

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd



**Možný benefiční efekt koinfekce GBV-C/HGV u HIV pozitivních
pacientů**

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Autorka:

Ing. Šárka Knotková

Praha 2011

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

Department of Biological and Medical Sciences



**Potential Beneficial Effect of GBV-C/HGV Co-infection in HIV
Positive Patients**

Supervisor:

Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Author:

Ing. Šárka Knotková

Prague 2011

Prohlášení: Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, dne 7. srpna 2011

Ing. Šárka Knotková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a za rady při jejím zpracování, RNDr. Jaroslavu Königovi za zajímavé téma pro bakalářskou práci a pomoc, rodině za podporu a hlídání potomků, Šimonovi a Matoušovi za trpělivost s maminkou.

OBSAH:

1. SOUHRN	7
2. ABSTRACT	8
3. SEZNAM ZKRATEK	9
4. ÚVOD	11
4.1. Zadání – cíl práce	11
5. VIRUS GBV-C/HGV	12
5.1. Historie	12
5.2. Systematika	12
5.3. Struktura viru	13
5.4. Genotypy	13
5.5. Místo replikace viru	13
5.6. GBV-C/HGV a jím způsobená onemocnění	14
5.7. Epidemiologie	14
5.8. Způsob přenosu	15
5.9. Diagnostika	15
6. VIRUS HIV	17
6.1. Systematika	17
6.2. Replikace viru	17
6.3. Způsob přenosu	18
6.4. Diagnostika	18
6.5. Epidemiologie	19
6.6. Průběh infekce	19
7. INFEKCE VIREM GBV-C/HGV U HIV POZITIVNÍCH PACIENTŮ	21
8. KOINFEKCE GBV-C/HGV, HIV A HCV	25
9. MECHANISMY PŮSOBENÍ GBV-C/HGV NA HIV INFEKCI	27
9.1. Vliv GBV-C/HGV obalového glykoproteinu E2	27
9.2. GBV-C/HGV a cytokiny	28
9.3. Vliv nestrukturních proteinů GBV-C/HGV	29
10. SOUČASNÝ VÝZKUM V ČR	31
10.1. Metodika	32
10.1.1. Laboratorní diagnostika protilátek anti-E2	32
10.1.2. Průkaz virémie GBV-C/HGV	32

10.2. Výsledky a diskuse	34
10.2.1. Prevalence GBV-C/HGV v ČR	34
10.2.2. Vliv infekce GBV-C/HGV na virémii HIV	36
10.2.3. Vliv infekce GBV-C/HGV na počty CD4+ lymfocytů	37
10.2.4. Vliv infekce GBV-C/HGV a léčby HAART	39
10.2.5. Frekvence GBV-C/HGV RNA v souvislosti s klinickými stadii HIV pozitivních pacientů	40
10.2.6. Vliv GBV-C/HGV koinfekce na délku přežívání HIV pozitivních pacientů	41
11. ZÁVĚR	42
12. SEZNAM LITERATURY	44

1. SOUHRN

Autorka: Ing. Šárka Knotková

Název: Možný benefiční efekt koinfekce GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotní laborant

Cíl práce: Cílem této práce je přiblížit problematiku koinfekce virů GBV-C/HGV a HIV a vyhodnotit potenciální benefiční vliv GBV-C/HGV pro HIV pozitivní pacienty

Metody: Srovnání výsledků z dostupné literatury a vyhodnocení výsledků výzkumu probíhajícím v České republice, kterého jsem se osobně účastnila při laboratorní diagnostice recentní i anamnestické infekce GBV-C/HGV.

Výsledky: Oproti závěrům některých studií citovaných v mé práci autoři českého výzkumu dosáhli výsledků, které pouze naznačují jistý trend poukazující na pozitivní působení přítomnosti infekce GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů, z nichž jen některé byly statisticky signifikantní a neprokazují tak přesvědčivý benefiční efekt koinfekce virů GBV-C/HGV a HIV.

Závěr: Výsledky studií jsou rozmanité, a proto nelze jednoduše říci, že existuje benefiční efekt koinfekce virů GBV-C/HGV a HIV. Tyto viry se však spolu beze sporu ovlivňují díky prokázanému inhibičnímu vlivu viru GBV-C/HGV na virus HIV *in vitro*, a proto je třeba se tomuto výzkumu i nadále věnovat.

2. ABSTRACT

Author: Ing. Šárka Knotková

Title: Potential Beneficial Effect of GBV-C/HGV Co-infection in HIV Positive Patients

B. S. Thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Field of study: Medical Laboratory Technician

The Objective of the Thesis: To expound problematics of the co-infection of GBV-C/HGV and HIV and to assess the potential beneficial influence of GBV-C/HGV upon HIV infected patients.

Methods: Comparison of results found in literature dealing with the given problematics and the evaluation of results of the research taking currently place in the Czech Republic in which the author has taken part (laboratory diagnostics).

Results: Unlike the conclusions of some of the studies quoted in my thesis the researchers in the Czech Republic reached results which only indicate a certain trend towards a beneficial impact of the GBV-C/HGV infection upon HIV infected patients; only some of these results proved to be statistically significant and do not bring forth a sufficient beneficial effect of the GBV-C/HGV and HIV co-infection.

Conclusion: The results of the studies being varied it is hardly possible to prove the occurrence of the beneficial effect of GBV-C/HGV and HIV co-infection. Yet a certain kind of a mutual influence between the discussed viruses is evident as a result of the proved inhibition of the GBV-C/HGV virus on the HIV virus *in vitro*. Further research in this direction seems to be necessary.

3. SEZNAM ZKRATEK

- AIDS ... Acquired ImmunoDeficiency Syndrom (syndrom získaného selhání imunity)
- anti-E2 ... protilátky proti obalovému glykoproteinu E2 viru GBV-C/HGV
- cART ... Combined AntiRetroviral Therapy (kombinovaná antiretrovirová terapie)
- cDNA ... copy DNA (deoxyribonukleová kyselina vzniklá reverzní transkripcí z ribonukleové kyseliny)
- DNA ... DeoxyriboNucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
- ELISA ... Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (imunoenzymová analýza)
- ESLD ... End-Stage Liver Disease
- GBV-A ... GB Virus A (GB virus typu A)
- GBV-B ... GB Virus B (GB virus typu B)
- GBV-C/HGV ... GB Virus C / Hepatitis G Virus (GB virus typu C / virus hepatitidy G)
- GBV-C/HGV RNA ... Ribonucleic Acid of GB virus C / Hepatitis G Virus (ribonukleová kyselina GB viru typu C / viru hepatitidy G)
- gp ... glykoprotein
- HAART ... Highly Active Antiretroviral Therapy (vysoce aktivní antiretrovirová terapie)
- HCV ... Hepatitis C Virus (virus hepatitidy C)
- HCV RNA ... Ribonucleic Acid of Hepatitis C Virus (ribonukleová kyselina viru hepatitidy C)
- HIV ... Human Immunodeficiency Virus (virus lidského imunodeficitu)
- HIV RNA ... Ribonucleic Acid of Human Immunodeficiency Virus (ribonukleová kyselina viru lidského imunodeficitu)
- IFN- γ ... Interferon gama
- IgG ... Immunoglobulin G
- IL ... Interleukin
- MIP-1 α , 1 β ... Macrophage Inflammatory Protein
- NS ... Non-Structural Protein (nestrukturní protein)
- PCR ... Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová infekce)
- RANTES ... Regulated On Activation, Normal T-Cell Expressed And Secreted
- RNA ... Ribonucleic Acid (ribonukleová kyselina)
- RT ... Reverse Transcription (reverzní transkripce)

RT-PCR ... Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce s předchozí reverzní transkripcí)

SDF-1 ... Stromal-Derived Factor

4. ÚVOD

Ve své práci se zaměřuji na problematiku HIV pozitivních pacientů a vlivu současné infekce virem GBV-C/HGV. Tento virus je v dnešní době považován za nepatogenní, dříve předpokládaná souvislost mezi infekcí GBV-C/HGV a vznikem hepatitidy se nepotvrdila. Zájem o virus GBV-C/HGV však tímto zjištěním neskončil, nadále se hledají souvislosti s jinými infekcemi, například s infekcí virem HIV. V různých studiích se tak začaly sledovat ukazatelé infekce GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů spolu s prognostickými markery HIV infekce, délkou přežívání HIV infikovaných osob a rozvojem onemocnění do stadia AIDS. Některé studie přinášejí v tomto ohledu slibné výsledky. Ve své práci se pokusím přiblížit výsledky různých zahraničních studií, srovnat je s výsledky výzkumu probíhajícím v České republice a vyhodnotit, zda skutečně virus GBV-C/HGV znamená pro HIV pozitivní pacienty nějaký benefit.

4.1. Zadání – cíl práce

1. shrnutí známých informací o viru GBV-C/HGV
2. shrnutí informací týkající se koinfekce viru GBV-C/HGV a viru HIV, ovlivnění prognostických markerů infekce HIV a mechanismů, kterými GBV-C/HGV na HIV působí
3. prezentace výsledků jediné studie v České republice týkající se koinfekce viru GBV-C/HGV a viru HIV
4. vyhodnocení možných benefičních vlivů GBV-C/HGV infekce u HIV pozitivních pacientů

5. VIRUS GBV-C/HGV

5.1. Historie

Historie objevení viru GBV-C/HGV vysvětluje celou zkratku, která se dnes pro tento virus běžně používá. Virus byl totiž objeven na dvou různých místech, a to zcela nezávisle na sobě. Poprvé virus GBV-C/HGV popsal Simons v roce 1995 při vyšetření séra chicagského chirurga s akutní hepatitidou, které od něj bylo odebráno třetí den po vzniku žloutenky. Následná vyšetření prokázala, že izolovaný virus je odlišný od viru hepatitidy A, B, C, D i E. Iniciály jména onoho nemocného lékaře byly G. B., a právě podle nich byl nově objevený virus nazván – GB virus typu C (GBV-C) (Simons et al., 1995).

O rok později, tedy v roce 1996, Linnen izoloval tentýž virus od pacientů s chronickou non-A a non-B hepatitidou a domníval se, že právě virus hepatitidy G (HGV), jak jej tehdy nazval, je novým původcem hepatitidy (Linnen et al., 1996).

V roce 1997 genová analýza porovnávající genom obou nově objevených virů poukázala na homologii jejich izolátů, a jednoznačně se tak podařilo prokázat, že se jedná o izoláty jednoho a téhož viru (Zanetti et al., 1997). Pro označení tohoto viru se nakonec ujala často používaná zkratka GBV-C/HGV, která respektuje obě pracoviště, ve kterých byl virus izolován.

5.2. Systematika

Virus hepatitidy G, neboli GBV-C/HGV (GB virus C/hepatitis G virus) je řazen do čeledi *Flaviviridae* spolu s dalšími druhy virů, které u člověka mohou vyvolávat závažná onemocnění, jako je například virus žluté zimnice, komplex virů japonské encefalitidy, viry horečky Dengue, komplex virů klíšťové encefalitidy nebo virus hepatitidy C.

Tyto viry jsou v rámci čeledi *Flaviviridae* rozděleny do tří rodů:

- *Hepacivirus*
- *Flavivirus*
- *Pestivirus*

Ty se navzájem liší antigenními a biologickými charakteristikami. Pro jejich vzájemnou podobnost je GBV-C/HGV řazen do rodu *Hepacivirus* spolu s virem hepatitidy C (Votava et al., 2003). Do stejného rodu jsou zároveň řazeny i GBV-A a GBV-B, které

představují dva typy viru GB, které byly izolovány z krve infikovaných opic (Linnen et al., 1996).

5.3. Struktura viru

GBV-C/HGV je obalený RNA virus s jediným celistvým vláknem RNA o kladné polaritě a délce 9,4 kb, s kubicky symetrickou kapsidou. Genom GBV-C/HGV si je do určité míry podobný s genomem viru hepatitidy C, nicméně však ne natolik, aby mohl být prohlášen za jeho genotyp (Simons et al., 1995). Součástí obalu GBV-C/HGV jsou peptidy E1 a E2, které mají pravděpodobně význam pro usnadnění průniku viru přes membrány hostitelských buněk (Pérez-López et al., 2009).

5.4. Genotypy

U viru GBV-C/HGV rozlišujeme v dnešní době šest genotypů, které jsou vázány na různé geografické oblasti. Jako první byly popsány tři genotypy:

- * genotyp 1 (vázaný na západní Afriku)
- * genotyp 2 (severoamerický a evropský)
- * genotyp 3 (vyskytující se v Asii)

Později byly současně - jako genotyp 4 - popsány viry vázané na jižní Afriku a na jihovýchodní Asii, přičemž jako genotyp 4 zůstal jihovýchodoasijský a genotyp z jižní Afriky dostal číslo 5 (Tucker & Smuts, 2000). Poslední objevený genotyp 6 je spjat s výskytem v Indonésii (Muerhoff, 2006).

5.5. Místo replikace viru

Po translaci a produkci polyproteinu je pomocí RNA polymerázy, která se nachází v nestrukturálním proteinu NS5B, transkribován negativní řetězec RNA, podle kterého se následně přepisuje pozitivní řetězec RNA. Z toho zřetelně vyplývá, že detekce negativního řetězce RNA vypovídá o aktivním procesu replikace viru. Ten byl sice prokázán ve vzorcích jaterních biopsií, nicméně se ukázalo, že se nereplikuje primárně jen v hepatocytech, což dokládají výsledky různých studií uvedených v článku Mohra & Stapletona (2009). Například při koinfekci virem hepatitidy C a GBV-C/HGV byla v játrech pacientů nalezena větší koncentrace HCV RNA, oproti významně vyšší hladině GBV-C/HGV RNA v jejich séru. V jiné studii byl zjišťován poměr nálezů GBV-C/HGV RNA v játrech a v séru, přičemž tento poměr byl menší než 1. Dále nebyl

u pacientů po transplantaci jater zjištěn pokles hladiny GBV-C/HGV RNA v séru, jak je to typické pro infekci virem hepatitidy C (Mohr & Stapleton, 2009).

GBV-C/HGV RNA byla prokázána a byla produkována T a B lymfocyty odebranými od infikovaných pacientů. Z T lymfocytů to byly jak CD4+, tak CD8+ subpopulace, které virovou nukleovou kyselinu obsahovaly. V buněčné kultuře *in vitro*, obsahující různé typy lidských buněk pak byl pozitivní nález GBV-C/HGV RNA v mononukleárních buňkách periferní krve (Mohr & Stapleton, 2009). Virus byl na základě výsledků dalších studií prohlášen za lymfotropní. Jeho replikace byla dále prokázána v buňkách cévního endotelu a také v kostní dřeni a ve slezině. Zdá se, že lymfocytové progenitory by mohly být místem primární replikace viru (Handa & Brown, 2000; Stapleton, 2003) Tyto závěry podporují teorie o tom, že GBV-C/HGV nemá přímou souvislost se vznikem hepatitidy.

5.6. GBV-C/HGV a jím způsobená onemocnění

GBV-C/HGV byl zpočátku spojován jak s akutní, tak s chronickou hepatidou jinak nejasného etiologického původu, která není způsobena virem hepatitid A až E, tedy s takzvanou non A-E hepatidou. Následné klinické studie nicméně úzký vztah mezi GBV-C/HGV a hepatidou (Stapleton, 2003). Stejně tak se nepotvrdily předpoklady o souvislostech mezi infekcí GBV-C/HGV a onemocněním některých dalších orgánů, jako například onemocněním ledvin nebo kostní dřeni. V dnešní době tedy virus GBV-C/HGV není přímo spojován s konkrétním onemocněním, lze o něm říci, že jde o nepatogenní virus (Baggio-Zappia & Hernandez Granato, 2009; Mohr & Stapleton, 2009).

5.7. Epidemiologie

Stejně jako virus hepatitidy C, je i virus GBV-C/HGV rozšířen celosvětově a může způsobovat persistující infekci. Prevalence GBV-C/HGV RNA sledovaná u zdravých dárců krve, je ve vyspělých zemích asi 1-10%, v rozvojových zemích jsou tato procenta vyšší. V České republice se prevalence GBV-C/HGV RNA pohybuje kolem 6,3%. Průkaz protilátek proti obalovému peptidu E2 (anti-E2) je výrazně vyšší (v České republice je to asi 14,3%). Tento fakt vypovídá o značné promořenosti běžné populace (Aster et al., 2005).

Prevalence GBV-C/HGV je vyšší u jedinců, kteří jsou současně postiženi nějakou jinou parenterálně, nebo sexuálně přenosnou infekcí. Například u jedinců infikovaných zároveň virem hepatitidy C se prevalence GBV-C/HGV pohybuje mezi 20-30% (Stapleton, 2003).

U HIV pozitivních pacientů procento prevalence jak GBV-C/HGV RNA, tak protilátek anti-E2 v různých studiích značně kolísá, nicméně je statisticky průkazné, že výskyt proběhlých i recentních infekcí je významně vyšší než u zdravé populace. Například Tillmann et al. (2001) ve své práci uvádí 16,8% pozitivních na GBV-C/HGV RNA, 56,9% séropozitivních a 26,4% zcela negativních v souboru 197 HIV pozitivních pacientů. V souboru 271 HIV pozitivních pacientů byla podle studie Astera et al. (2005) v České republice prevalence GBV-C/HGV RNA 33,3% a séroprevalence 38,5% oproti souboru 178 zdravých dárců, kdy pozitivita GBV-C/HGV RNA byla 14,6% a pozitivita anti-E2 16,3%.

5.8. Způsob přenosu

GBV-C/HGV se přenáší několika možnými způsoby, kterými potvrzuje teorii o tom, že jde pravděpodobně o virus lymfotropní. Nejvýznamnějším z nich je parenterální způsob přenosu, kdy výrazně větší riziko možnosti infekce nesou jedinci přijímající transfuzi plné krve či krevních produktů, uživatelé intravenózně aplikovaných drog, pacienti docházející na hemodialýzu, na akupunkturu, návštěvníci tetovacích salonů apod. Je možný i přenos sexuálním kontaktem, a to častěji, než jak je tomu u viru hepatitidy C, pro který je tento způsob přenosu relativně výjimečný. Stejně tak i perinatální způsob přenosu, tj. přenos z matky na dítě, je u GBV-C/HGV výrazně častější, než u výše zmíněného viru hepatitidy C. V mateřském mléce nebyla přítomnost viru GBV-C/HGV prokázána, a tudíž je tento způsob přenosu nepravděpodobný (Aster et al., 2005)

5.9. Diagnostika

Diagnostické metody pro průkaz GBV-C/HGV byly vyvinuty už v roce jeho objevu, tedy v roce 1995. V dnešní době se využívá zejména molekulárně biologická metoda PCR (Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce) s předchozí reverzní transkripcí (RT-PCR), pomocí které ve vzorku prokazujeme přítomnost či nepřítomnost virové RNA. Při použití modernější real-time PCR můžeme výsledek

i kvantifikovat. Přítomnost GBV-C/HGV RNA ve vzorku vypovídá o právě probíhající infekci. Virémie GBV-C/HGV může přetrvávat desetiletí, nicméně u většiny infikovaných jedinců mizí do dvou let od infekce (Mohr & Stapleton, 2009)

Anamnéza proběhlé infekce GBV-C/HGV je založena na detekci protilátek proti obalovému glykoproteinu E2 (anti-E2). Tyto protilátky se prokazují komerční soupravou pro ELISA test, nicméně od tohoto vyšetření se již upouští, protože průkaz protilátek nemá pro kliniky žádný významnější efekt oproti detekci recentně probíhající infekce průkazem virové RNA. V dnešní době se dokonce tyto soupravy již vůbec nevyrábějí (Žůrek, firma ROCHE, osobní sdělení). O protilátkách proti obalovému peptidu E2 víme, že mají – na rozdíl od protilátek proti viru hepatitidy C – protektivní charakter a jejich přítomnost (bez pozitivního nálezu virové RNA) svědčí o dříve proběhlé infekci. Naopak průkaz samotné virové RNA bez nálezu protilátek vypovídá o aktivní replikaci viru. Pakliže jsou ve výsledku pozitivní jak protilátky, tak virová RNA, jedná se o fázi eliminace viru z organismu. Tato doba je u HIV pozitivních pacientů významně prodloužena díky zhoršenému stavu buněčné složky jejich imunitního systému (Mohr & Stapleton, 2009).

6. VIRUS HIV

6.1. Systematika

Virus HIV 1 a 2 řadíme do čeledi *Retroviridae*, podčeledi *Orthoretrovirinae* a do rodu *Lentivirus*. Někteří příslušníci tohoto rodu jsou schopni vyvolávat infekce pouze pomalu se rozvíjející (proto *Lentivirus* – *lentus* = latinsky pomalý) s následným zhoršujícím se průběhem a fatálním závěrem. Kromě dvou typů viru HIV – HIV-1 a HIV-2 - sem patří například i virus imunodeficitu koček apod.

Typy virů HIV-1 a HIV-2 se v mnoha směrech liší. Podle genetických odlišností se dále rozlišují jednotlivé genotypy, u HIV-1 jich existuje jedenáct, u HIV-2 šest. Další rozdíly mezi oběma typy najdeme v jejich rozdílném původu - HIV-1 je příbuzný viru opičího imunodeficitu ze šimpanzů (SIV_{epz}), HIV-2 pak souvisí se stejným virem pocházejícím z mangabejů (SIV_{sm}). Oba typy se liší i svou patogenitou, přičemž HIV-2 je méně patogenní a hůře se přenáší z matky na novorozence. HIV-2 je typický pro výskyt v rozvojových zemích, v našich oblastech se pak vyskytuje zejména HIV-1. Rozdíly nalezneme i v antigenní výbavě obou typů viru HIV (Votava et al., 2003).

6.2. Replikace viru

Charakteristickým znakem příslušníků čeledi *Retroviridae* je přítomnost enzymu reverzní transkriptázy, díky které jsou viry schopny přepisovat svou genomovou RNA na dvouvláknitou DNA. Díky dalšímu enzymu integráze je pak virus schopen začlenit se do DNA hostitelské buňky jako provirus, což je název pro kopii retrovirového genomu (Votava et al., 2003). Zde se nachází v latentní podobě až do chvíle, kdy je hostitelská buňka aktivována. Tím se aktivuje i přítomný provirus, je zahájena replikace virové nukleové kyseliny a tvorba virových proteinů a glykoproteinů. Výsledkem je vznik virionů, které následně prostupují cytoplazmatickou membránou hostitelské buňky; tou jsou při tom obalovány a hostitelská buňka lyzuje. Replikace viru probíhá buď v T-lymfocytech (tyto buňky infikují tzv. T-lymfotropní (X4) kmeny), nebo v makrofázích či dendritických buňkách (tzv. kmeny R5) (Krejsek & Kopecký, 2004).

Reverzní transkriptáza je jednou z příčin obrovské variability kmenů všech retrovirů. Díky nepřesnostem, které vznikají při reverzní transkripci (enzym není vybaven schopností opravit nesprávně začleněný nukleotid v řetězci), vzniká velké množství mutant. Dalším důvodem výrazné variability, a to zejména u viru HIV, je i velmi široký rozsah jeho množení v organismu. Každý den v organismu vznikne více

než 10^9 nových virionů, které jsou vzájemně lehce geneticky odlišné. Taková populace blízce příbuzných, ale geneticky se lišících virionů se nazývá quasispecies (Votava et al., 2003).

6.3. Způsob přenosu

Virus HIV se přenáší parenterálně, sexuálním kontaktem i perinatálně a byl prokázán i v mateřském mléce, takže se na dítě přenáší nejen transplacentárně, ale i kojením (Votava et al., 2003).

6.4. Diagnostika

Infekce virem HIV se dnes nejběžněji diagnostikuje nepřímým průkazem specifických protilátek pomocí ELISA testu, přičemž se musí dbát na možnost výskytu falešných pozitivit, a to i přesto, že používané antigeny pro průkaz protilátek jsou rekombinantní. Postup v případě sérologické positivity je tedy takový, že se vzorek posílá na confirmaci, což znamená provedení průkazu protilátek jinou detekční soupravou. Pakliže je výsledek i nadále pozitivní, confirmuje se dále pozitivita technikou imunoblotu, pomocí kterého jsou detekovány specifické protilátky proti různým virovým proteinům a glykoproteinům. V tomto testu je pak nutná aspoň minimální kombinace pozitivit proti základním virovým proteinům, aby výsledek mohl být prohlášen za pozitivní s definitivní platností (Krejsek & Kopecký, 2004). Kromě falešných pozitivit může u průkazu protilátek nastat i situace, kdy výsledek ELISA testu je falešně negativní. To se může stát v situaci tzv. „diagnostického okna“, což je období mezi začátkem infekce a reakcí organismu, která se projeví tvorbou protilátek. Tato doba může být dlouhá od tří do osmi týdnů. Diagnostika v tomto období (například u dárců krve, u kterých je nutné mít jistotu, že nejsou infikováni HIV) je založena buď na průkazu virové RNA metodou RT-PCR, nebo na průkazu virového dřevňového proteinu p24, který je přítomen zhruba prvních čtrnáct dní po infekci, tedy ještě před produkcí specifických protilátek. V dnešní době existují diagnostické soupravy, pomocí kterých se prokazuje jak přítomnost specifických protilátek, tak přítomnost antigenu p24 (Chu & Selwyn, 2010).

6.5. Epidemiologie

Světová zdravotnická organizace sleduje výskyt nakažených virem HIV a podle zatím poslední vydané statistiky uzavřené v prosinci roku 2009 je na světě 33,3 milionů žijících lidí pozitivních na HIV, z toho 30,8 milionů tvoří skupina dospělých (z nichž 15,9 milionů jsou ženy) a 2,5 milionů dětí. Nově infikovaných osob bylo v roce 2009 asi 2,6 milionů, úmrtí v souvislosti s AIDS bylo přibližně 1,8 milionů (42). V České republice bylo k prosinci roku 2009 zaznamenáno celkem 1344 HIV pozitivních jedinců, nově infikovaných osob za rok 2009 bylo 157 (o 6,1% více než v předešlém roce), zemřelých 212 (43).

6.6. Průběh infekce

Pro úplnost se pokusím přiblížit alespoň stručný průběh infekce virem HIV. Virus je lymfotropní, proto se po jeho vstupu do organismu výrazně pomnoží v lymfatických uzlinách. Následně dojde k uvolnění virionů do krve a ke vzniku viremie. U viru HIV k ní dochází až po několika týdnech od infekce (jak už jsem popsala výše) a je doprovázena klinickými příznaky podobné chřipce. Toto období je nazýváno jako stadium primární infekce, které trvá v řádech týdnů a je zakončeno spontánním vymizením klinických příznaků.

Laboratorně v tomto stadiu zachytíme vysoké množství virové RNA v krvi, navíc je zvýšená sedimentace a hladina reaktantů akutní fáze zánětu. Krevní obraz je provázen typickou lymfopenií (dochází k lýze lymfocytů) a prakticky ve všech případech je snížený podíl pomocných CD4+ T lymfocytů a naopak výrazně vyšší podíl tlumivých cytotoxických CD8+ T lymfocytů. Ne zcela optimální výpovědní hodnotu má zjištění hladin některých cytokinů, případně jiných molekul charakteristických pro aktivaci imunitního systému.

Po stadiu primární infekce následuje období bezpříznakového nosičství, během něhož u infikovaného člověka nejsou přítomny žádné klinické projevy, nicméně virus se během této doby dále intenzivně replikuje, tentokrát však v buňkách sekundárních lymfatických orgánů. V tomto období se rozvíjí reakce imunitního systému – objevují se cytotoxické CD8+ T lymfocyty, které specificky reagují s buňkami infikovanými HIV, lyzují je a zároveň produkují látky, které potlačují virovou replikaci. Dochází tak k jakémusi rovnovážnému stavu, kdy je zánik CD4+ T lymfocytů relativně kompenzován vznikem nových, nicméně jejich počet se ve skutečnosti neustále snižuje.

Bylo prokázáno, že čím vyšší je hladina kopií virových RNA, tím rychleji dochází ke ztrátě CD4+ T lymfocytů, a tím i ke kratšímu přežívání jedinců. Této skutečnosti se využívá k určení míry progresu onemocnění. Počet CD4+ T lymfocytů a tzv. virová nálož (počet kopií virové RNA) jsou ukazatele, kterých se využívá ke stanovení případného počátku aplikace antiretrovirové terapie.

Stadium bezpříznakového nosičství trvá u jednotlivých pacientů různě dlouho, většinou v řádu let. Imunitní systém organismu se však neustálou snahou o potlačení replikace viru vysiluje, dochází k stále větším ztrátám CD4+ T lymfocytů a v 85-90 % případech pak onemocnění dále progreduje do stadia rozvinutého syndromu získaného imunodeficitu (AIDS). Pro toto stadium je charakteristický výskyt rozmanitých infekcí způsobených nedostatečností imunitního systému. Postiženy jsou různé orgánové soustavy: kůže, dýchací soustava, gastrointestinální trakt a v neposlední řadě pak centrální nervový systém.

Bohužel virus HIV stále vítězí nad člověkem a neexistuje jedinec, u kterého by se podařilo virus z organismu zcela eliminovat, a to jak spontánně, tak léčbou. U neléčeného jedince se doba mezi počátkem infekce a úmrtím pohybuje okolo deseti let. Léčba je v dnešní době založena na kombinaci několika léků založených na inhibici replikace viru, a to jednak na inhibici reverzní transkriptázy a jednak na inhibici virových proteáz. Kombinace těchto dvou typů léků nese zkratku HAART - Highly Active AntiRetroviral Therapy (dnes nověji cART – Combinated Antiretroviral Therapy), je velmi nákladná a přináší pacientovi mnohé nepříjemné a závažné vedlejší účinky (Votava et al., 2003).

7. INFEKCE VIREM GBV-C/HGV U HIV POZITIVNÍCH PACIENTŮ

I přes intenzivní výzkum se stále nepodařilo odhalit způsob, jak preventivně chránit zdravé jedince před infekcí virem HIV, ani jak zcela vyléčit jedince již infikované. Stále se hledají nové způsoby, jak by bylo možné virus HIV překonat, a proto jsou jakékoli možnosti podrobovány vědeckým výzkumům. V zájmu vědců se tak objevila i teorie, že současná infekce virem GBV-C/HGV znamená pro HIV pozitivní pacienty určitou nadějí v rozvoji AIDS.

U HIV pozitivních pacientů dochází často ke koinfekcím, a to zejména s virem hepatitid. Pro koinfekce virů je častá charakteristická změna prognózy HIV pozitivních pacientů. Například koinfekce viru hepatitidy B a viru hepatitidy C délku života HIV infikovaných pacientů snižuje a nemá dobrý vliv na vývoj nemoci. Oba tyto viry často způsobují rychlejší progresi jaterního onemocnění, a navíc se ukazuje, že jejich přítomnost zvyšuje možnost hepatotoxicity antiretrovirotik (Moodie et al., 2009; Kumar et al., 2008). Oproti tomu vliv současné infekce GBV-C/HGV a HIV se naopak jeví jako pozitivní. Již na konci 90. let 20. století, několik let po objevení viru GBV-C/HGV, se objevují publikace, které se touto problematikou zabývají. Podle některých studií se zdá být koinfekce GBV-C/HGV a HIV jejím nositelům prospěšná. Při srovnávání HIV pozitivních jedinců bez a se současnou infekcí GBV-C/HGV vyšly ve studiích najevo zajímavé skutečnosti – pacienti s koinfekcí GBV-C/HGV měli delší dobu přežívání, byla u nich zaznamenána výrazně delší doba nástupu AIDS, a ti pacienti, kteří už ve stadiu AIDS byli, vykazovali pomalejší progresi onemocnění. Pozitiva byla zaznamenána i na laboratorní úrovni. Koinfikovaní pacienti měli vyšší hodnoty CD4+ T lymfocytů a nižší virovou nálož HIV v krvi, což jsou – jak jsem již uvedla výše – důležité prognostické markery poukazující na pozitivnější prognózu vývoje nemoci. Kromě toho byla infekce GBV-C/HGV častěji zachycena u pacientů bez známek progresivní HIV infekce, než u pacientů ve stadiu AIDS. Zajímavým fenoménem se pak také jeví zvýšení virové nálože GBV-C/HGV po nasazení léčby HAART (Aster et al., 2005).

V září roku 2001 byly uveřejněny dvě studie Tillmana a Xiang, ve kterých se autoři zabývali právě problematikou koinfekce GBV-C/HGV a HIV. Výsledky vypovídají o jejím příznivém vlivu na přežívání HIV pozitivních pacientů. Xiang et al. ve své studii z roku 2001 sledoval vliv koinfekce GBV-C/HGV na délku přežívání 362 HIV pozitivních pacientů. Z nich jich mělo 144 (39,8%) virémii GBV-C/HGV. Celá skupina

- bez ohledu na pozitivitu GBV-C/HGV - pak byla sledována po dobu čtyř let. Za toto období zemřelo 41 (28,5%) pacientů se současnou virémií GBV-C/HGV, zatímco zemřelých HIV pozitivních pacientů bez současné virémie GBV-C/HGV bylo 23 z 218 (56,4%; $P < 0,001$). Následná Coxova regresní analýza, ve které byla zohledněna léčba, množství CD4+ T lymfocytů, věk, pohlaví, rasa a způsob přenosu viru vedla ke zjištění, že doba přežívání u pacientů infikovaných pouze virem HIV je významně nižší než u těch, kteří jsou zároveň infikováni virem GBV-C/HGV.

Ve stejné studii pak autoři zjišťovali vzájemné působení obou virů *in vitro* na kultuře mononukleárních buněk z periferní krve. Replikaci HIV zjišťovali průkazem antigenu p24 a prokázali její inhibici při současné infekci buněk GBV-C/HGV a HIV. Naopak infekce oběma viry neměla žádný vliv na expresi povrchových antigenů mononukleárních buněk periferní krve (Xiang et al., 2001).

Tillmann et al. se ve stejném roce (2001) také zabýval vlivem koinfekce GBV-C/HGV na dlouhodobý efekt u HIV pozitivních pacientů. Již ve své první studii z roku 1996 tento pozitivní efekt prokázal, v této novější studii se jím opakovaně zabývá. Snaží se odpovědět i na otázku, zda v případě, že se pozitivní vliv koinfekce potvrdí, tento přetrvává i po nasazení léčby HAART. Dále také řeší otázku vzájemného ovlivnění virové nálože GBV-C/HGV a virové nálože HIV.

V této studii autoři sledovali skupinu 197 HIV pozitivních pacientů. Z nich bylo 33 (16,8%) GBV-C/HGV RNA pozitivních, 112 (56,9%) mělo protilátky proti obalovému proteinu E2 a 52 (26,4%) nemělo žádný marker charakteristický pro infekci GBV-C/HGV. U těch pacientů, u kterých byla prokázána virová nukleová kyselina, byla potvrzena delší doba přežívání a zároveň u nich byl zaznamenán výrazně pomalejší přechod do stadia rozvinutého AIDS ($P < 0,001$ u obou srovnání). Také přežívání pacientů, u kterých již došlo k rozvinutí AIDS, bylo lepší u GBV-C/HGV pozitivních pacientů. I po nasazení léčby předpovídala přítomnost GBV-C/HGV delší přežití pacienta ($P = 0,02$). Virová nálož HIV byla nižší při pozitivitě GBV-C/HGV RNA, dá se tedy říci, že inverzně korelovala s virovou náloží HIV ($r = -0,33$, $P < 0,001$). Naopak nebyla průkazná korelace virové nálože GBV-C/HGV a počtu CD4+ buněk. Kromě těchto zjištěných skutečností může být infekce GBV-C/HGV markerem přítomnosti dalších faktorů, které vedou k příznivému vývoji infekce HIV (Tillmann et al., 2001).

Na rozdíl od uvedené Tillmanovy studie se ve studii z roku 2010 prokázala souvislost mezi GBV-C/HGV a počty CD4+ T lymfocytů. Ve skupině 210 HIV

pozitivních pacientů jich bylo 30% koinfikovaných GBV-C/HGV. U těchto pacientů byla zjištěna nižší virová nálož HIV RNA a vyšší počty CD4+ T lymfocytů ve srovnání s pacienty bez infekce GBV-C/HGV. Autoři také sledovali vliv jednotlivých genotypů GBV-C/HGV. Nejnižší počty CD4+ T lymfocytů měli koinfikovaní pacienti s genotypem GBV-C/HGV 1, naopak nejvyšší počty CD4+ T buněk měli infikovaní genotypem 2b. Z toho vyplývá, že genotyp 2b by mohl poskytovat lepší imunologickou odpověď u HIV pozitivních pacientů (Alcalde et al., 2010).

Původní studie vznikaly ještě v době, kdy se k léčbě nepoužívala HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), dnes nověji cART (Combinated Antiretroviral Therapy), a tak vznikla otázka, zda a jaký vliv má kombinace léčby a přítomnosti GBV-C/HGV infekce na HIV pozitivní pacienty. Samotná léčba HAART (cART) - ačkoli nedokáže virus z organismu zcela eliminovat - je pro pacienty obrovským přínosem a její síla se nedá srovnávat s působením GBV-C/HGV. Nicméně benefiční efekt GBV-C/HGV byl prokázán i u pacientů léčených HAART. Kromě toho, že virus GBV-C/HGV je i v přítomnosti HAART schopen inhibovat replikaci HIV *in vitro* (Berzsenyi et al., 2005), dochází jeho působením k redukcí virové nálože HIV u léčených pacientů.

Ve studii Souzy et al. (2006) byly náhodně vytvořeny tři skupiny ze 175 HIV pozitivních pacientů. Jedné skupině byl podáván indinavir, druhé pak zidovudin a lamivudin, třetí zidovudin, lamivudin a indinavir. Autoři sledovali virémii GBV-C/HGV a její efekt na změnu virové nálože HIV a na změny počtu CD4+ T lymfocytů po zahájení léčby. Prevalence GBV-C/HGV v celé skupině byla podobná jako v jiných studiích (24%). U virové nálože HIV byl po nasazení léčby patrný výraznější pokles u těch pacientů, kteří měli spolu s HIV i současnou virémii GBV-C/HGV. U počtů CD4+ nebyl celkově zaznamenán významný rozdíl mezi jedinci s nebo bez infekce GBV-C/HGV. Nicméně v průběhu 48 týdnů léčby byl prokázán vyšší počet CD4+ T lymfocytů u GBV-C/HGV viremických pacientů, kteří dostávali kombinaci léků zidovudin a lamivudin ve srovnání s těmi bez infekce GBV-C/HGV. Tato studie tedy dokládá hypotézu, že i při léčbě HAART je virémie GBV-C/HGV spojena s výraznějším úbytkem virové nálože HIV oproti GBV-C/HGV aviremickým pacientům a její efekt zůstává pozitivní (Souza et al., 2006).

Zajímavým názorem do problematiky koinfekce GBV-C/HGV a HIV přispívá Van der Bij et al. (2005) ve své studii, ve které se přiklání k teorii, že právě probíhající virémie GBV-C/HGV nemusí mít pro HIV pozitivní pacienty benefiční efekt, ale její

snížení může mít efekt opačný, negativní. U skupiny 326 HIV-1 pozitivních pacientů sledoval spolu s virémií GBV-C/HGV také hladiny HIV RNA a počty CD4+ buněk po dobu osmi let. U pacientů, u kterých došlo v průběhu této doby k vymizení virémie GBV-C/HGV, zaznamenal třikrát větší riziko progresse onemocnění způsobené virem HIV, než u těch, kteří virémii GBV-C/HGV nikdy neměli. Autoři na závěr vyslovili hypotézu, že přetrvávání virémie GBV-C/HGV závisí na přítomnosti dostatečného počtu CD4+ buněk; významný fakt, že dochází ke snižování počtu CD4+ buněk v průběhu progresse onemocnění spojené s virem HIV, je tak příčinou, nikoliv důsledkem vymizení virémie GBV-C/HGV (Van der Bij et al., 2005).

Až do této chvíle jsem uváděla pouze studie, které potenciální benefiční efekt koinfekce GBV-C/HGV u HIV infikovaných pacientů potvrzují. Existuje ale celá řada studií, které se k těmto závěrům nepřiklánějí a které vliv GBV-C/HGV na hladinu virémie HIV, na počty CD4+ T lymfocytů ani na progresi onemocnění souvisejícího s HIV nepotvrzují. Vzájemné působení GBV-C/HGV a HIV je v těchto studiích považováno za neutrální (Björkmann et al., 2004; Canducci et al., 2003; Kaiser & Tillmann, 2005; Kaye et al., 2005; Schuval et al., 2005; Sheng et al., 2007;) Existují rovněž studie, ve kterých se autoři vyjadřují k benefičnímu efektu koinfekce GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů skepticky, ba dokonce připisují přítomnosti GBV-C/HGV efekt negativní. V jedné studii (Rey et al., 2000) je virémie GBV-C/HGV spojována s nižšími počty CD4+ T lymfocytů a s přítomností infekce virem hepatitidy B.

8. KOINFEKCE GBV-C/HGV, HIV a HCV

Při studiu možného benefičního efektu koinfekce viry GBV-C/HGV a HIV se nelze nezmínit ani o vlivu GBV-C/HGV při současné infekci viry HCV a HIV. Ke koinfekcím viry hepatitid a viru HIV dochází poměrně často, patrně z důvodu podobného, parenterálního způsobu přenosu infekce. Nemalý podíl na tom má i rizikové chování pacientů. Prevalence infekce virem hepatitidy C v rámci HIV pozitivní populace dosahuje ve vyspělých zemích až 30% oproti 1% vyskytující se v populaci zdravých jedinců. Infekce virem hepatitidy C u 55 až 85% pacientů přechází do chronicity a není příliš úspěšně léčitelná. U 20 až 30% HCV pozitivních pacientů pak dochází k rozvoji jaterní fibrózy, cirhózy, selhání jaterních funkcí či hepatocelulárního karcinomu.

Pro HIV pozitivní pacienty znamená současná infekce virem hepatitidy C zhoršení prognózy onemocnění. Progrese chronické hepatitidy C je totiž při koinfekci s virem HIV výrazně urychlena a ke vzniku komplikací způsobených přítomností viru hepatitidy C dochází mnohem dříve - v řádech let - než u osob bez HIV, u kterých se tyto problémy projeví v řádech desetiletí. U HCV/HIV koinfikovaných jedinců je zvýšená pravděpodobnost výskytu komplikací v podobě hepatocelulárního karcinomu, jaterní steatózy, fibrózy a cirhózy, často s rozvojem do tzv. fáze ESLD (End-Stage Liver Disease), přičemž riziko rozvoje ESLD je u HCV/HIV pozitivních pacientů asi šestkrát vyšší než u jedinců bez HIV infekce. Kromě těchto komplikací s játry dále replikace HCV spolu s HIV postihuje imunitní systém, kdy dochází ke zvýšené chronické aktivaci CD4+ a CD8+ buněk, jež pak vede k dysfunkci imunitního systému a následné produkci cytokinů, které dále zesilují replikaci HCV a HIV. Tento stav finálně vede ke snižování počtu T lymfocytů, k silnější supresi imunitního systému a k rychlejšímu rozvoji onemocnění do stadia AIDS HCV/HIV pozitivních pacientů oproti infikovaným pouze virem HIV. Nicméně nejčastější příčinou úmrtí koinfikovaných jedinců HCV/HIV jsou výše zmíněné jaterní komplikace (Operskalski & Kovacs, 2011).

Co se týče léčby koinfikovaných pacientů viry HCV a HIV, je žádoucí co nejdříve nasadit léčbu HAART, protože pomáhá zpomalit progresi jaterních onemocnění, ale zároveň může být játrům nebezpečná pro svou značnou hepatotoxicitu, která - jak uvádí Moodie et al. (2009) - může být díky vlivu viru hepatitidy C i zesílena. Benefity léčby HAART u HCV/HIV koinfikovaných pacientů spočívají mimo jiné ve zvýšení počtu

CD4+ buněk, snížení replikace HIV v játrech, snížení hladin prozánětlivých cytokinů, zmenšení pravděpodobnosti vzniku nekrózy jater, jejich zánětů a progresi dalších jaterních onemocnění, jako je hepatocelulární karcinom, steatóza, fibróza, cirhóza s následným rozvojem do stadia ESLD (End-Stage Liver Disease); díky tomu léčba HAART celkově přispívá ke snížení mortality zapříčiněné jaterním onemocněním (Operskalski & Kovacs, 2011).

Co se týče viru GBV-C/HGV, jeho koinfekce s virem hepatitidy C se stala předmětem zkoumání. Prevalence GBV-C/HGV u HCV pozitivních pacientů se pohybuje mezi 11 až 24% (Berzsényi et al., 2005). V provedených studiích autoři hledali souvislosti mezi virem GBV-C/HGV a HCV u koinfikovaných pacientů. Studovali možný vliv na průběh a prognózu onemocnění, na přechod nemoci do chronického stadia, na progresi jaterní fibrózy způsobené virem HCV i změny v hladinách transamináz; žádné změny, které by GBV-C/HGV u infikovaných virem hepatitidy C vyvolal, se nicméně nepotvrdily (Rambusch et al., 1998; Berzsényi et al., 2007).

Naopak u koinfekce GBV-C/HGV a HCV u HIV pozitivních pacientů různé studie potvrzují benefiční efekt viru GBV-C/HGV, a to zejména snížením výskytu nebo významným zpomalením progresu jaterních onemocnění. Tento efekt byl potvrzen pouze u pacientů s GBV-C/HGV virémií, jejíž přítomnost se ukázala jako klíčová, neboť u pacientů, u kterých již proběhla eliminace GBV-C/HGV z organismu, žádné změny v progresi onemocnění jater pozorovány nebyly (Berzsényi et al., 2007).

Mechanismy vzájemného působení virů GBV-C/HGV a HCV u HIV pozitivních pacientů jsou předmětem dalších studií. Někteří autoři předpokládají, že se nejedná o přímý kompetitivní vztah obou virů, neboť podle nich se GBV-C/HGV nereplikuje v hepatocytech na rozdíl od viru hepatitidy C (Berzsényi et al., 2005), a možný důvod zpomalení progresu jaterních onemocnění u HIV/HCV/GBV-C/HGV koinfikovaných pacientů lze hledat ve stavu imunitního systému, který je příznivější díky přítomnosti GBV-C/HGV se všemi jeho důsledky (Berzsényi et al., 2007). Novější studie, zabývající se různou expresí genů a proteinů spojených s GBV-C/HGV u HIV/HCV pozitivních pacientů poukazuje na to, že koinfekce GBV-C/HGV může souviset se snížením kritických genů spojených se signalizací T buněk vyskytujících se v játrech. To by mohl být jeden z důvodů pomalejšího rozvoje jaterních onemocnění v průběhu koinfekce GBV-C/HGV a HIV/HCV (Berzsényi et al., 2011).

9. MECHANISMY PŮSOBENÍ GBV-C/HGV NA HIV INFEKCI

Viry HIV mohou vstupovat do buněk, které na svém povrchu exprimují molekulu CD4. Ta slouží viru HIV jako hlavní receptor. Buňky, které ji exprimují, jsou T-lymfocyty nebo makrofágové a dendritické buňky. K samotnému vstupu do těchto buněk však HIV potřebuje ještě přítomnost koreceptorů, které představují chemokinové receptory CCR5 a CXCR4. Kmeny HIV s tzv. M-tropismem (přednostně infikují makrofágy a dendritické buňky) využívají jako koreceptor CCR5, T lymfotropní kmeny HIV pak využívají jako koreceptor CXCR4. Interakce mezi chemokinovými receptory a gp120 způsobí zapojení gp41, což je nepostradatelný glykoprotein pro vstup HIV do buňky. (Krejsek & Kopecký, 2004).

Zjištění, že GBV-C/HGV se replikuje v CD4+ T lymfocytech, vedlo vědce ke zvýšené pozornosti, co se týče možných interakcí mezi GBV-C/HGV a HIV. V mnoha *in vitro* studiích se skutečně projevil inhibiční vliv infekce GBV-C/HGV na replikaci HIV. Mechanismy působení viru, kterými je replikace HIV inhibována, jsou pravděpodobně multifaktoriální a stále představují zajímavý předmět pro výzkum.

Už Xiang ve své původní studii z roku 2001 popsal inhibici replikace HIV na mononukleárních buňkách periferní krve *in vitro*. I většina následných studií popisuje mechanismy koinfekce lymfocytů viry GBV-C/HGV a HIV zjišťované právě v podmínkách *in vitro*.

9.1. Vliv GBV-C/HGV obalového glykoproteinu E2

Jeden z možných mechanismů inhibice replikace HIV je vliv GBV-C/HGV na chemokinové receptory na CD4+ buňkách, které virus HIV využívá jako vstupní koreceptor. Jedná se buď o receptor CCR5, nebo CXCR4. Expresi těchto receptorů ovlivňuje obalový glykoprotein GBV-C/HGV E2, jak prokázali ve své studii například Mohr & Stapleton (2009). Ti sledovali inhibiční efekt glykoproteinu E2 *in vitro*, a to jak při koinfekci buněk viry GBV-C/HGV a HIV, tak přidáním samotného rekombinantního glykoproteinu E2 k CD4+ T buňkám infikovaným pouze HIV. Přítomnost glykoproteinu E2 v buňkách CD4+ vyvolává snížení exprese receptoru CCR5, a tím snižuje možnost vazby a vstupu do buněk.

Druhý efekt, který má obalový E2 v CD4+ buňkách, je uvolnění rozpustných faktorů, přirozených ligandů povrchových receptorů, a to jak receptoru CCR5, tak receptoru CXCR4. Uvolněné chemokinové ligandy tyto receptory obsazují

a kompetitivně tak inhibují vstup viru HIV do buňky (Xiang et al., 2009). Izoláty HIV, které využívají ke vstupu do buněk koreceptor CCR5, jsou inhibovány třemi dosud známými ligandy. Jsou to RANTES (Regulated On Activation, Normal T-Cell Expressed And Secreted) a makrofágové zánětlivé proteiny (Macrophage Inflammatory Protein) MIP-1 α a MIP-1 β . Druhý vstupní koreceptor pro vstup viru HIV do buňky CXCR4 je pak obsazován SDF-1 (Stromal-Derived Factor), což je zatím jediný známý ligand pro tento receptor (Mohr & Stapleton, 2009). Výsledky předchozích studií o jednom z možných mechanismů interakce GBV-C/HGV a HIV sledovaném *in vitro* jsou podpořeny i závěry klinických pozorování. U dlouhodobě přežívajících HIV pozitivních osob se současnou GBV-C/HGV infekcí byla zjištěna jak snížená exprese chemokinových receptorů CCR5 a CXCR4, tak i vysoké koncentrace jejich ligandů RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β a SDF-1 (Aster, ústní sdělení).

9.2. GBV-C/HGV a cytokiny

Kromě výše uvedených mechanismů se také předpokládá, že GBV-C/HGV může interagovat s lymfocyty a navodit při tom chemokinové či cytokinové prostředí, které i jinak inhibuje replikaci HIV (Mohr & Stapleton, 2009). Nunnari et al. (2003) ve své studii sledoval hladiny interleukinů u HIV pozitivních pacientů v souvislosti s GBV-C/HGV infekcí. Zaznamenal statisticky významné rozdíly mezi skupinou koinfikovanou GBV-C/HGV, u které nedocházelo k výraznému kolísání hladin sledovaných interleukinů a skupinou bez infekce GBV-C/HGV. U pacientů z druhé skupiny došlo v průběhu HIV infekce k signifikantnímu poklesu hladin IL-2 a IL-10. Jiné studie naopak vztah GBV-C/HGV a chemokinové a cytokinové exprese nepotvrzují (Gimenez-Barcons et al., 2005).

Pozastavila bych se ještě u IL-2 ve vztahu k HIV infekci a k viru GBV-C/HGV. Interleukin-2 je cytokin, který má - mimo jiné - výrazné účinky na proliferaci CD4+ buněk. Podávání IL-2 HIV pozitivním pacientům léčeným antiretrovirovou terapií podporuje zvýšení počtu jejich CD4+ T lymfocytů. Stapleton et al. (2009) ve své studii zaznamenal zajímavý vztah IL-2 a replikace GBV-C/HGV. V pokusech *in vitro* inhibovala replikaci GBV-C/HGV aktivace CD4+ T lymfocytů vyvolaná přidáním IL-2 a fytohemaglutininu. Je tedy pravděpodobné, že přítomnost GBV-C/HGV v buňce ovlivňuje imunitní odpověď HIV pozitivních pacientů na podání IL-2, což autoři následně prokázali i u pacientů samotných. U jedinců bez virémie GBV-C/HGV, kteří

zároveň s antiretrovirovou léčbou dostali i IL-2, se projevil vyšší nárůst CD4+ T lymfocytů než u jedinců s virémií GBV-C/HGV, kteří také dostali spolu s léčbou IL-2. Tento stav setrval v průběhu celé studie, po dobu 84 týdnů. Lepší bylo podávat IL-2 intravenózně než podkožně, protože nárůsty počtů CD4+ T buněk pak byly vyšší, a to ve skupině bez virémie GBV-C/HGV. U skupiny s virémií se pak ukázalo jako lhostejné, jakým způsobem je IL-2 podáván. Žádný vliv pak virémie GBV-C/HGV a současné podávání IL-2 spolu s léčbou neměla na hladiny HIV RNA. Stejně tak nemělo žádnou významnou souvislost podávání IL-2 s vyšší hladinou GBV-C/HGV RNA, s čímž nekorelovaly ani počty CD4+ T lymfocytů.

U jedinců s pozitivní GBV-C/HGV RNA nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v nárůstu CD4+ T buněk v závislosti na podání či nepodání IL-2, z čehož vyplývá, že pozitivní účinek IL-2 u pacientů s virémií GBV-C/HGV se neprojevil. Nicméně u pacientů pouze s virémií GBV-C/HGV (bez podání IL-2) se projevil významný nárůst počtů CD4+ T buněk, z čehož vyplývá, že IL-2 má smysl podávat těm HIV pozitivním pacientům, kteří nejsou koinfikováni GBV-C/HGV (Mohr & Stapleton et al., 2009).

Některé další současné studie ukázaly, že přítomnost GBV-C/HGV u HIV infikovaných pacientů významně zvyšuje hladinu aktivace interferonu v dendritických buňkách v porovnání s infikovanými pouze HIV. Tyto vlivy GBV-C/HGV na buňky imunitního systému poskytují model, jak by mohl GBV-C/HGV inhibovat replikaci HIV – tj. prostřednictvím koreceptorů HIV CCR5 nebo i CXCR4, případně prostřednictvím vlastní imunity (Mohr & Stapleton et al., 2009).

9.3. Vliv nestrukturních proteinů GBV-C/HGV

Virový genom čeledi *Flaviviridae* je tvořen jednořetězcovou pozitivní RNA, která kóduje polyprotein posttranslačně rozštěpený na strukturní a nestrukturní proteiny. U GBV-C/HGV je nestrukturní protein 5 (NS5) dělen na dva produkty s názvy NS5A a NS5B. NS5A je multifunkční fosfoprotein nezbytný pro infekčnost viru a replikaci RNA, NS5B vykazuje polymerázovou aktivitu. Při zjišťování možných mechanismů interakce virů GBV-C/HGV a HIV byl - kromě vlivu obalového glykoproteinu GBV-C/HGV E2 - prokázán vliv dalšího proteinu, který interaguje s CD4+ T lymfocyty. Tím je právě nestrukturní protein NS5A. Jeho exprese na CD4+ T buňkách částečně inhibuje replikaci HIV nezávisle na koreceptorech (CCR5 nebo CXCR4) snížením exprese CD4 molekul a částečně pak i snížením exprese povrchového chemokinového receptoru

CXCR4. NS5A zároveň indukuje uvolnění chemokinů SDF-1, které obsazují CXCR4, čímž opět dochází ke kompetici mezi přirozeným ligandem tohoto receptoru a virem HIV, využívajícím jako vstupní koreceptor právě CXCR4. Dále se předpokládá existence ještě dalších mechanismů přispívajících k inhibici replikace HIV (Xiang et al., 2009).

10. SOUČASNÝ VÝZKUM V ČR

V minulosti nebyl v České republice proveden žádný výzkum, který by se zabýval problematikou GBV-C/HGV infekce a jejího vlivu na pacienty infikované virem lidské imunodeficiency. Až v roce 2003 byl takový výzkum u nás za podpory Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky zahájen, a to v AIDS centru Fakultní nemocnice Na Bulovce ve spolupráci s laboratoří VIDIA-DIAGNOSTIKA, spol. s r.o.. Hlavním řešitelem grantu byl MUDr. Viktor Aster, s jehož laskavým svolením mohu v této práci prezentovat výsledky, ke kterým během let výzkumu ve spolupráci s týmem spoluřešitelů dospěl. Částečně jsem se tohoto projektu osobně účastnila, neboť jsem na svém pracovišti (VIDIA-DIAGNOSTIKA, spol. s r.o., Praha) přímo prováděla laboratorní diagnostiku GBV-C/HGV na oddělení PCR diagnostiky. Proto si dovoluji podrobněji popsat i samotnou diagnostiku.

Celá studie sestává ze dvou fází. Realizace prvního, základního výzkumu proběhla v letech 2003 až 2005 ve skupině 329 HIV pozitivních pacientů, druhá část proběhla v průběhu let 2007 až 2010 u 538 HIV infikovaných pacientů. Autorovým cílem bylo zjistit prevalenci GBV-C/HGV u pacientů infikovaných virem HIV na základě diagnostiky GBV-C/HGV infekce, sledování případných změn průběhu nemoci způsobené virem HIV a prognózou stavu pacientů v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti infekce GBV-C/HGV. Byly sledovány markery vypovídající o prognóze onemocnění, kterými jsou počty CD4+ lymfocytů a hladina virové nálože HIV (HIV RNA). Infekci GBV-C/HGV jsme diagnostikovali pomocí detekce protilátek anti-E2: Aktivní virémie pak byla zachycena přímým průkazem virové nukleové kyseliny GBV-C/HGV RNA. Dále byl sledován proces eliminace GBV-C/HGV infekce, zda virémie GBV-C/HGV nějakým způsobem ovlivňuje výši virémie HIV a jestli infekce GBV-C/HGV souvisí se závažností klinických stadií a s délkou přežívání HIV pozitivních pacientů.

V základní fázi výzkumu bylo sledováno celkem 329 HIV pozitivních pacientů, jejichž séra byla vyšetřena na výše uvedené markery, a to v jednom (329) až třech (217) následných odběrech se zhruba osmiměsíčním odstupem. Ze všech vzorků pak byly vyšetřeny počty CD4+ lymfocytů, hladina HIV RNA a markery infekce GBV-C/HGV.

10.1. Metodika

10.1.1. Laboratorní diagnostika protilátek anti-E2

Pro diagnostiku protilátek proti obalovému glykoproteinu E2 viru GBV-C/HGV jsme použili komerční soupravu od firmy Roche, která byla jediná na trhu. Byla však dostupná pouze v době první fáze výzkumu, protože se pro nezájem ze strany kliniků zcela přestala vyrábět.

Souprava obsahovala vše potřebné pro detekci protilátek metodou enzymové imunoanalýzy (ELISA, EIA), konkrétně dvoukrokové sendvičové metody využívající streptavidinem potažený povrch jamky mikrotitrační destičky a diagnostické biotinylované, anti E2 protilátky s navázaným, bivalentním rekombinantním GBV-C/HGV E2 antigenem. V prvním kroku se nechá inkubovat vzorek (sérum nebo plazma) s imobilizovaným antigenem, který je fixován v jamce prostřednictvím biotinylované diagnostické anti-E2 protilátky. Protilátky obsažené v séru se prostřednictvím bivalentního antigenu imobilizují na povrch jamky. Po promytí se přidá roztok se značenými protilátkami proti lidskému IgG, které interagují s vyšetřovanými protilátkami anti-E2. Po inkubaci a promytí se přidá roztok substrátu s chromogenem, díky kterému se - pokud jsou přidané protilátky navázány - objeví zbarvení. Absorbance se měří při vlnové délce 405 nm. Pozitivita či negativita se pak odvíjí od hodnoty cut-off, která se zjistí výpočtem s použitím dosažených hodnot absorbance pozitivní a negativní kontroly (příbalový leták k soupravě, ROCHE).

Hodnocení pro využití ve studii bylo semikvantitativní, podle následujících kritérií:

0 ... negativní

1 ... slabě pozitivní, hodnota absorbance od hodnoty cut-off do jeho dvojnásobné hodnoty

2 ... středně pozitivní, hodnota absorbance od dvojnásobné do čtyřnásobné hodnoty cut-off

3 ... silně pozitivní, hodnota absorbance větší než čtyřnásobná hodnota cut-off

10.1.2. Průkaz virémie GBV-C/HGV

Virémii GBV-C/HGV jsme zjišťovali průkazem virové nukleové kyseliny (RNA) v séru pomocí polymerázové řetězové reakce po předcházející reverzní transkripci (RT-PCR) námi vyvinutou „in house“ metodou.

Izolaci virové RNA z vyšetřovaných sér jsme prováděli dvěma způsoby. Buď extrakcí s následnou adsorpcí virové RNA na kolonkách QIAampViral RNA (QIAGEN), nebo extrakcí a purifikací pomocí paramagnetických částic (CHEMAGEN) na separačním automatu KingFisher. Pomocí druhého způsobu jsme získali stabilnější izoláty, a tak jsme tento způsob izolace virové RNA přednostně využívali.

Amplifikace purifikované GBV-C/HGV RNA probíhala dvoustupňově. V prvním kroku proběhla reverzní transkripce (RT), při které se vytvoří cDNA (copy DNA), řetězec komplementární k jednořetězcové virové RNA, s bezprostředně navazující preamplifikací (RT + 10 cyklů PCR) s teplotou annealingu 55°C. Teprve potom může proběhnout samotná polymerázová řetězová reakce (PCR). V našem případě proběhlo celkem 40 cyklů PCR při použití Taq polymerázy (INVITROGEN) s teplotou annealingu 50°C. Tento postup nebyl součástí žádné komerční soupravy, ale jednalo se o tzv. "in house" metodu.

Detekci amplifikované virové nukleové kyseliny jsme prováděli několika způsoby, aby byla zajištěna maximální citlivost a specifita. Jednak jsme pro přímou detekci využili elektroforézu, kdy jsme v 2% agarózovém gelu identifikovali přítomnost či nepřítomnost úseku nukleové kyseliny o známé délce amplikonu. Druhou detekční metodou byla hybridizace amplifikovaného produktu s inkorporovaným digoxigenin-uracilovým analogem thymidinu (ROCHE) pomocí biotinylované sondy na komerčně dodávaných streptavidinových destičkách (ROCHE). Princip je podobný jako klasická ELISA, Streptavidin váže biotin na oligonukleodové sondě, která je komplementární k řetězci amplifikovaného úseku virové nukleové kyseliny. Vizualizace je umožněna reakcí s antidigoxigeninovým konjugátem a chromogen-substrátem, který v případě pozitivitu vyvolá zabarvení vzorku, jehož absorbance se měří při vlnové délce 405 nm. Tato metoda je vysoce specifická a o dva řády citlivější než elektroforéza, tudíž jsme byli schopni zachytit i velmi nízké koncentrace GBV-C/HGV RNA. Rozdílná citlivost elektroforézy a hybridizace navíc umožnila semikvantitativní hodnocení:

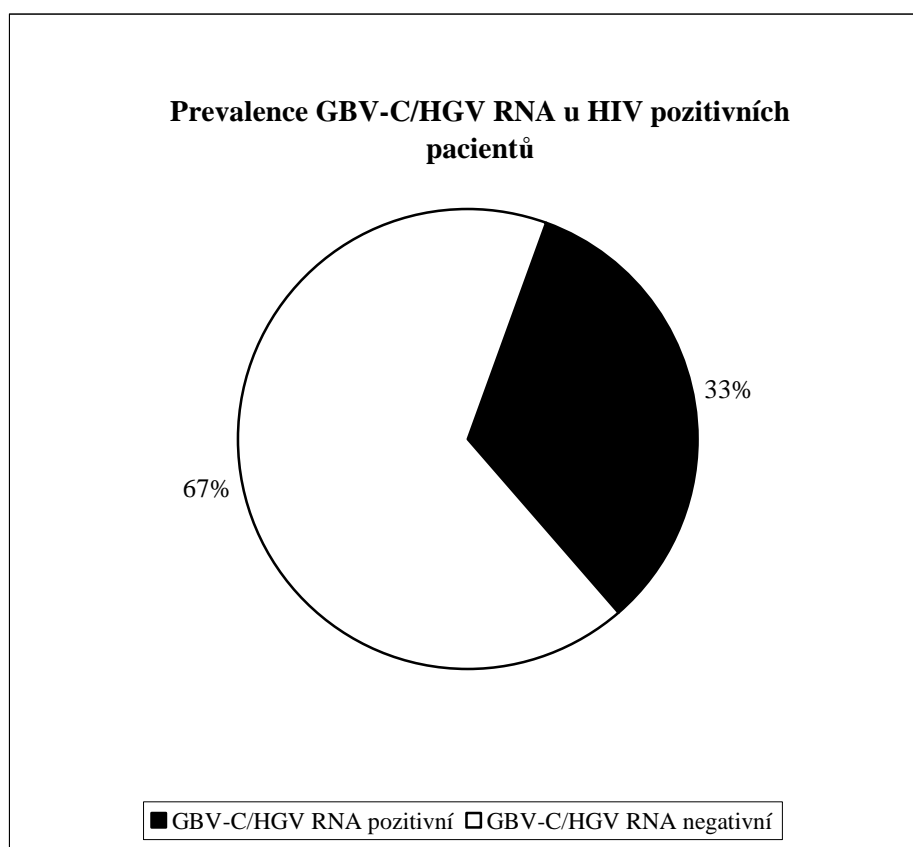
- 0 ... negativní (negativní nález jak v elektroforéze, tak v hybridizaci)
- 1 ... slabě pozitivní (negativní nález na elektroforéze, záchyt pouze citlivější hybridizací)
- 2 ... středně pozitivní (slabý proužek na elektroforéze, hodnoty absorbance mezi 0,1 a 1,0)
- 3 ... silně pozitivní (silný proužek na elektroforéze, absorbance větší než 1,0)

Během vyšetřování vzorků z výzkumu byl na našem pracovišti vyvinut i postup pro kvantitativní detekci GBV-C/HGV RNA, a to pomocí real-time PCR prováděné na Light cycleru (ROCHE). U 144 pozitivních vzorků jsme tak zjistili i hladinu virové RNA, nicméně míra virové nálože GBV-C/HGV ještě nebyla v první studii zahrnuta.

10.2. Výsledky a diskuse

10.2.1. *Prevalence GBV-C/HGV v ČR*

Ze sledované skupiny 329 HIV pozitivních pacientů byla při prvním z odběrů u 107 z nich (32,5%) zachycena GBV-C/HGV RNA. 123 (37,4%) pacientů pak mělo pozitivní protilátky proti obalovému glykoproteinu GBV-C/HGV E2, tedy známky dříve proběhlé infekce. V průběhu druhé fáze projektu pak byla prevalence virémie GBV-C/HGV u skupiny HIV pozitivních pacientů, rozšířené na 538, obdobná – 33,1%.

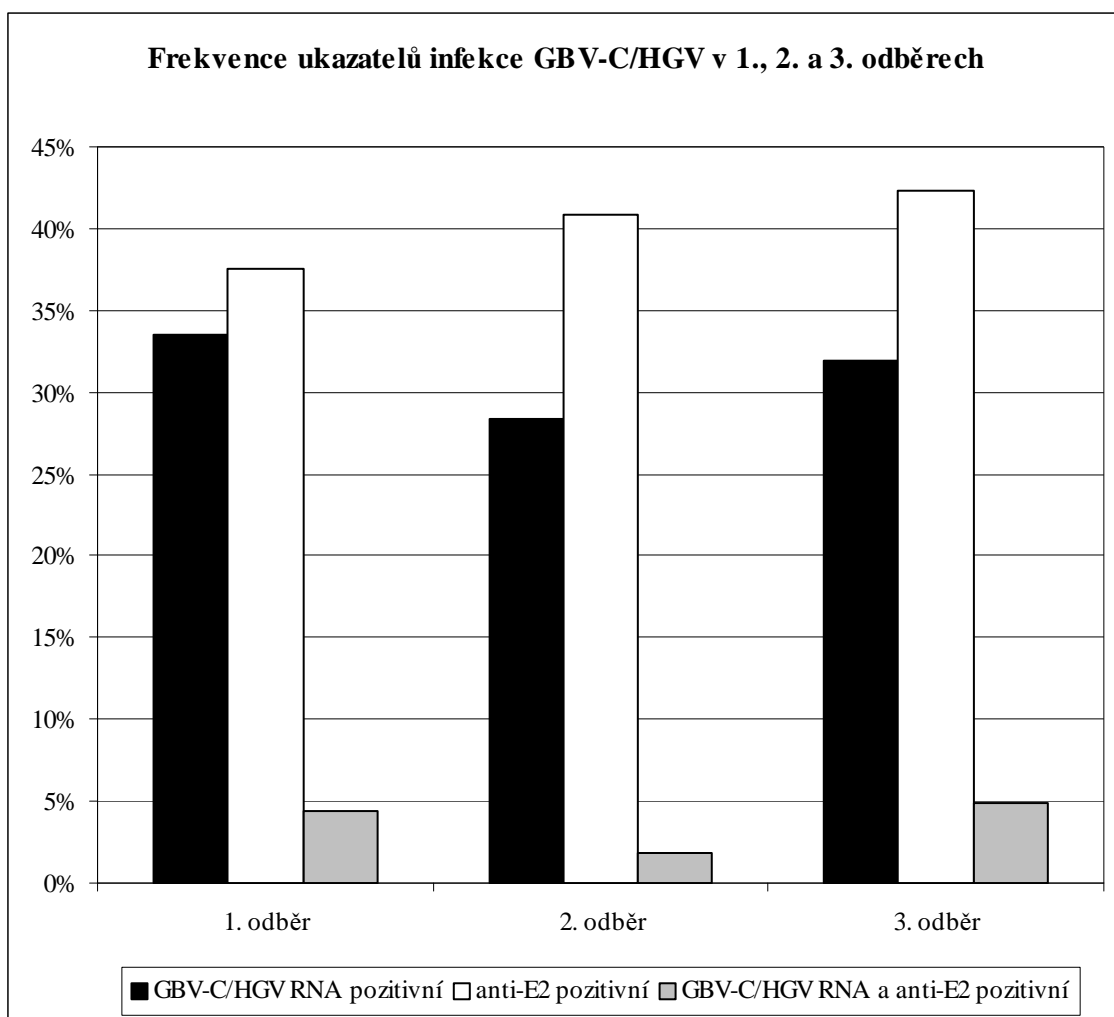


Graf č. 1 - Prevalence GBV-C/HGV RNA u HIV pozitivních pacientů

Při porovnání těchto výsledků s jinými zahraničními studii je patrné, že prevalence infekce GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů je v České republice

poměrně vysoká (Björkman et al., 2004; Canducci et al., 2003; Sheng et al., 2007; Souza et al., 2006; Tillmann et al., 2001; Xiang et al., 2001).

Ze srovnání výsledků jednotlivých odběrů je možné usuzovat na dynamiku GBV-C/HGV infekce. V průběhu času můžeme sledovat klesající procento pozitivit GBV-C/HGV RNA a zároveň narůstající množství pacientů s pozitivními protilátkami anti-E2. Z relativně nízkého nárůstu procenta HIV pozitivních pacientů s anamnestickými protilátkami (při třetím odběru to bylo 43,3%) pak můžeme usuzovat na pomalejší eliminaci viru z organismu. Ta je u HIV pozitivních pacientů pomalejší než u zdravé populace díky zhoršenému stavu jejich imunitního systému (Mohr & Stapleton, 2009), což se také prokázalo záchytem vyššího procenta jedinců, kteří měli současnou pozitivitu protilátek anti-E2 a GBV-C/HGV RNA (3,6%). V rámci zdravé populace se toto procento pohybuje okolo 0,6% (Aster et al., 2005).

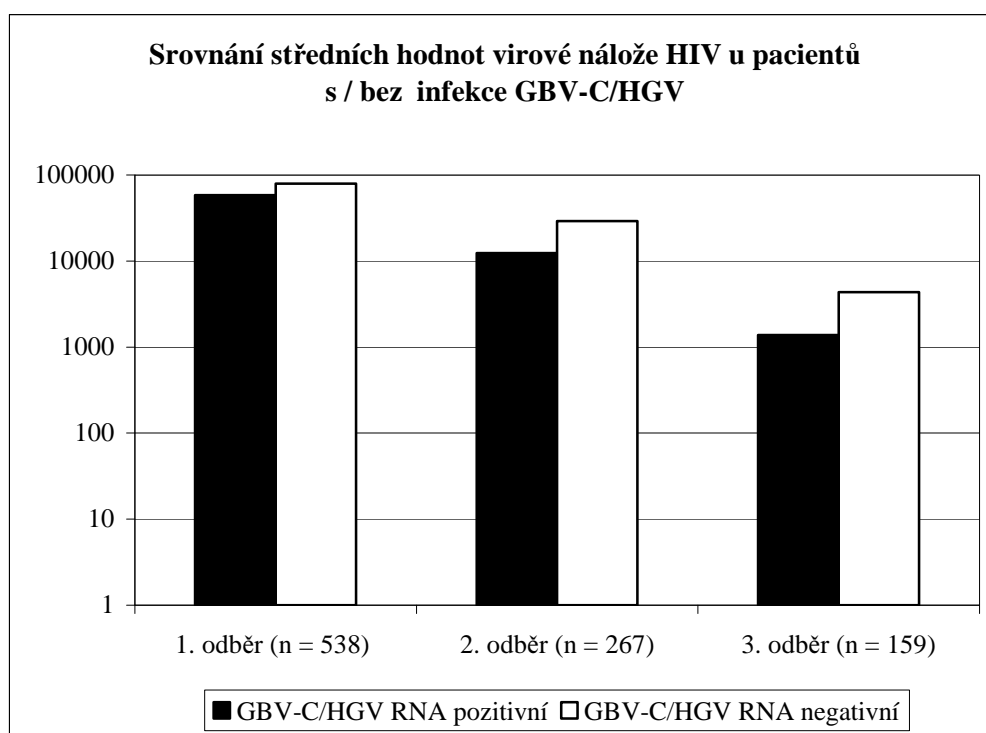


Graf č. 2 - Frekvence ukazatelů infekce GBV-C/HGV v 1., 2. a 3. odběrech

10.2.2. Vliv infekce GBV-C/HGV na virémii HIV

Někteří autoři udávají významný rozdíl v hladinách virémie HIV u GBV-C/HGV koinfikovaných pacientů a u těch bez GBV-C/HGV infekce (Alcalde et al., 2010). Sledování vlivu koinfekce GBV-C/HGV a HIV bylo i v zájmu studie MUDr. Astera. Ten rozdělil skupinu HIV pozitivních pacientů na pacienty s virémií HIV vyšší než 400 kopií/ml a na ty, u nichž virémie byla menší než 400 kopií/ml (v době prvních odběrů byla hladina 400 kopií/ml nejnižší detekovatelná). V rámci těchto dvou podskupin pak sledoval markery GBV-C/HGV infekce a jejich vztah k HIV virémii. Jako statisticky významnou pak neshledal jakoukoliv závislost virémie HIV na koinfekci GBV-C/HGV, a to jak u pacientů léčených HAART, tak u pacientů bez nasazené terapie.

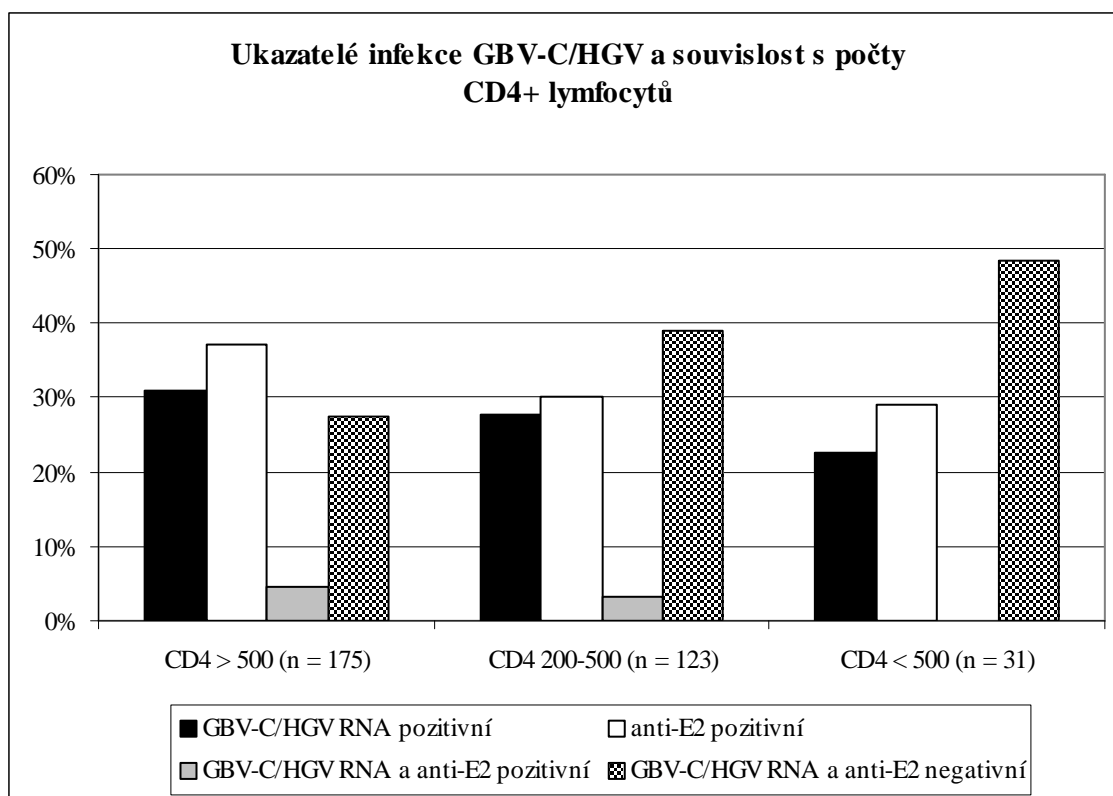
Za zmínku nicméně nepochybně stojí jistý vliv GBV-C/HGV koinfekce, ač statisticky nevýznamný - HIV pozitivní pacienti s aktivní GBV-C/HGV infekcí měli nižší střední hodnoty virových náloží HIV ve srovnání s pacienty bez virémie GBV-C/HGV a byla pozorována i určitá negativní korelační závislost výše virémie HIV na virémii GBV-C/HGV. Celkově však nelze říci, že by přítomnost GBV-C/HGV měla výraznější benefiční efekt pro HIV pozitivní pacienty s ohledem na výši virémie viru HIV.



Graf č. 3 - Srovnání středních hodnot virové nálože HIV u pacientů s / bez infekce GBV-C/HGV

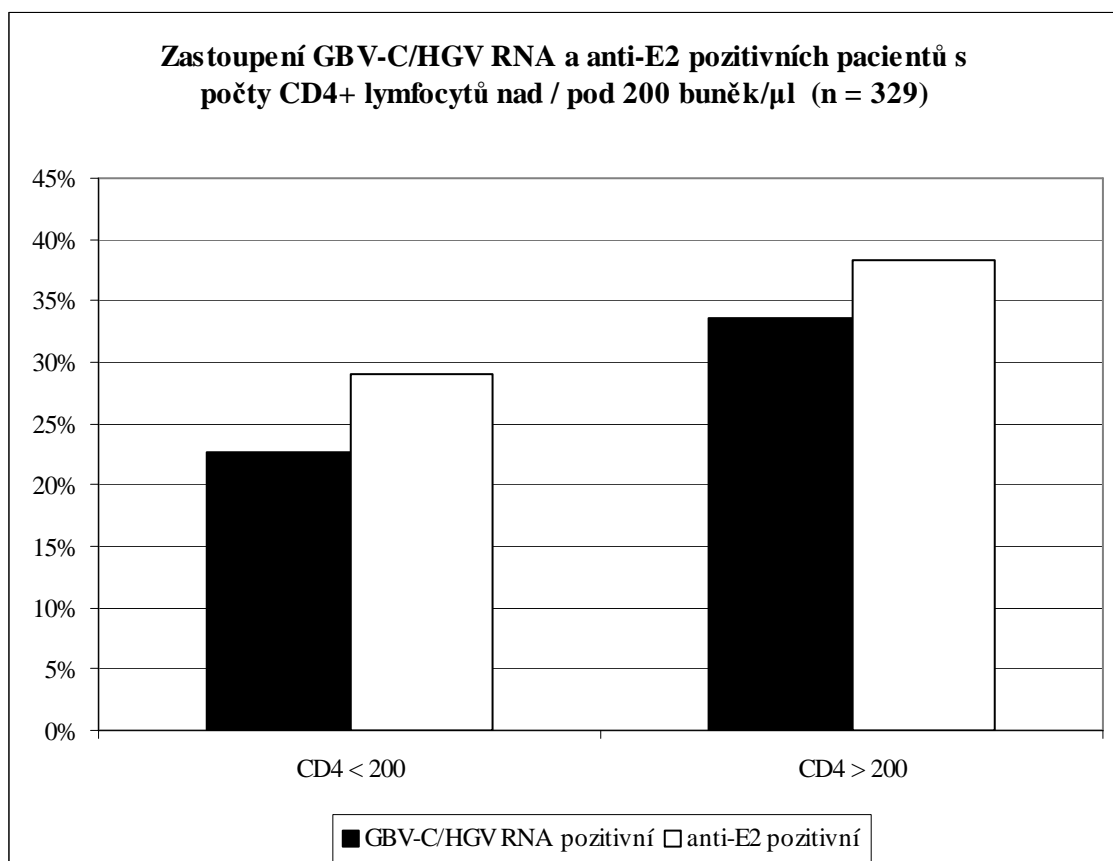
10.2.3. Vliv infekce GBV-C/HGV na počty CD4+ lymfocytů

Názory na vztah mezi infekcí GBV-C/HGV a počty CD4+ buněk se poměrně liší; existují jak studie, které potvrzují vyšší počty CD4+ buněk při současné virémii GBV-C/HGV (například Alcalde et al., 2010), tak i studie, které tento jev nepodporují (například Tillmann et al., 2001). Skupina 329 HIV pozitivních pacientů byla opět rozdělena do podskupin, tentokrát podle aktuálního stavu počtu CD4+ lymfocytů. Skupina 1 měla těchto buněk více než 500/μl, skupina 2 mezi 200 až 500 buňkami/μl a skupina 3 méně než 200 buněk/μl. Na základě porovnání procentuálního zastoupení GBV-C/HGV pozitivních pacientů a pacientů GBV-C/HGV negativních spolu s počty CD4+ buněk lze usuzovat na jistý trend – se snižujícími se počty CD4+ buněk ubývá i procento pozitivit markerů recentní i anamnestické infekce virem GBV-C/HGV. Například při srovnání frekvence osob s virémií GBV-C/HGV ve skupině s počty CD4+ lymfocytů většími než 500 buněk/μl se skupinou s hodnotami CD4+ lymfocytů nižšími než 200 buněk/μl byl téměř dvojnásobný rozdíl v zastoupení viremických pacientů (36,1% ve skupině s CD4+ nad 500 buněk/μl oproti 19,7% ve skupině s CD4+ pod 200 buněk/μl). Statisticky významný však tento jev nebyl.



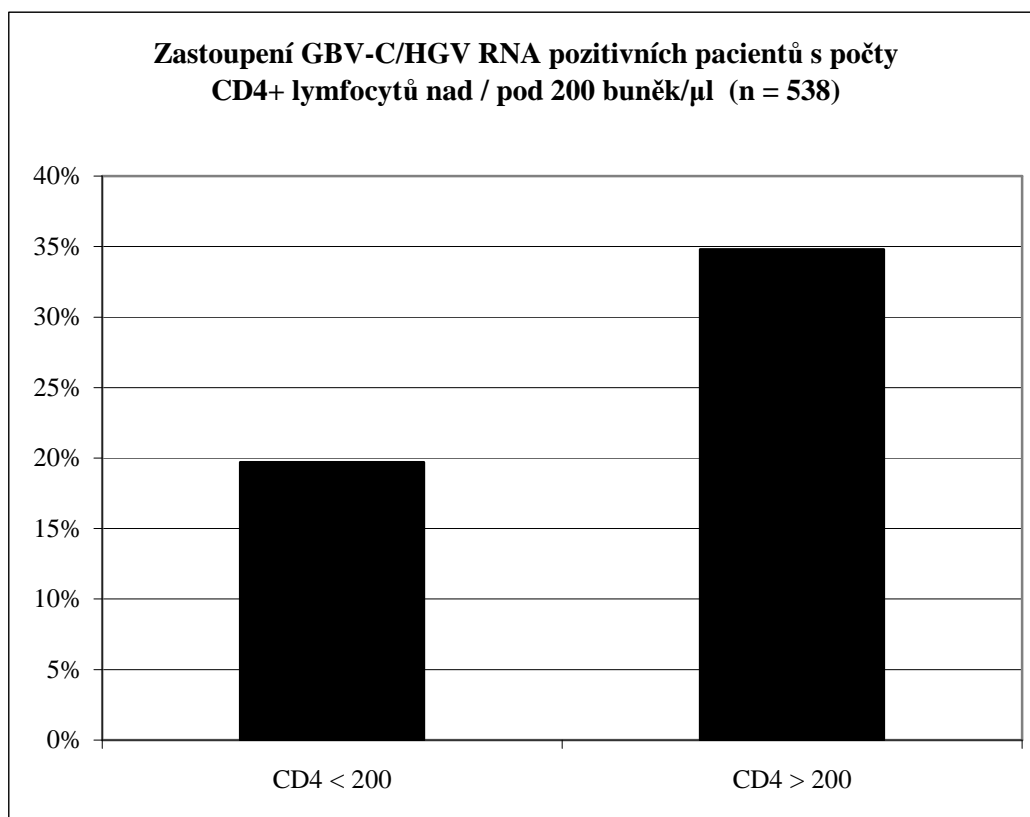
Graf č. 4 - Ukazatelé infekce GBV-C/HGV a souvislost s počty CD4+ lymfocytů

Až když byla skupina HIV pozitivních pacientů rozdělena pouze na dvě skupiny, a to s počty CD4+ buněk vyššími či nižšími než 200 buněk/ μ l, byla na hladině významnosti 5% prokázána pozitivní vazba mezi počtem CD4+ buněk a hladinou protilátek proti obalovému glykoproteinu GBV-C/HGV anti-E2. Také byla prokázána pozitivní ln závislost počtu CD4+ lymfocytů na virémii GBV-C/HGV ($p = 0,02$) i na přítomnosti protilátek anti-E2 ($p < 0,01$). Naopak nebyla zaznamenána žádná statisticky průkazná závislost mezi počty CD4+ buněk a virémií GBV-C/HGV. Jinými slovy to znamená, že ve skupině pacientů, kteří měli počty CD4+ lymfocytů vyšší než 200 buněk/ μ l, bylo statisticky průkazné vyšší procento těch, kteří měli pozitivní protilátky anti-E2. Tato závislost je ovšem logická, protože vyšší počty CD4+ lymfocytů odráží lepší stav buněčné složky imunitního systému těchto pacientů. Je ovšem otázkou, jak na tento výsledek pohlížet, protože z druhého úhlu pohledu může vypovídat o benefičním vlivu jak recentní, tak anamnestické infekce virem GBV-C/HGV na laboratorní ukazatele HIV infekce.



Graf č. 5 - Zastoupení GBV-C/HGV RNA a anti-E2 pozitivních pacientů s počty CD4+ lymfocytů nad / pod 200 buněk/ μ l (n = 329)

Stejné vyhodnocení pak proběhlo i v druhé fázi výzkumu s 538 HIV pozitivními pacienty, které potvrdilo - alespoň v rámci prvních odběrů - signifikantně vyšší frekvenci pacientů s GBV-C/HGV infekcí ve skupině pacientů s počty CD4+ lymfocytů většími než 200 buněk/ μ l. Dá se tedy říci, že se v naší skupině prokázala častější recentní infekce u pacientů s lepším stavem buněčné imunity.



Graf č. 6 - Zastoupení GBV-C/HGV RNA pozitivních pacientů s počty CD4+ lymfocytů nad / pod 200 buněk/ μ l (n = 538)

V dalších odběrech tento vliv nebyl patrný, možná i proto, že benefiční efekt byl zastíněn velmi efektivní léčbou HAART, kterou po prvních odběrech mělo nasazeno jen málo pacientů, a proto se u nich benefiční efekt GBV-C/HGV projevil.

10.2.4. Vliv infekce GBV-C/HGV a léčby HAART

Zajímavou myšlenkou tudíž byla možná souvislost mezi vlivem infekce GBV-C/HGV a vlivem léčby HAART. Proto se skupina pacientů rozdělila na ty s léčbou a na neléčené a obě skupiny byly podrobeny stejným analýzám jako předchozí soubor.

U neléčených pacientů se pak potvrdila statisticky významná pozitivní závislost ln počtu CD4+ lymfocytů a virémie GBV-C/HGV ($p = 0,03$), stejně jako protilátek anti-E2 ($p = 0,02$), zatímco u skupiny léčených pacientů to byla pouze závislost počtu CD4+ lymfocytů na přítomnosti protilátek ($p = 0,015$). MUDr. Aster považuje toto zjištění za jedno z nejzásadnějších, protože potvrzuje dominanci vlivu antiretrovirové terapie na stav HIV pozitivních pacientů.

K zodpovězení otázky, zda koinfekce virem GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů může nějakým způsobem ovlivnit rozhodnutí pro zahájení léčby HAART, se ještě sledovalo zastoupení viremických pacientů v jednotlivých odběrech v rámci skupin pacientů léčených a neléčených. V žádné skupině nebylo statisticky významné vyšší či nižší zastoupení pacientů s virémií GBV-C/HGV, nicméně u třetích odběrů bylo u pacientů bez nasazené léčby zjištěno vyšší procento viremických pacientů (21%) oproti aviremickým (9,3%), což může představovat jistý trend, který by mohl poukazovat na sníženou potřebu antiretrovirové léčby u koinfikovaných pacientů. Jelikož ale šlo pouze o náznak, který nebyl statisticky vyhodnocen jako průkazný, ve skutečnosti je tedy pravděpodobně doporučení léčby HAART totožné jak u pacientů bez infekce GBV-C/HGV, tak u pacientů koinfikovaných. Ani v tomto případě tedy nebyl benefit koinfekce GBV-C/HGV prokázán. Existují ale studie, které připisují význam společnému vlivu léčby HAART a koinfekce GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů. Voirin et al. (2002) uvádí při dlouhodobějším sledování koinfikovaných pacientů jednak rychlejší nárůst počtů CD4+ lymfocytů po nasazení léčby HAART a jednak jeho různou dobu trvání. U HIV pozitivních pacientů bez koinfekce GBV-C/HGV se po nasazení léčby počty CD4+ lymfocytů zvyšovaly pouze po dobu dvou let a pak byl nárůst jejich počtů zastaven. Naopak u pacientů s persistentní virémií GBV-C/HGV se počty CD4+ lymfocytů zvyšovaly ještě za čtyři roky po zahájení antiretrovirové terapie (Voirin et al., 2002).

10.2.5. Frekvence GBV-C/HGV RNA v souvislosti s klinickými stadii HIV pozitivních pacientů

HIV infikovaní pacienti jsou dle svého stavu zařazováni do skupin (A, B, C) lišících se klinickými projevy jejich onemocnění, zejména pak výskytem a charakterem oportunních infekcí, typických pro infekci virem HIV, respektive pro onemocnění AIDS:

- stadium A = stadium bez oportunní infekce
- stadium B = pacienti s anamnézou tzv. "malé oportunní infekce"
- stadium C = pacienti s přítomnou či anamnestickou tzv. "velkou oportunní infekcí"

Předchozí výsledky nepotvrdily závislost virémie HIV (ani jejího přirozeného logaritmu) na virémii GBV-C/HGV. Nicméně právě po rozdělení HIV pozitivních pacientů do výše zmíněných skupin dle klinického stadia, v jakém se nacházeli, se prokázala statisticky signifikantní závislost ln HIV virémie na přítomnosti protilátek proti obalovému glykoproteinu anti-E2 ($p = 0,014$) u skupiny pacientů nacházejících se v klinických stadiích A a C bez nasazené léčby HAART. Tato závislost však nebyla prokázána ani u skupiny pacientů v klinickém stadiu B, ani u HIV pozitivních pacientů jako celku. Stejně tak nebyla zaznamenána žádná závislost virémie HIV na virémii GBV-C/HGV. Toto zjištění tak nepodporuje teorie o možném kompetitivním působení obou virů, resp. virémie GBV-C/HGV a HIV *in vivo*, které podporují některé studie. Nicméně z uvedeného vyplývá jiná možná zajímavá myšlenka; zdá se, že by anamnestická infekce virem GBV-C/HGV mohla ovlivnit progresi onemocnění způsobené virem HIV. Tato myšlenka však již nebyla předmětem této studie, a tak nezbývá než ji ponechat k dalšímu pozdějšímu zkoumání.

10.2.6. Vliv GBV-C/HGV koinfekce na délku přežívání HIV pozitivních pacientů

Zůstává otázkou, jestli přítomnost GBV-C/HGV nějakým způsobem může ovlivnit délku přežívání HIV pozitivních pacientů. Pohledy jednotlivých vědců se různí; někteří tento vliv neprokazují, jiní poukazují na jistý trend v pozitivním vlivu viru GBV-C/HGV na délku přežívání pacientů, ale tyto výroky nemají statisticky podloženy, někteří autoři dospěli ke statisticky průkazným zjištěním (Björkmann et al., 2004, Kaye et al., 2005, Tillmann et al., 2001, Xiang et al., 2001). V rámci naší studované skupiny HIV pozitivních pacientů nakonec nebylo možné danou otázku vyhodnotit, jelikož úmrtí během let tohoto výzkumu bylo 30, z toho pouze 4 pacienti zemřeli v souvislosti s AIDS. To nepředstavuje reprezentativní počet pro statistickou analýzu a učinění nějakých závěrů vyžaduje delší dobu sledování.

11. ZÁVĚR

Virus GBV-C/HGV, zástupce rodu *Hepacivirus* z čeledi *Flaviviridae*, není v dnešní době spojován s žádným onemocněním oproti původním předpokladům, které jej spojovaly se vznikem zbývajících případů nevyjasněných potransfuzních hepatitid. Pravděpodobně díky stejným způsobům přenosu obou virů dochází často ke koinfekci GBV-C/HGV u HIV pozitivních osob a prevalence GBV-C/HGV v populaci HIV pozitivních pacientů je vyšší než u zdravých jedinců. Jelikož se navíc oba viry množí ve stejných typech buněk, GBV-C/HGV se tak stal předmětem zájmu různých studií, které se začaly zabývat otázkou možného benefičního efektu koinfekce virem GBV-C/HGV pro HIV pozitivní pacienty. *In vitro* byl skutečně prokázán inhibiční vliv viru GBV-C/HGV na replikaci viru HIV a následně byly objasněny některé mechanismy tohoto inhibičního působení. Byla provedena i celá řada studií, které hledaly tento benefiční efekt přímo u HIV pozitivních pacientů koinfikovaných GBV-C/HGV. Studie se zaměřily zejména na sledování vlivu GBV-C/HGV na délku přežívání pacientů, především na to, zda přítomnost GBV-C/HGV ovlivňuje hladiny diagnostických a prognostických markerů infekce HIV, což je hladina virémie HIV a počty CD4+ lymfocytů aj. Některé studie benefiční efekt koinfekce GBV-C/HGV a HIV potvrdily ve všech zmíněných aspektech, v jiných studiích naopak žádný benefiční efekt GBV-C/HGV pro HIV pozitivní pacienty nebyl zjištěn.

Výsledky popisované studie probíhající v České republice po dobu devíti let příliš přesvědčivě pro benefiční efekt koinfekce GBV-C/HGV a HIV nehovoří. Podařilo se zachytit spíše náznaky očekávaných trendů (snižující se virová nálož HIV v přítomnosti GBV-C/HGV, naopak zvyšující se počty CD4+ lymfocytů) benefičního efektu, nicméně statisticky průkazná byla jen malá část z nich a celkově se dá říci, že výsledky na benefiční efekt koinfekce GBV-C/HGV u HIV pozitivních pacientů nepoukazují.

Nicméně - jak už jsem zmínila výše - v pokusech *in vitro* byl jasně prokázán inhibiční vliv přítomnosti GBV-C/HGV na replikaci viru HIV. Z toho vyplývá, že nějaká souvislost mezi oběma viry existuje, přestože se zatím nepodařilo těchto poznatků využít. A i kdyby se nakonec nenašel očekávaný benefit, myslím si, že i tak má tento výzkum smysl. Už jenom proto, že díky hledání, sledování a analyzování souvislostí mezi dvěma viry v rámci koinfekce mohou být odhaleny různé kompetiční nebo inhibiční mechanismy mezi nimi, což nakonec může přispět k vývoji nových

podpůrných léků či dosud nezavedených přístupů k léčbě infekce virem HIV i bez toho, aby pacient musel být superinfikován jiným agens.

Výsledky studií zůstávají rozmanité a pro zjištění nových možného vlivu mezi viry GBV-C/HGV a HIV je potřeba další zkoumání, možná i sledování nových parametrů a jiných souvislostí.

12. SEZNAM LITERATURY

1. Alcalde R, Nishiya A, Casseb J, Inocencio L, Fonseca LA, Duarte AJ: Prevalence and distribution of the GBV-C/HGV among HIV-1-infected patients under anti-retroviral therapy. *Virus Res.* 2010 Aug;151(2): 148-52.
2. Aster V, König J, Staňková M, Rozsypal H, Procházka B: Prevalence of GBV-C/HGV (HGV) in HIV-infected patients and potential influence of co-infection on the course of the disease. *Klin mikrobiol inf lék* 2005; 11(6): 199-203.
3. Aster V, König J, Staňková M, Rozsypal H: Závěrečná zpráva o řešení programového projektu podpořeného IGA MZ ČR – Sledování vlivu koinfekce HGV na prognózu pacientů s infekcí HIV v letech 2003 až 2005. Grant IGA MZ ČR, č.: NI 7509-3.
4. Aster V, Staňková M, Machala L, König J: Závěrečná zpráva o řešení programového projektu podpořeného IGA MZ ČR – Nové souvislosti ve vztahu koinfekce HGV a prognózy pacientů s infekcí HIV. 2006 až 2009. Grant IGA MZ ČR, č.: NR-9288-3.
5. Baggio-Zappia GL, Hernandez Granato CF: HIV-GB virus co-infection: an overview. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(1): 12-9.
6. Björkman P, Flamholz L, Naucmér A, Molnegren V, Wallmark E, Widell A: GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *Aids* 2004; 18(6): 877-86.
7. Berzsényi MD, Bowden DS, Kelly HA, Watson KM, Mijch AM, Hammond RA, Crowe SM, Roberts SK: Reduction in hepatitis C-related liver disease associated with GB virus C in human immunodeficiency virus coinfection. *Gastroenterology.* 2007 Dec; 133(6): 1821-30.
8. Berzsényi MD, Bowden DS, Roberts SK: GB virus C: insights into co-infection. *J Clin Virol.* 2005 Aug;33(4): 257-66.
9. Berzsényi MD, Woollard DJ, McLean CA, Preiss S, Perreau VM, Beard MR, Bowden DS, Cowie BC, Li S, Mijch AM, Roberts SK: Down-regulation of intra-hepatic T-cell signaling associated with GB virus C in a HCV/HIV co-infected group with reduced liver disease. *J Hepatol.* 2011 Jan 22.
10. Canducci F, Uberti Foppa C, Boeri E, Racca S, Galotta G, Grasso MA, Calori G, Lazzarin A, Clementi M: Characterization of GBV-C infection in HIV-1 infected patients. *J Biol Regul Homeost Agens* 2003; 17(2): 191-4.
11. Chu C, Selwyn PA: Diagnosis and Initial Management of Acute HIV Infection. *Am Fam Physician.* 2010 May 15; 81(10): 1239-1244.
12. Giménez-Barcons M, Ribera M, Llano A, Clotet B, Esté JA, Martínez MA: Analysis of chemokine and cytokine expression in patients with HIV and GB virus type C coinfection. *Clin Infect Dis.* 2005 May 1; 40(9): 1342-9.

13. Handa A, Brown KE: GB virus C/hepatitis G virus replicates in human hematopoietic cells and vascular endothelial cells. *J Gen Virol.* 2000; 81(Pt 10): 2461-9.
14. Kaiser T, Tillmann HL: GB virus C infection: is there a clinical relevance for patients infected with the human immunodeficiency virus? *AIDS Rev* 2005; 7(1): 3-12.
15. Kaye S, Howard M, Alabi A, Hansmann A, Whittle H, Schim van der Loeff M: No observed effect of GB virus C coinfection on disease progression in a cohort of African woman infected with HIV-1 or HIV-2. *Clin Infect Dis* 2005; 40(6): 876-8.
16. Krejsek J, Kopecký O: *Klinická imunologie.* NUCLEUS HK, 2004.
17. Kumar R, Singla V, Kacharya S: Impact and management of hepatitis B and hepatitis C virus co-infection in HIV patients. *Trop Gastroenterol* 2008; 29(3): 136-47.
18. Linnen J, Wages J Jr., Zhang-Keck ZY et al: Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271(5248): 505-8.
19. Mohr EL, Stapleton JT: GB virus C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. *Journal of Viral Hepatitis*, 2009; 16, 757-768.
20. Mohr EL, Xiang J, McLinden JH, Kaufman TM, Chang Q, Montefiori DC, Klinzman D, Stapleton JT: GB virus type C envelope protein E2 elicits antibodies that react with a cellular antigen on HIV-1 particles and neutralize diverse HIV-1 isolates. *J Immunol.* 2010 Oct 1; 185(7): 4496-505. Epub 2010 Sep 8.
21. Moodie EE, Pant Pai N, Klein MB: Is antiretroviral therapy causing long-term liver damage? A comparative analysis of HIV-mono-infected and HIV/hepatitis C co-infected cohorts. *PLoS One* 2009; 4(2): e4517.
22. Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM: A previously unrecognized sixth genotype of GB virus C revealed by analysis of 5'-untranslated region sequences. *J Med Virol.* 2006 Jan; 78(1): 105-11.
23. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Attanasio M, Berger A, Doerr HW, Pomerantz RJ, Cacopardo B: Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann Intern Med.* 2003 Jul 1; 139(1): 26-30.
24. Operskalski EA, Kovacs A: HIV/HCV Co-infection: Pathogenesis, Clinical Complications, Treatment, and New Therapeutic Technologies. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2011 March; 8(1): 12-22.
25. Pérez-López S, Nieto-Suárez M, Mestres C, Alsina MA, Haro I, Vila-Romeu N: Behaviour of a peptide sequence from the GB virus C/hepatitis G virus E2 protein in Langmuir monolayers: its interaction with phospholipid membrane models. *Biophys Chem.* 2009; 141(2-3): 153-61.

26. Rambusch EG, Wedemeyer H, Tillmann HL, Heringlake S, Manns MP: Significance of coinfection with hepatitis G virus for chronic hepatitis C -- a review of the literature. *Z Gastroenterol.* 1998 Jan; 36(1): 41-53.
27. Rey D, Vidinic-Moularde J, Meyer P, Schmitt C, Fritsch S, Lang JM, Stoll-Keller F: High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA and antibodies in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(9): 721-4.
28. Schuval S, Lindsey JC, Stapleton JT et al.: GB virus C infection in children with perinatal human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24(5): 417-22.
29. Sheng WH, Hung CC, Wu RJ, Wang JT, Chen PJ, Chang SC, Kao JH: Clinical impact of GB virus C viremia on patients with HIV type 1 infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2007; 44(4): 584-90.
30. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK: Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995; 1(6): 564-9.
31. Souza IE, Zhang W, Diaz RS, Chaloner K, Klinzman D, Stapleton JT: Effect of GB virus C on response to antiretroviral therapy in HIV-infected Brazilians. *HIV Med.* 2006 Jan; 7(1): 25-31.
32. Stapleton JT: GB virus type C/Hepatitis G virus. *Semin Liver Dis* 2003; 23(2): 137-48.
33. Stapleton JT, Chaloner K, Zhang J, Klinzman D, Souza IE, Xiang J, Landay A, Fahey J, Pollard R, Mitsuyasu R: GBV-C viremia is associated with reduced CD4 expansion in HIV-infected people receiving HAART and interleukin-2 therapy. *AIDS.* 2009 Mar 13; 23(5): 605-10.
34. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, Goergen B, Detmer J, McMorrow M, Stoll M, Schmidt RE, Manns MP: Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2001 Sep 6; 345(10): 715-24.
35. Tucker TJ, Smuts HE: GBV-C/HGV genotypes: proposed nomenclature for genotypes 1-5. *J Med Virol.* 2000 Sep; 62(1): 82-3.
36. Van der Bij AK, Kloosterboer N, Prins M, Boeser-Nunnink B, Geskus RB, Lange JM, Coutinho RA, Schuitemaker H: GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study. *J Infect Dis.* 2005 Mar 1; 191(5): 678-85.
37. Voirin N, Trépo C, Estève J, Chevallier P, Ritter J, Fabry J, Vanhems P: Effects of coinfection with hepatitis C virus and GB virus C on CD4 cell count and HIV-RNA level among HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2002 Jul 26; 16(11): 1556-9.

38. Votava M., Černohorská L., Heroldová M., Holá V., Mejzlíková L., Ondrovčík P., Růžička F., Dvořáčková M., Woznicová V., Zahradníček O.: Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, 2003.
39. Xiang J, McLinden JH, Rydze RA, Chang Q, Kaufman TM, Klinzman D, Stapleton JT: Viruses within the Flaviviridae decrease CD4 expression and inhibit HIV replication in human CD4+ cells. *J Immunol.* 2009 Dec 15; 183(12): 7860-9.
40. Xiang J, Wüchmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, Stapleton JT: Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *N Engl J Med.* 2001 Sep 6; 345(10): 707-14.
41. Zanetti AR, Tanzi E, Romano L et al.: GBV-C/HGV: a new hepatitis-related virus. *Res Virol* 1997; 148(2): 119-22.
42. http://www.who.int/hiv/data/2009_global_summary.png (statistika HIV pozit. ve světě)
43. http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocni_zpravy/2009/Vyskyt_a_siren_i_HIV_AIDS_v_Ceske_republice_v_roce_2009.pdf (statistika HIV pozit. v ČR)