

## РАЗЛИЧНА АКТИВНОСТ НА ВИРУС ВК ПРИ НЕФРОЛИТИАЗА И ХРОНИЧНИ ВЪЗПАЛИТЕЛНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА БЪБРЕКА

З. Кълвачев<sup>1</sup>, С. Славов<sup>1</sup>, В. Владимиров<sup>2</sup> и П. Симеонов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория по молекулярна вирусология, Национален център по заразни и паразитни болести

<sup>2</sup>Клиника по урология, Медицински университет – София

<sup>3</sup>Клиника по нефрология, Медицински университет – София

## DIFFERENT BK VIRAL ACTIVITY IN NEPHROLITHIASIS AND CHRONIC INFLAMMATORY RENAL DISEASES

Z. Kalvachev<sup>1</sup>, S. Slavov<sup>1</sup>, V. Vladimirov<sup>2</sup> and P. Simeonov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Virology, National Center of Infectious and Parasitic Diseases – Sofia

<sup>2</sup>Clinic of Urology, Medical University – Sofia

<sup>3</sup>Clinic of Nephrology, Medical University – Sofia

<p><b>Резюме:</b></p> <p><b>Ключови думи:</b></p> <p><b>Адрес за кореспонденция:</b></p>	<p><i>Polyomavirus hominis 1</i>, по-известен като вирус ВК (BKV), персистира в клетките на урогениталния тракт без характерна симптоматика. При подходящ терен (имунологичен дисбаланс) BKV преминава в продуктивна форма на размножаване, което е свързано и с органна увреда. Това е силно изявено при бъбречно трансплантирани пациенти или други различни по тежест бъбречни заболявания. Ние проучихме активността на BKV инфекцията сред пациенти с бъбречнокаменна болест, различни хронични възпалителни процеси на бъбрека и бъбречна недостатъчност. Резултатите ни показват, че докато при литиазата реактивацията на вируса е сравнително ниска (6%), при възпалителните процеси тя е значително по-висока (26.7%). Най-вероятно хроничното възпалително засягане на бъбрека предлага подходящ терен за възникване на продуктивна BKV инфекция, която от своя страна утежнява протичането на основното заболяване.</p> <p>вирус ВК, BKV реактивация, нефролитиоза, пиелонефрит, гломерулонефрит</p> <p>Доц. д-р Зл. Кълвачев, дмн, Лаборатория по молекулярна вирусология, Национален център по заразни и паразитни болести, бул. „Столетов“ 44-А, 1233 София, тел. 931-07-13/232, e-mail: kalvachev@gmail.com</p>
<p><b>Summary:</b></p> <p><b>Key words:</b></p> <p><b>Address for correspondence:</b></p>	<p><i>Polyomavirus hominis 1</i>, widely known as BK (BKV), persists in the urogenital tract cells without any characteristic symptoms. Having its appropriate conditions (immunologic disbalance), BKV enters into productive form of replication related to organ injury. This is mostly pronounced in renal-allograft patients or other severe renal disorders. We examined the activity of BKV infection among patients with lithiasis, different renal diseases and renal insufficiency. Our results show that while the lithiasis reveals little percentage of viral reactivation (6%), the inflammatory processes exhibit much higher values (26.7%). Most probably the chronic involvement of the kidney tissues offers the appropriate “area” for productive BKV infection, which worsens the main condition.</p> <p>virus BK, BKV, reactivation, nephrolithiasis, pyelonephritis, glomerulonephritis</p> <p>Assoc. Prof. Zl. Kalvachev, M.D., Ph.D., Laboratory of Molecular Virology, National Center of Infectious and Parasitic Diseases, 44-A, Stoletov Blvd., Bg – 1233 Sofia, tel. +359 2 931-07-13, ext. 232, e-mail: kalvachev@gmail.com</p>

## ВЪВЕДЕНИЕ

*Polyomavirus hominis 1* (вирус ВК, ВКV) е широко разпространен сред човешката популация [6]. Първоначалната инфекция протича в ранна детска възраст, най-често под формата на леко респираторно неразположение. След нея ВКV остава в латентно състояние в епителните клетки на пикочните пътища и бъбреците. Реактивация на ВКV и продуктивна инфекция с увреждане на подлежащата тъкан се откриват предимно при пациенти с нарушени имунни механизми, в резултат на което се развиват различни бъбречни заболявания. Най-засегнати са пациентите с бъбречни трансплантации, при които усилената вирусна екскреция е свързана с развитие на тубулоинтерстициален нефрит, водещ до органна дисфункция и отхвърляне на присадения бъбрек [5, 7]. В същото време активността и значението на ВКV реактивацията сред пациентите с други бъбречни заболявания са слабо проучени.

Нашата цел е да се изяснят степента и значението на реактивирания ВКV инфекция при пациенти с бъбречнокаменна болест и неспецифични хронични и възпалителни заболявания на бъбрека (пиелонефрити, гломерулонефрити) и бъбречна недостатъчност.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### Групи пациенти

За период от два месеца (VI. 2007–VIII. 2007) бяха сформирани и изследвани за ВКV реактивация две групи пациенти: а) 32 пациенти (32 уринни проби) с бъбречнокаменна болест и различни усложнения: хематурия; пиурия; дизурия, на средна възраст 49.7 г., и б) 30 пациенти (30 проби) с хронични възпалителни бъбречни заболявания (пиелонефрит, гломерулонефрит) и бъбречна недостатъчност, на средна възраст 48.5 г. Предпочитана бе втора сутрешна урина, транспортирана в 50 ml контейнери (Biologix, Res. Co., USA), снабдени с по 5 ml консервант, предотвратяващ бактериалния растеж [1]. При доставянето им, те бяха центрофугирани за 10 мин при 1500 rpm за отделяне на уринен седимент [4]. При невъзможност за бързото му изследване той бе съхраняван на  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### ДНК екстракция

Екстракцията на ДНК от уринния седимент бе извършвана по стандартен фенол/хлороформен/изоамилов алкохол-метод (25:24:1; vol/vol), след инкубиране с протеиназа К за 2 h на водна баня при постоянна температура от  $60^{\circ}\text{C}$ . Преципитацията ѝ бе извършвана с абсолютен ал-

кохол и центрофугиране за 30 min (13 400 rpm). Получените пелети бяха рехидратирани в 50  $\mu\text{l}$  дейонизирана вода и концентрацията на ДНК бе измерена спектрофотометрично (Eppendorf, Bio Photometer).

### PCR детекция на ВКV

За откриването на ВК полиомавирусни секвенции в урината бе проведен PCR с праймерната двойка ВК-1/ВК-2: (**ВК-1**) 5'-ATC CAG CCT TTC CTT CCA TT-3' (nt 2992-3011) и (**ВК-2**) 5'-CTG TCC CTA AAA ACC TGC CAA-3' (nt 3090-3211), заграждащи регион от 218 bp в гена, кодиращ големия Т-антиген [3]. Реакцията бе провеждана в краен обем от 50  $\mu\text{l}$  при следните условия: реакционен буфер в крайна концентрация 1X (750 mM Tris-HCl/pH = 8.8; KCl; 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.1% v/v Tween 20), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  (ABgene), по 200  $\mu\text{M}$  от всеки дезоксирибонуклеотид (dATP; dGTP; dCTP и dTTP), 1.25 U Taq ДНК полимераза (Invitrogen, USA). Праймерите бяха прибавяни в крайна концентрация от 600 nM за всеки, а изследваната ДНК бе по 5  $\mu\text{l}$  (~5 ng). Работният протокол протичаше в следните етапи: начална денатурация на  $94^{\circ}\text{C}$  за 5 min, последвана от 40 цикъла от  $94^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$ ,  $60^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$  и  $72^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$ . Краят се състоеше от стъпка на елонгация на  $72^{\circ}\text{C}$  за 10 min. Всички реакции бяха провеждани в специализирана апаратура – минисайкълър PTC-150 (MJ Research, USA). Последният етап на процеса включваше електрофоретично разделяне на продуктите от реакцията. За целта 20  $\mu\text{l}$  ампликон бяха смесвани с 4  $\mu\text{l}$  лоудинг буфер и фракционирани заедно със 100 bp молекулярен маркер (Invitrogen, USA) на 2% агарозен гел с етидиев бромид. Във всички реакции бяха включвани подходящите положителни и отрицателни контроли.

### Статистически анализ

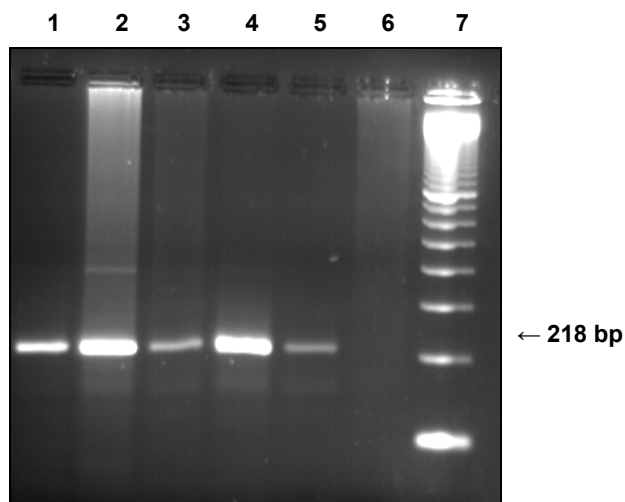
Пресмятането на различните честоти, средните стойности на данните и сравненията на резултатите между групите пациенти бяха извършвани със специализирания статистически софтуер SPSS 4 (SPSS Inc.).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Пациентите бяха разделени в две групи в зависимост от клиничното им състояние. Първата включваше 33 пациенти с бъбречнокаменна болест, като при преглеждането на епикризите бяха наблюдавани следните усложнения: в най-голям процент бе хематурията ( $n = 17/33$ ; 51.6%), следвана от пиурия ( $n = 9/33$ ; 27.3%) и

дизурия (n = 7/33; 21.2%). Средната възраст бе 49.7 г. Другата група бе съставена от пациенти с хронични възпалителни заболявания на бъбреците, разпределени, както следва: пиелонефрит (n = 12/30; 40%), гломерулонефрит (n = 15/30; 50%) и бъбречна недостатъчност (n = 3/30; 10%). Тяхната средна възраст бе 48.5 г. И двете групи бяха подложени на сложни терапевтични схеми, трудни за класифициране, вземани под внимание единствено при интерпретацията на резултатите.

След провеждане на PCR реакцията с праймерната двойка ВК-1/ВК-2 при положителните проби бяха наблюдавани силни амплификационни сигнали, съответстващи по големина на ВКV контрола. Не бе отчетена неспецифична амплификация или вътрешна инхибиция на PCR системата. Резултатите след фракционирането на ампликоните на агарозна гел-електрофореза са представени на фиг. 1. Те показваха, че екскрецията на ВКV при пациентите с бъбречнокаменна болест е 6% (n = 2/33), докато при тези с хронични възпалителни процеси – 26.7% (n = 8/30).



1 – положителна ВКV контрола; 2, 3, 4 – ВКV положителни проби от пациенти с хронични бъбречни заболявания; 5 – положителна проба на пациент с нефролитиоза; 6 – Отрицателна ВКV контрола; 7 – молекулярен маркер от 100 bp (Invitrogen, USA). Големина на ампликона 218 bp

Фиг. 1. Агарозна гел електрофореза на амплификационните PCR продукти с праймерната двойка ВК-1/ВК-2

Изследваните от нас групи пациенти показват съществени вариации в екскрецията на ВКV – в групата с бъбречнокаменна болест тя е 6%, а при другата – значително по-висока 26.7%, като процентът е статистически значим (P = 0.01). Разликите, от една страна, могат да се обяснят с особености на пробовземането,

колебания на вирурията при отделните пациенти и пр. От друга страна, е доказано, че ВКV не само се активира в по-голяма степен, но и задълбочава клиничния ход на прогресивни хронично протичащи заболявания на урогениталния тракт [6]. Такива се откриват при втората изследвана група (пиелонефрит; гломерулонефрит, бъбречна недостатъчност). Те са пряко свързани с функционално увреждане на бъбрека, което най-вероятно отключва подходящ терен за активна вирусна репликация. Непрекъснатата вирусна екскреция, от друга страна, най-вероятно допринася за допълнителното задълбочаване на развитите болестни процеси [2].

Може да се направи изводът, че макар и тежко заболяване, бъбречнокаменната болест не води до значима ВКV реактивация. Най-вероятно, хронично протичащи бъбречни възпаления, като пиелонефрит, гломерулонефрит и бъбречна недостатъчност, предлагат по-подходящ терен за активация на ВКV, от една страна, най-вероятно благодарение на хроничното увреждане на бъбречните тъкани. От друга страна, увредената тъкан със своята бърза пролиферативна способност на уротелните клетки предоставя допълнителен потенциал за активиране на инфекцията, което задълбочава болестната ситуация и с което най-вероятно се обяснява повишеният процент на вирурията при такива пациенти.

#### Библиография

1. D h u n d e e , J. et H. Rigby. Comparison of two preparatory techniques for urine cytology. – J. Clin. Pathol., 43, 1990, 1034-1035.
2. H i r s c h , H. H. et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation. Polyomaviruses and human diseases. – In: Eureka Bioscience Collectionp 2005. www.eureka.com.
3. K a l v a t h c e v , Z., S. Slavov, A. Petrova, P. Simeonov et L. Hristova. Detection of human polyomavirus BK (BKV) in Bulgarian adult kidney transplant recipients by polymerase chain reaction. – Biotechnol. Biotechnol. Eq., 21, 2007, № 3, 335-337.
4. K o s s , L. Indications, collection and laboratory processing of cytologic samples. – In: Diagnostic Cytology of the Urinary Tract. L. Koss (Ed.). New York, Lippincott-Raven, 1995, 3-15.
5. P a h a r i , A. et L. Rees. BK associated renal problems – clinical implications. – Pediatr. Nephrol., 18, 2003, 743-748.
6. R e p l o e g , M. E., G. A. Storch et D. B. Clifford. BK virus: a clinical review. – Clin. Infect. Dis., 33, 2001, 191-202.
7. S l a v o v , S. et Z. Kalvathev. Molecular virology and clinical aspects of the human polyomavirus BK infection. – Biotechnol. Biotechnol. Eq., 20, 2006, 9-16.

Постъпила за печат на 5 ноември 2008 г.