleküllerden PD-1'in rolünü vurgulayan ilk raporlardan bu yana HIV enfeksiyonunda T hücre disfonksiyonunu şekillendiren moleküler olayların kompleks ağının anlaşılmasında önemli ilerlemeler olmuştur (5).

HIV enfeksiyonu gibi viral enfeksiyonların kontrolünde virüs spesifik CD8 (+) T hücreleri önemli bir rol oynar. Fakat kronik HIV enfeksiyonu süresince virüs spesifik CD8 (+) T hücreleri fonksiyonel olarak tükenir, efektör fonksiyonlarını kaybeder ve viral enfeksiyonun kontrolünde yetersiz hale gelirler (6).

HIV spesifik CD8 (+) hücrelerdeki PD-1 ekspresyonu HIV viral yükü ile koreledir. PD-1'in, HIV enfeksiyonunun azalmış immun yanıt özelliğine katkıda bulunarak, sitotoksik T lenfosit fonksiyonunu zayıflattığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, geleneksel tedavi yoluyla viral yükün kontrol altına alınması PD-1 ekspresyonunda bir azalmaya neden olur (7).

CD4 (+) ve CD8 (+) T hücrelerindeki yüksek düzeyde PD-1 ekspresyonunun, ART ile başarılı viral kontrol sonrasında immünitinin yeniden yapılanmasındaki yetersizlikle de ilişkili olduğu gösterilmiştir (8).

Monosit, lökosit ve endotelial hücreler tarafından üretilen IP-10 proinflamatuvar bir kemokindir. Interferon (IFN) gama ve Tümör nekroz faktörü (TNF)'ye yanıt olarak üretilir ve IFN-gama sinyal yolağı ile ilişkilidir. CXCR3 sinyal ailesinin üyesi olan IP-10'un (CXCL10), diğer aile üyeleri CXCL9 ve CXCL11 ile birlikte asıl fonksiyonları immün hücreleri inflamatuvar bölgelerde toplamaktır. Bununla birlikte, persistan IP-10 maruziyetinin T hücre çoğalmasında ve CD4 ve CD8 T hücrelerinde azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Aynı zamanda yüksek IP10 seviyeleri HIV plazma viral yükü ile koreledir ve hızlı hastalık progresyonunun göstergesidir. ART başlamadan önceki erken HIV-1 enfeksiyonunda belirteç olabilir. Yüksek IP-10 düzeylerinin insan T hücre fonksiyonlarını baskılamasının

enfekte olgularda ART'ye yanıtında etkisi olabileceği bildirilmiştir (9). Araştırmacılar, Fiebig stage III, IV ve V (HIV'in akut dönemini kapsamaktadır) süresince IP-10'un yüksek düzeylerinin enfeksiyonun başlangıcından sonraki 2 yıl düşük CD4 hücre sayısı ile güçlü bir ilişkisi olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum IP-10'un hastalık progresyonunda akut dönemde kullanışlı bir belirteç olabileceğini desteklemektedir. Primer HIV-1 enfeksiyonlu hastaların tamamına yakınında, tedaviye ara vermiş olanlar, kronik tedavi almamış HIV-1 enfeksiyonlular ve kronik tedavi edilmiş HIV enfeksiyonlu bireylerde plazma IP-10 düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (10).

CD4 T hücrelerinin alt gruplarından biri olan Th17 özellikle gastrointestinal kanalda yoğun olarak bulunur ve hücre dışı bakteri ve mantarlara karşı kazanılmış bağışıklıkta önemli rolü olan IL-17'yi üretir. HIV(+) hastalarda özellikle tedavisiz dönemde Th17 hücrelerin ve bu hücrelerin efektör sitokini olan IL-17'nin kaybı söz konusuysen uzun süreli ART'nin daha iyi hastalık prognozu ile ilişkili olabilecek Th17 hücrelerinin restorasyonuna neden olabildiği gösterilmiştir (11).

HIV enfeksiyonu, hastalığın progresyonunun bağımsız bir belirleyicisi olan sistemik immün aktivasyonuna katkıda bulunan bağırsak geçirgenliği ve mikrobiyal translokasyon ile ilişkilidir. Bu mikrobiyal translokasyon sonucu ortaya çıkan endotoksin tehdidinin, CD14 ekspresyonunu arttırdığı ve monositler tarafından sCD14 salgılanmasını uyardığı gösterilmiştir. Endotoksin ve lipopolisakkaritlere bir monosit tepkisi olarak üretilen sCD14'ün, HIV enfeksiyonunda bağımsız bir mortalite belirleyicisi olduğu ve doğal immün aktivasyonunun terapötik olarak sağlanmasıyla HIV enfeksiyonu olan hastalarda sağkalımın iyileştirebileceği düşünülmektedir (12).

Bu çalışmada, yeni tanı almış naif hastalarda tedavi öncesi ve tedavinin ilerleyen dönemlerinde hastalığın progresyonu konusunda erken dönemde fikir verebilen, CD4 (+) ve CD8 (+) T hücrelerinden eksprese edilen PD-1, bir kemokin olan IP-10, bir sitokin olan IL-17 ve CD-14 moleküler belirteçlerinin yeni tanı almış HIV (+) hastalarda çalışma dönemi boyunca belirlenen aralıklarla (0-1-3. aylar) izlenerek takipte kullanılan diğer parametreler (CD4 (+) T hücre oranı, viral yük

gibi) ve birbirleri ile korelasyonlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi, hastalarda zaman içerisindeki değişimlerinin karşılaştırılması, hastalığın kliniği ve prognozu konusundaki önemlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu projedeki ana hedefler;

CD4 (+) ve CD8 (+) T hücrelerinden eksprese edilen ve uygun tedavi ile düzeyleri değişen PD-1 ve serumda bulunan bir kemokin olan IP-10 moleküllerinin takibi ile hastalığın klinik gidişi ve prognozu konusunda erken dönemde fikir edinilmesi, moleküler belirteçlerin etkinliğinin gösterilmesi durumunda daha etkin ve/veya daha yaygın hasta takibinin sağlanması ve bunun pratik uygulamalara yansıtılarak daha etkin tedavi uygulamaları konusunda yeni fikirler oluşturulması olarak belirlenmiştir.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Çalışmaya Sakarya Üniversitesi Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniğine başvuran, HIV enfeksiyonu tanısı almış, çalışma kriterlerine uygun ve Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu (BGOF) okuyup imzalayan takip ve tedavisine yeni başlanacak olan 50 hasta dahil edilmiştir.

#### **Gönüllülerin araştırmaya dahil edilme kriterleri:**

1. HIV enfeksiyonu şüphesi olan ve yapılan testler sonucunda HIV enfeksiyonu tanısı konan, takip ve tedavisine yeni başlanacak olan hastalar,
2. HIV/AIDS dışında başka bir kronik hastalığı olmayanlar,
3. 18 yaş ve üzeri erişkin hastalar,
4. Çalışma için onam veren hastalar.

#### **Gönüllülerin araştırmaya dahil edilmeme kriterleri:**

1. HIV varlığı doğrulanamayan şüpheli bireyler,
2. HIV/AIDS haricinde kronik hastalığı bulunan kişiler,
3. 18 yaş altı pediatrik hastalar,
4. Hamileler
5. Çalışma için onam vermeyenler.

### 2.2. Etik Kurul Onayı

Bu tez çalışmasına, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Etik Kurul Başkanlığı'nın 16214662/050.01.04/26 sayılı kararı ile "Etik Kurul Onayı" aldıktan sonra başlanmıştır. Çalışma Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

### 2.3. Örneklerin Hazırlanması ve Analizi

Klinik şüphesi olan ve tekrarlayan ELISA testi pozitifliği olan hastalara ait örnekler Sağlık Bakanlığı tarafından belirlenen ve kurumun bağlı olduğu birime gönderilerek HIV ½ antikor ayırt edici hızlı test ile doğrulanmış ve HIV enfeksiyonu tanısı kesinleştirilmiştir. Doğrulama test sonucu negatif olan ya da tanısı kesinleştirilemeyen hastalar çalışma dışı bırakılmıştır. Tanısı kesinleşen

hastaların ilk kontrollerinde (0. ay) akım sitometri çalışmaları ve nükleik asit testleri (NAT) için 2 adet EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) içeren tüplere alınan kan örnekleri, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiştir. Laboratuvara kabulü yapılan numunelerden, akım sitometri çalışmaları tam kandan bekletilmeden yapılırken; NAT için uygun devir ve sürede santrifüj edilen kan örneğinin plazma kısmı ayrılarak çalışılmıştır. NAT'nin hemen çalışılmasının mümkün olmadığı durumlarda plazma örnekleri, çalışılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

### **2.3.1. CD4 (+) ve CD8 (+) T Hücrelerinde PD-1 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi:**

CD4 (+) ve CD8 (+) T hücrelerinden eksprese edilen ve uygun tedavi ile düzeyleri değişen, hastalığın kliniği ve prognozunu ön görmek açısından yardımcı olabilecek bir belirteç olan PD-1, naif hastalarda tedavi öncesi ve tedaviye başlanması sonrası 1 ve 3. aylarda olacak şekilde; diğer parametrelerle (CD4 (+) T hücre oranı ve HIV RNA düzeyi) birlikte izlenmiştir. Kan örneği üreticinin talimatlarına uygun olarak, öncelikle CD3, CD4, CD8 ve PD-1'e karşı monoklonal antikorlar ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Yıkama ve fiksasyon işlemleri sonrasında akım sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Protokol Tablo 1'deki gibidir.

**Tablo 1:** Akım Sitometrisinde Yüzeysel Antikor boyaması

1	Numaralandırılmış tüplere antikorlar FITC/ PE/ ECD/ PC5/ PC7 10 ul olacak şekilde sırasıyla pipetlenir.
2	Üzerlerine 100 ul hücre süspansiyonu pipetlenir ve vortekslenir.
3	15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
4	Tüplere 500 ul Optolyse C eklenir.
5	10 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
6	Tüplere 500 ul PBS eklenir.
7	10 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
8	300 x rcf de 5 dakika santrifüj edilir.

9	Tüpler yavaşça dökülerek süzülür, ağız kısmı kurulanır.
10	Üzerine 2 ml PBS eklenir ve vortekslenir.
11	300 x rcf de 5 dakika santrifüj edilir.
12	Süpernatant atılır.
13	Tüplere 500 ul PBS/Formaldehit konarak +4 derecede okumaya kadar saklanır.

### 2.3.2. Serum IP-10, IL-17 ve sCD-14 düzeylerinin belirlenmesi

IP-10, IL-17 ve sCD-14 düzeyleri, naif hastalarda tedavi öncesinde ve tedaviye başlama sonrası 3 ve 6. aylarda olacak şekilde, serum örneklerinde, ticari bir kit kullanılarak ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir.

### 2.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS programı ile analiz edilerek IP-10, PD-1, IL-17 ve sCD-14'ün takipte kullanılan diğer parametreler (CD4 (+) T hücre oranı, HIV RNA düzeyi) ile ilişkisi korelasyon katsayısı belirlenerek yorumlanacak ve klinik izlemdeki yararları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### 3. ANALİZ ve BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş aralıkları 20-70 arasında olup ortalaması 35 yıl olarak hesaplanmıştır. Cinsiyet dağılımı 7 kadın (%23.3), 23 erkek (%76.7) şeklindedir.

Tedavi öncesi ve sonrası grupta; CD4 T oranının artışı ( $p=0.0009$ ), CD8 T oranının azalışı ( $p=0.003$ ), viral yükün azalışı ( $p<0.00001$ ) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Wilcoxon Signed-Rank Test).

Spearman korelasyon testi ile yapılan 90 adet yapılan ölçüm sonucunda;

CD4T hücrelerinden eksprese edilen PD-1 oranı ile viral yük değerleri arasında pozitif yönlü, orta düzeyde korelasyon ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ( $n=80$ ,  $r_s = 0.49614$ ,  $p<0.001$ ) bulunmuştur.

CD8T hücrelerinden eksprese edilen PD-1 oranı ile viral yük değerleri arasında pozitif yönlü, orta düzeyde korelasyon ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ( $n=80$ ,  $r_s = 0.50954$ ,  $p<0.001$ ) bulunmuştur.

CD4 T ve CD8 T hücrelerinden eksprese edilen PD-1 molekülünün oranı ve viral yükün tedavinin 0., 1. ve 3. aylarındaki değişimi Tablo 2'de sunulmuştur.

Hastaların tedavi almadığı dönemdeki IP-10, sCD-14 ve IL-17 düzeylerinin viral yük ile korele olduğu tespit edilmiştir.

Hastaların takiplerinde de viral yük ile IP 10, sCD-14 ve IL-17 seviyelerinin genel olarak uyumlu değişim gösterdiği gözlenmiştir.

**Tablo 2:** PD1 düzeyi ve viral yüklerin tedavi ile değişimi

Hasta	Tedavi Öncesi			Tedavi Sonrası 1. ay			Tedavi Sonrası 3. ay		
	PD1/CD4 (%)	PD1/CD8 (%)	Viral yük (kopya/ml)	PD1/CD4 (%)	PD1/CD8 (%)	Viral yük (kopya/ml)	PD1/CD4 (%)	PD1/CD8 (%)	Viral yük (kopya/ml)
#1	98.59	98.97	3140000	99.30	88.87	8370	99.79	95.04	169
#2	94.81	98.10	10000000	88.44	78.49	240	70.94	64.21	0
#3	94.48	97.41	33600	40.46	58.90	139	28.36	41.52	0
#4	61.29	57.63	17500	22.57	41.43	60	25.11	16.15	0
#5	52.68	39.28	194000	45.62	37.97	476	34.02	19.12	0
#6	60.89	99.23	10000000	56.55	98.70	226	37.84	40.83	0
#7	99.52	79.22	295000	39.00	69.84	595	17.53	21.28	0
#8	47.74	56.72	81900	34.19	35.09	275	23.78	28.35	0
#9	89.65	99.12	79300	49.21	97.53	891	30.46	88.11	340
#10	96.81	95.35	431000	45.58	91.53	40	33.88	67.64	0
#11	50.99	46.32	119000	60.27	51.16	64	54.02	52.57	65
#12	64.64	91.20	32100	29.27	75.95	60	24.81	37.34	0
#13	94.29	99.05	163000	95.24	94.32	164	63.21	57.23	0
#14	97.17	99.60	74900	48.54	93.79	66	44.27	64.05	0
#15	94.81	97.78	14700	30.82	36.13	50	22.60	26.82	0
#16	39.39	93.80	442000	67.36	98.75	5580	58.45	75.55	209
#17	57.93	97.46	115000	46.04	87.98	569	37.92	72.78	0
#18	99.80	95.58	715000	83.83	96.00	5580	34.65	35.84	0
#19	95.94	98.36	27500	50.01	77.82	40	38.67	54.47	0
#20	92.38	46.04	157000	71.26	52.11	4690	61.77	52.22	110
#21	90.77	98.64	37400	40.30	47.15	72	35.60	40.54	0
#22	80.66	98.26	57500	72.82	94.23	151	44.52	80.12	0
#23	33.87	77.84	376000	19.35	98.16	506	20.50	96.88	98
#24	31.70	62.41	14000	35.65	61.34	418	15.16	32.98	0
#25	51.12	62.82	1420000	26.27	35.41	1350	20.48	24.56	0
#26	49.50	71.60	684000	33.05	55.94	4640	24.18	36.44	0
#27	30.29	62.45	140000	27.65	49.62	40	22.24	36.55	0
#28	90.69	89.19	357000	77.90	67.21	148	55.18	40.44	0
#29	33.30	58.00	380000	17.96	28.49	410	13.44	20.56	0
#30	80.06	91.22	710000	61.53	74.80	610	44.34	60.12	0

#### 4. TARTIŞMA

PD-1 ve ligandları, akut ve kronik enfeksiyonlara neden olan mikroplara karşı bağışıklık savunmalarını düzenlemede önemli rollere sahiptir. PD-1: PD-L yolağı, etkili antimikrobiyal bağışıklık savunmaları ile immün - aracılı doku hasarı arasındaki hassas dengeyi düzenleyen önemli bir belirleyici gibi görünmektedir. PD-1, T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü T hücreleri, aktive edilmiş monositler ve dendritik hücreler (DC'ler) üzerinde eksprese edilebilir (Şekil 1). PD-1, dinlenme halindeki T hücrelerinde eksprese edilmez, ancak aktivasyondan sonra indüklenebilir şekilde eksprese edilir (13). PD1 hücre yüzeyi protein ekspresyonu stimülasyondan sonraki 24 saat içinde saptanabilse de, PD-1 ligasyonunun fonksiyonel etkileri T hücresi aktivasyonunu takip eden birkaç saat içinde gözlenir (14).

PD-1, toleransı indükleyen ve iki ligand PD-L1 ve PD-L2 ile birlikte enfeksiyona karşı antijene spesifik bağışıklık tepkilerini modüle eden bir bağışıklık kontrol noktası molekülüdür (15). PD-1'in T hücreleri üzerinde yukarı regülasyonu, HIV hastalığının ilerlemesi ile ilişkilidir ve anti PD-1, virüse karşı T hücresi efektör yanıtlarının geri yüklenmesini sağlar. Simian Immunodeficiency Virus (SIV) modelinde, ART içeren anti-PD-1 antiviral T hücresi yanıtlarını arttırdığı ve CD4 + T hücresi viral rezervuarını azalttığı gösterilmiştir. İn vivo olarak, anti-PD-1'e maruz kalmanın, son zamanlarda enfekte olmuş hücrelerin sayısını azalttığı ve başka bir HIV + bireyde, anti-PD-1 terapisinin HIV latent kalışı üstüne olumlu etkileri olduğu raporlanmıştır (17).

HIV hayvan modellerinde PD-1 reseptör blokajının, antijene spesifik bağışıklığı arttırdığı, bağışıklık aktivasyonunu azalttığı ve plazma viremisini azalttığı gösterilmiştir (18). Etkili ART kullanan bireylerde PD-1 ligandının (PDL1) blokajını değerlendiren bir klinik çalışmada, altı katılımcıdan ikisinin HIV'e özgü bağışıklık yanıtlarının arttığı bildirilmiştir (19). Kandaki CD4 T hücreleri üzerinde PD-1 ekspresyonunun olması, HIV provirüsü taşıma olasılığı daha yüksek olan hücreleri de işaret eder (20). Spesifik olarak, yüksek PD-1 ekspresyonu olan ve diğer inhibitör reseptörlerini birlikte eksprese eden CD4 T

hücreleri proviral DNA için zenginleştirilmiştir (21,22) ve HIV enfeksiyonuna daha fazla izin verir (23,24). Bu bulgular PD1 ifade eden CD4 T hücrelerinin HIV rezervuarına katkıda bulunduğunu ve bu hücreleri hedeflemenin HIV ile enfekte olmuş hücreleri azaltmak için önemli bir strateji olabileceğini düşündürmektedir.

T hücreleri üzerindeki PD-1 ekspresyonu, tükenmiş bir T hücresi fenotipini tanımlamak için kullanılmış olmasına rağmen, kronik hastalık ve kanser gibi durumlarda T hücreleri antijen aktivasyonu sırasında hızlı bir şekilde PD-1 eksprese eder, antijenler sonra ekspresyon seviyeleri azalır (25).

Kronik viral enfeksiyonlarda PD-1 ekspresyonu ile ilgili bulgular göz önüne alındığında (26,27), HIV'in latent kalması ile, plazma viremisinin stabil baskılanmasından sonra bile, PD-1 ekspresyonuyla T hücrelerin pozitif korelasyon göstereceği düşünülmektedir. Hem HIV hem de insan olmayan primat (non human primat- NHP) HIV enfeksiyonu modellerinde PD-1 eksprese eden T hücrelerini ilişkisi çalışılmıştır (28-31). NHP modelinde, PD1 eksprese eden CD4 T hücreleri kontrolsüz SIV enfeksiyonunda rektal mukozada anlamlı olarak artar. PD-1 CD4 T hücreleri, bir antiapoptotik protein olan Bcl-2 seviyelerinin daha yüksek ekspresyonunu sağlayarak hücrelerin hayatta kalma potansiyelini ve Ki-67 ekspresyonunu sağlayarak hücre proliferasyonu artırır. Bu nedenle, artan proliferasyon viral kalıcılığa katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (30).

HIV hastasının takibinde CD4 ve viral yük değerleri tüm kılavuzlarda yer alan çok önemli belirteçlerdir. Bu oturmuş testlerin yanı sıra PD-1 gibi HIV immunopatogenezinde rolleri olduğu gösterilen bazı biyobelirteçlerin de tedavi ile değişimlerini gösteren çalışmaların yapılması ile ileride maliyeti yüksek moleküler yöntemlere alternatifler geliştirilebilecektir. Literatürde PD-1'in tedavi altında CD4T üzerinde ifadenmesi konusundaki ilk çalışmalarda birbiri ile çelişen sonuçlar bulunmakla birlikte son çalışmalar net bir şekilde PD-1 molekül ekspresyonununun tedavi ile azaldığını ve hatta PD-1 molekülünü bloke eden antikörlerin tedavi edici ajanlar olarak HIV hastalarının tedavisinde kullanılabileceğini ortaya koymuştur (32,33). Macatangay ve ark. (34) 99 yeni tanı almış HIV hastası ile yaptığı çalışmasında; ART öncesi PD-1+ CD4 T

hücreleri viremi ile pozitif, CD4 T hücre sayımı ile negatif korelasyon gösterdiğini ve ART altındaki 1. yılın sonunda PD-1+ CD4 T hücrelerin oranının azaldığını, ancak 4 ve 6-15 yılda stabil kaldığını bildirmiştir.

Uzun süreli ART'ın PD-1 ifade eden T hücreleri üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar az sayıdadır ve net bir şekilde karakterize edilmemiştir. Bu nedenle, PD-1 ekspresyonu ile CD4 ve CD8 T hücrelerinin frekanslarındaki ART ile ilgili değişiklikleri değerlendirmek ve sıklıklarının kalıcılık ve HIV-spesifik yanıtlar ile ilişkisini olduğunu belirlemek için Sakarya Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları polikliniğine başvuran hastalardan seri örnekler alınarak incelenmiştir. Bizim çalışmamızda da PD-1 ekspresyon düzeyinin ART ile anlamlı şekilde azaldığı ve viral yük ile orta düzeyde korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

Gray ve arkadaşlarının (35) çalışmalarında, HIV enfeksiyonu olan hastalar ile sağlıklı gönüllüler arasında IP-10 değerleri açısından anlamlı fark olduğu bildirilmiştir. HIV hastaları ve kontrol grubunun IP-10 değerlerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise IP-10 değerinin hastalarda anlamlı düzeyde yüksek buldukları belirtilmiştir. Ramirez ve arkadaşlarının (36) çalışmasında da HIV-1 ile enfekte ve tedavi alan kişilerde enfekte olmayanlara göre IP-10 düzeyi yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, tedavi almakta olan hastaların sıfıncı ayda alınan kan örneklerine ait IP-10 değerleri ortalamasının, tedavi naif hastaların ilk kan örneklerine ait IP-10 değerleri ortalamasından daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu durum antiretroviral tedavinin viral yükü düşürmesine ve dalayısıyla azalmış inflamasyona bağlanmıştır. Gray ve arkadaşlarının çalışmasında da benzer şekilde, tedavi almakta olan hastaların IP-10 değerlerinin kontrol grubu IP-10 değerlerine göre anlamlı düzeyde yüksek bulunması inflamatuvar sinyallerin tamamen ortadan kaldırılamadığının bir göstergesi olarak yorumlanmıştır (35).

HIV ile ilişkili bağışıklık aktivasyonunun nedenleri belirsizdir, ancak HIV'e özgü T hücrelerinin genişlemesi, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin HIV kodlu Toll benzeri reseptör (TLR) ligandlarına reaktivitesi, bağışıklık düzenleyici hücrelerin

kaybı, artan prevalans ve diğer bazı kronik hastalıkların süreçte yer alması da dahil olmak üzere çok faktörlüdür. CD41 T hücrelerinin bağırsaklar yoluyla hızlı tükenmesi (37,38), azalmış lüminal immünoglobulin (Ig) A konsantrasyonu (39), masif enterosit apoptozu ve enterosit sıkı bağlantılarının bozulması (40,41) zayıf bağırsak mukozası bariyeri ile sonuçlanır. Lipopolisakkarit (LPS) ve 16S ribozomal DNA (16S rDNA) gibi mikrobiyal ürünlerin daha sonraki translokasyonu, bağışıklık aktivasyonuna katkıda bulunur. Gram negatif bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan LPS çözünür CD14'ü (sCD14) ve miyeloid farklılaşma-2 (MD-2) -TLR4 kompleksini bağlayarak NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF ve tip I interferon üretimi ile sonuçlanır (42-44).

Sandler ve arkadaşlarının çalışmasında (45); yüksek sCD14 seviyelerinin mortalite riskinde artış ile ilişkili olduğu, başlangıç CD41 T hücre sayısı ve HIV RNA seviyesi ve inflamasyon belirteçleri için ayarlamadan sonra sCD14 seviyesinin mortalite ile ilişkisi devam ettiği ve sCD14 seviyelerinin, IL-6, hsCRP, SAA ve D-dimer seviyeleri ile körele olduğu saptanmıştır. Toplu olarak, bu gözlemler HIV enfeksiyonunun bağırsak mukozasında sürekli hasara neden olduğu ve artan mikrobik translokasyona, artmış sistemik inflamasyona ve mortalitenin artmasına neden olan bir modelle tutarlı olduğu belirtilmiştir. Yine bu çalışmada en yüksek monosit aktivasyonunu yansıtan en yüksek sCD14 düzeyine sahip olan kişilerin en düşük sCD14 düzeyine sahip olanlardan 6 kat daha yüksek ölüm oranına sahip olduğu ifade edilmiştir. Çalışmamızda tedavi öncesi ölçülen sCD-14 düzeylerinin tedavi ile olan anlamlı düşüşü literatürle uyumlu olarak saptanmıştır.

IL-2, IL-7 ve IL-10, HIV patogeneğinde en çok çalışılan sitokinler arasındadır. Özellikle HIV ile enfekte kişilerde IL-2 üretiminin aksaması 1980'lerin başında tanımlanmıştır ve AIDS araştırmalarının ilk on yılında karakterize edilmiştir (46-48). Hücre aracılı bağışıklığı baskılama yeteneğine sahip güçlü bir anti-inflamatuar sitokin olan IL-10 üretiminin artmasının, tedavi edilmemiş HIV enfeksiyonunda görülen hücresel bağışıklığın ilerleyen değişikliklerinden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. IL-17, insan CD4 + (Th17) hücrelerinin ayrı bir alt kümesi tarafından üretilen benzersiz proinflamatuar bir sitokindir (49). Son

çalışmalar (50,51), birkaç otoimmün bozuklukta ve konakçı savunmasında doku iltihabının bir aracısı olarak IL-17'nin etkisini vurgulamaktadır. IL-17'nin kandida veya mikobakteriyel enfeksiyonlarda doğrudan rolü olabileceği ve Th17 hücrelerinin kaybı potansiyel olarak fırsatçı enfeksiyonlara karşı savunmasızlığa neden olabileceği ifade edilmiştir (52). Timopoezi uyarma ve timositlerin ve olgun T hücrelerinin gelişmesinin hayatta kalma yeteneğini artırması nedeniyle, IL-7, CD4'te aşamalı bir düşüş ile karakterize edilen bir hastalık olan HIV enfeksiyonunda son derece önemli bir rol oynamaktadır (53).

Lishomwa ve arkadaşları (52) plazma viremişi 50 kopya / ml'nin altında olan HIV-1 ile enfekte olmuş çocukların, saptanabilir viremişi olanların aksine saptanabilir IL-17 üretimine sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular HIV-1 viral replikasyonunun Th17 hücrenin korunmasına yönelik bir strateji olarak 50 kopya / ml'nin altına tamamen bastırılmasını savunmaktadır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde ART tedavisi alan hasta grubunda IL-17 üretiminin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda PD-1 ekspresyon düzeyinin ART ile anlamlı şekilde azaldığı ve viral yük ile orta düzeyde korelasyon gösterdiği saptanmıştır.

HIV ile IP-10 arasında geçici bir biyolojik ilişki olup olmadığı net değildir ancak; IP-10'un konakçı lökositlerinde, viral replikasyonun ve TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$ 'nın aktivasyonunun direkt etkisi ile salındığı düşünülmektedir.

IP-10, IL-17 ve sCD-14 ile viral yük arasında korelasyon olması, bu moleküllerin viral yükün bir belirteci olabilme potansiyelini akla getirmiştir ve viremideki değişiklikleri izlemek ve özellikle kaynak kısıtlı bölgelerde, daha pahalı viral yük ölçümlerine bir alternatif olabilmesi açısından geniş hasta gruplarıyla çalışılmasının faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

Bu doğrudan bağlantı sonucunda, plazma IP-10, IL-17 ve sCD-14 konsantrasyonları, viral yük için doğru bir gösterge olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Bu, moleküllerin adaptasyonu viral yük ölçümleri için bölgesel veya üçüncül merkezlere örnek gönderme ihtiyacını azaltabilecektir.

Özetle; PD-1'in viral yükün bir belirteci olabileceği; viremi ve tedavi yanıtındaki değişiklikleri izlemek için yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

PD-1 T hücreleri ART baskısına rağmen uzun süre kanda kalır, HIV RNA seviyeleri ile ilişkilidir. Bu bulgular PD-1 blokajının HIV persistansının önüne geçebileceği yönündeki literatür bilgileriyle de uyum göstermektedir. HIV DNA ile PD-1 ekspresyon düzeylerinin de uzun dönemde kıyaslanmasının, HIV kürüne gidebilecek yolda önemli bir adım olabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Erensoy S. 2012. "Retroviruslar ve HIV". Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji. Editörler: Us, D, Ergünay, K. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.
2. Tümer A, Ünal S. 2014. "HIV/AIDS epidemiyolojisi ve korunma". Güncel Bilgiler Işığında HIV/AIDS. Editörler: Ünal, S, Tümer, A. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.
3. Biçeroğlu SU, Altuglu İ, Zeka AN, Gökengin D, Yazan Sertöz R. 2014. "Ege Bölgesi'nde İzole Edilen HIV-1 İzolatlarının Altıtip Dağılımının pol Gen Bölgesi Filogenetik Analizi ve Otomatize Araçlar Kullanılarak Belirlenmesi", Mikrobiyol Bul, 48(3), 420-428.
4. Dokuzoğuz B. 2014. "HIV enfeksiyonunun doğal seyri ve seropozitif olguların takibi". Güncel Bilgiler Işığında HIV/AIDS. Editörler: Ünal, S, Tümer, A. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.
5. Porichis F, Kaufmann DE. 2012. "Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy". Curr HIV/AIDS Rep, 9(1), 81-90.
6. Velu V, Shetty RD, Larsson M, Shankar EM. 2015. "Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options". Retrovirology, 8, 12:14. doi: 10.1186/s12977-015-0144-x.
7. Griffin J, Moulton M, Elmezayen R, Moorman J. 2014. "Negative immunomodulators-blunting immunostimulation and facilitating infection". Intech, 105-120.
8. Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P, Rieger A, Leitner J, Kohrgruber N. 2011. "Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment". J Acquir Immune Defic Syndr, 56(2), 118-124.
9. Ramirez LA, Arango TA, Thompson E, Naji M, Tebas P, Boyer JD. 2014. "High IP-10 levels decrease T cell function in HIV-1-infected individuals on ART". J Leukoc Biol, 96(6), 1055-1063.
10. Simmons RP, Scully EP, Groden EE, Arnold KB, Chang JJ, Lane K, Lifson J, Rosenberg E, Lauffenburger DA, Altfeld M. 2013. "HIV-1 infection induces strong production of IP-10 through TLR7/9-dependent pathways". AIDS, 27(16): 2505-2517.
11. Klatt NR, Brenchley JM. Th17 cell dynamics in HIV infection. Curr. Opin. HIV AIDS, 5 (2010), 135-140

12. Sandler NG, Wand H, Roque A, et al., the INSIGHT SMART Study Group. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis*, 203 (2011), 780-790.
13. Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, Sato M, Imamura S, et al. 1996. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) thymocytes. *Int. Immunol.* 8:773–80
14. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.* 173:945–54
15. Khoja L, Butler MO, Kang SP, Ebbinghaus S, Joshua AM. 2015. Pembrolizumab. *J Immunother Cancer* 3:36.
16. Mylvaganam GH, Chea LS, Tharp GK, Hicks S, Velu V, Iyer SS, Deleage C, Estes JD, Bosinger SE, Freeman GJ, Ahmed R, Amara RR. 2018. Combination anti-PD-1 and antiretroviral therapy provides therapeutic benefit against SIV. *JCI Insight* 3.
17. Evans VA, van der Sluis RM, Solomon A, Dantanarayana A, McNeil C, Garsia R, Palmer S, Fromentin R, Chomont N, Sekaly RP, Cameron PU, Lewin SR. 2018. Programmed cell death-1 contributes to the establishment and maintenance of HIV-1 latency. *Aids* 32:1491-1497.
18. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, Vanderford TH, Chennareddi L, Silvestri G, Freeman GJ, Ahmed R, Amara RR. 2009. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* 458:206-10.
19. Gay CL, Bosch RJ, Ritz J, Hataye JM, Aga E, Tressler RL, et al., AIDS Clinical Trials 5326 Study Team. Clinical trial of the antiPD-L1 antibody BMS-936559 in HIV-1 infected participants on suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2017; 215:1725–1733.
20. Hatano H, Jain V, Hunt PW, Lee TH, Sinclair E, Do TD, et al. Cell-based measures of viral persistence are associated with immune activation and programmed cell death protein 1 (PD1)-expressing CD4<sup>+</sup> T cells. *J Infect Dis* 2013; 208:50–56.

21. DaFonseca S, Chomont N, El Far M, Boulassel R, Routy J, Sekaly R. Purging the HIV-1 reservoir through the disruption of the PD-1 pathway. *J Int AIDS Soc* 2010; 13 (Suppl 3):O15.
22. Fromentin R, Bakeman W, Lawani MB, Khoury G, Hartogensis W, DaFonseca S, et al. CD4<sup>+</sup> T cells expressing PD-1, TIGIT and LAG contribute to HIV persistence during ART. *PLoS Pathog* 2016; 12:e1005761.
23. Pallikkuth S, Sharkey M, Babic DZ, Gupta S, Stone GW, Fischl MA, et al. Peripheral T follicular helper cells are the major HIV reservoir within central memory CD4 T cells in peripheral blood from chronically hiv-infected individuals on combination antiretroviral therapy. *J Virol* 2015; 90:2718–2728.
24. Paris RM, Petrovas C, Ferrando-Martinez S, Moysi E, Boswell KL, Archer E, et al. Selective loss of early differentiated, highly functional PD1<sup>high</sup> CD4 T cells with HIV progression. *PLoSOne* 2015; 10:e0144767.
25. Ahn E, Araki K, Hashimoto M, Li W, Riley JL, Cheung J, et al. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115:4749–4754.
26. Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* 2015; 479-480:180–193.
27. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer. *Annu Rev Immunol* 2019; 37:457–495.
28. Kansy BA, Concha-Benavente F, Srivastava RM, Jie HB, Shayan G, Lei Y, et al. PD-1 status in CD8(R) T cells associates with survival and anti-PD-1 therapeutic outcomes in head and neck cancer. *Cancer Res* 2017; 77:6353–6364.
29. Thommen D, Uhlenbrock F, Herzig P, Savic Prince S, Moersig W, Lardinois D, Zippelius A. 66P: highly exhausted PD-1<sup>hi</sup> T cell subsets in human NSCLC are co-defined by the predominant expression of distinct inhibitory receptors and correlate with clinical outcome. *Thorac Oncol*

- 2016; 11 (4 Suppl):S83.
30. Mylvaganam GH, Velu V, Hong JJ, Sadagopal S, Kwa S, Basu R, et al. Diminished viral control during simian immunodeficiency virus infection is associated with aberrant PD-1hi CD4 T cell enrichment in the lymphoid follicles of the rectal mucosa. *J Immunol* 2014; 193:4527–4536.
  31. Petrovas C, Yamamoto T, Price DA, Rao SS, Klatt NR, Brenchley JM, et al. High production rates sustain in vivo levels of PD1high simian immunodeficiency virus-specific CD8 T cells in the face of rapid clearance. *J Virol* 2013; 87:9836–9844.
  32. Yang J, Riella LV, Chock S, Liu T, Zhao X, Yuan X, Paterson AM, Watanabe T, Vanguri V, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Freeman GJ, Rodig SJ, Sharpe AH, Chandraker A, Sayegh MH. 2011. The novel costimulatory programmed death ligand 1/B7.1 pathway is functional in inhibiting alloimmune responses in vivo. *J Immunol* 187:1113-9.
  33. Kaufmann DE, Walker BD. 2009. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol* 182:5891-7.
  34. Macatangay Bernard J.C, Gandhi Rajesh T, Jones Richard B et al, T cells with high PD-1 expression are associated with lower HIV-specific immune responses despite long-term antiretroviral therapy, *AIDS*. 34(1):15-24, January 1, 2020.
  35. Gray CM, Hong HA, Young K, Lewis DA, Fallows D, Manca C, Kaplan G. Plasma interferon-gamma-inducible protein 10 can be used to predict viral load in HIV-1-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2013 Jul 1;63(3):e115-6.
  36. Ramirez LA, Arango TA, Thompson E, Naji M, Tebas P, Boyer JD. High IP-10 levels decrease T cell function in HIV-1-infected individuals on ART. *J Leukoc Biol*. 2014; 96(6): 1055-63.
  37. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, et al. Gastrointestinal tract as a major site of CD41 T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 1998; 280:427–31.
  38. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, et al. CD41 T cell depletion during

- all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004; 200:749–59.
39. Scamurra RW, Nelson DB, Lin XM, et al. Mucosal plasma cell repertoire during HIV-1 infection. *J Immunol* 2002; 169:4008–16.
  40. Li Q, Estes JD, Duan L, et al. Simian immunodeficiency virus-induced intestinal cell apoptosis is the underlying mechanism of the regenerative enteropathy of early infection. *J Infect Dis* 2008; 197:420–9.
  41. Brenchley JM, Price DA, Douek DC. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 2006; 7:235–9.
  42. Gioannini TL, Weiss JP. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res* 2007; 39:249–60.
  43. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS. TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:36–46.
  44. Miyake K. Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2006; 12:195–204.
  45. Sandler NG, Wand H, Roque A, et al, and the INSIGHT SMART Study Group. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis* 2011; 203: 780–90.
  46. Lane HC, Depper JM, Greene WC, et al. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: evidence for a selective defect in soluble antigens recognition. *N Engl J Med* 1985; 313:79–84.
  47. Giorgi JV, Fahey JL, Smith DC, et al. Early effects of HIV on CD4 lymphocytes in vivo. *J Immunol* 1987; 138:3725–3730.
  48. Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, et al. Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4<sup>+</sup> T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 1988; 82:1908–1916.
  49. Kennedy J, Rossi DL, Zurawski SM, Vega F Jr, Kastelein RA, Wagner JL, et al. Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR R CD4-CD8-T cells. *J Interferon Cytokine Res.* 1996; 16:611–617.

50. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005; 6:1133–1141.
51. Lohr J, Knoechel B, Wang JJ, Villarino AV, Abbas AK. Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. *J Exp Med.* 2006; 203:2785–2791.
52. Lishomwa C, Ndhlovua, Joan M, Chapmana, Aashish R, Jhaa, Jennifer E, SnyderCappione, et al. Suppression of HIV-1 plasma viral load below detection preserves IL-17 producing T cells in HIV-1 infection. *AIDS.* 2008 May 11; 22(8): 990–992.
53. Clerici M. Beyond IL-17: new cytokines in the pathogenesis of HIV infection. *Current Opinion in HIV and AIDS* 2010;5:184–8.