

# Endemska nefropatija

---

Ilijanić, Helena

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:676225>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Helena Ilijanić

**ENDEMSKA NEFROPATIJA**

Završni rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Helena Ilijanić

**ENDEMSKA NEFROPATIJA**

Završni rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Hrvoje Jakovac, dr. med.

Završni rad obranjen je dana 20.9.2022. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Zlatko Trobonjača, dr. med.
2. Izv. prof. dr. sc. Lara Batičić, dipl. sanit. ing.
3. Prof. dr. sc. Hrvoje Jakovac, dr. med.

Rad ima 38 stranica, 7 slika, 88 literaturnih navoda.

# SADRŽAJ

SAŽETAK.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
SUMMARY .....	III
1. UVOD .....	1
2. EPIDEMIOLOGIJA .....	3
3. ETIOLOGIJA.....	7
3. 1. Aristolohična kiselina.....	17
3. 2. Vučja stopa ( <i>Aristolochia clematitis</i> L.) .....	20
4. PATOFIZIOLOGIJA I PATOLOGIJA .....	22
5. KLINIČKA SLIKA I LIJEČENJE.....	26
6. ZAKLJUČAK .....	28
7. LITERATURA.....	29
8. ŽIVOTOPIS .....	38

## SAŽETAK

Endemska nefropatija kronična je tubulointersticijska bolest s latentnim početkom i sporim napredovanjem do završnog stadija bubrežne bolesti. Pogađa podjednako muškarce i žene koji žive u određenim endemskim ruralnim mjestima smještenih oko pritoka Dunava u Rumunjskoj, Bugarskoj, Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Kosovu i Srbiji. Procjenjuje se da je gotovo sto tisuća ljudi u opasnosti za razvoj bolesti dok trenutno ima više od dvadeset pet tisuća oboljelih, a prevalencija iznosi oko 2 – 5 %. Prirodni tijek bolesti karakteriziraju dugo razdoblje inkubacije, nespecifični i teško prepoznatljivi klinički znakovi i simptomi te visoka incidencija za razvoj zloćudnog tumora prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava s učestalosti čak do 50 %. Naglašeno obilježje obuhvaća obiteljski obrazac u združenim kućanstvima u kojim nekoliko članova istog domaćinstva, koji nisu nužno u krvnom srodstvu, mogu razviti bolest. Tijekom godina predložen je veliki broj potencijalnih etioloških čimbenika od kojih je većina bila opovrgnuta. Glavni okolišni uzročnik nefropatije i urotelijalnog karcinoma je kronično trovanje aristolohičnom kiselinom koja se nalazi u sjemenkama biljke vučje stope (*Aristolochia clematitis* L.). Specifični biomarkeri koji služe za procjenu izloženosti kancerogenoj i nefrotoksičnoj aristoholičnoj kiselinu su aristolaktamski DNA adukti detektirani u bubrežnom tkivu i karcinomima urinarnog trakta. Također induciraju specifične mutacije u tumor supresorskom genu p53 koji će dalje utjecati na faze kancerogeneze. Genetska predispozicija ugroženih pojedinaca ima sekundarnu ulogu kao endogeni etiološki čimbenik. Danas postoje jednostavne mjere za kontroliranje i smanjenje rasta vučje stope s ciljem sprječavanja ili eliminiranja kontaminacije aristolohične kiseline.

Ključne riječi: endemska nefropatija, urotelijalni karcinom, žuta vučja stopa, aristolohična kiselina, DNA adukti

## SUMMARY

Endemic nephropathy is a chronic tubulointerstitial disease with a latent onset and slow progression to end-stage renal disease. It affects both men and women living in certain endemic rural areas located around the tributaries of the Danube in Romania, Bulgaria, Croatia, Bosnia and Herzegovina, Kosovo and Serbia. It is estimated that almost one hundred thousand people are at risk of developing the disease, while there are currently more than twenty-five thousand patients, and the prevalence is about 2-5 %. The natural course of the disease is characterized by a long incubation period, nonspecific and difficult to recognize clinical signs and symptoms, and a high incidence of the development of a malignant tumor of the transitional epithelium of the upper part of the urinary tract with a frequency of up to 50 %. The highlighted feature includes a family pattern in conjoined households in which several members of the same household who are not necessarily related by blood can develop the disease. Over the years, a large number of potential etiological factors have been proposed, most of which have been disproved. The main environmental cause of nephropathy and urothelial carcinoma is chronic poisoning with aristolochic acid, which is found in the seeds of the birthwort plant (*Aristolochia clematitis* L.). Specific biomarkers used to assess exposure to carcinogenic and nephrotoxic aristolochic acid are aristolactam DNA adducts detected in kidney tissue and urinary tract cancers. They also induce specific mutations in the p53 tumor suppressor gene that will further affect the stages of carcinogenesis. The genetic predisposition of vulnerable individuals has a secondary role as an endogenous etiological factor. Today, there are simple measures to control and reduce the growth of birthwort with the aim of preventing or eliminating aristolochic acid contamination.

Keywords: endemic nephropathy, urothelial carcinoma, birthwort, aristolochic acid, DNA adducts

## 1. UVOD

Endemska nefropatija je tubulointersticijska bolest bubrega s kroničnim karakterom koju karakterizira podmukli početak i postupna progresija do terminalnog to jest petog stadija zatajenja bubrega čiji su prvi slučajevi opisani prije više od šezdeset godina u Bugarskoj. Godinu dana kasnije prijavljena je bubrežna bolest s gotovo jednakim epidemiološkim i kliničkim karakteristikama u Srbiji, dok je 1961. godine također utvrđeno da je slična nefropatija prevladavala u Rumunjskoj (1).

Početak 1990-ih u belgijskoj klinici skupina pacijentica uzimala je tablete za mršavljenje koje su sadržavale ekstrakte korijena kineskog bilja te su oboljele od brzo progresivnog tubulointersticijskog nefritisa i fibroze što je u konačnici dovelo do krajnjeg stadija bubrežne bolesti (2). Ova patologija je isprva bila poznata kao kineska biljna nefropatija zbog podrijetla tableta za mršavljenje. Pokazala je velike kliničke i histopatološke sličnosti s kroničnom intersticijskom bolešću bubrega koja je prvobitno prijavljena 1950-ih te je bila viđena samo na području Balkana u jugoistočnoj Europi i zbog toga bila nazvana balkanska endemska nefropatija (3). Kasnije su istraživanja otkrila da je upravo kemijski spoj aristolohična kiselina, koja se obično nalazi u nekim biljkama porodice *Aristolochiaceae*, nefrotoksični agens kod obje patologije (4). Potonja nefropatija nastala je zbog posljedice slučajne zamjene korijena bezopasne biljke *Stephania tetrandra* s *Aristolochia fangchi*, koja je posjedovala ranije navedeni nefrotoksični sastojak (5).

Balkanska endemska nefropatija najčešći je rezultat izloženosti toksičnoj kiselini sadržanoj u sjemenu kod više vrsta biljaka iz roda *Aristolochia*, a posebice u sjemenkama Žute vučje stope (*Aristolochia clematitis* L.). To je korov koji obilno raste na balkanskim livadama i usjevima, a može se dogoditi da se pomiješa sa žitaricama tijekom žetve te tako kontaminira naknadno proizvedene pšenične proizvode za konzamaciju (6). Nakon što je aristolohična kiselina identificirana kao uobičajeni okolišni čimbenik kineske biljne nefropatije i endemske nefropatije, svaka buduća bubrežna bolest nakon izlaganja toj kiselini može se generalizirano opisati kao nefropatija aristolohične kiseline.



Za razliku od klasične prezentacije nefropatije koju karakterizira rapidni gubitak funkcionalnosti bubrega od šest mjeseci do dvije godine, endemska nefropatija polako napreduje čak više od dvadeset godina (7). Visoka stopa prevalencije endemske nefropatije pogađa stanovnike koji trenutno žive ili su nekad živjeli u ruralnim poljoprivrednim selima smještenih duž pritoka rijeke Dunav u Bugarskoj, Rumunjskoj, Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj, Kosovu i Srbiji (8).

Karakteristične značajke bolesti su dugo latentno razdoblje prije razvoja bolesti, njezina endemska priroda i izuzetno visoka korelacija s karcinomom prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava koji je uvjetovan od strane endemske nefropatije ili koji se manifestira u rizičnoj populaciji (1).

## 2. EPIDEMIOLOGIJA

Otkako su prvi slučajevi balkanske endemske nefropatije prijavljeni 50-ih godina prošlog stoljeća u ruralnim područjima smještenim u dolinama Dunava jugoistočne Europe, geografska distribucija spomenute nefropatije ostala je iznenađujuće konstantna. Procjenjuje se da je gotovo sto tisuća ljudi pod rizikom za razvoj nefropatije dok najmanje dvadeset pet tisuća osoba trenutno ima bolest na području Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Rumunjske, Bugarske, Kosova i Srbije (9,10).

Obuhvaćeno endemsko područje rasprostire se na otprilike dvadeset tisuća kvadratnih kilometara, svojim većim dijelom od grada Vratza u Bugarskoj do Slavenskog Broda u Hrvatskoj s udaljenosti od preko petsto kilometara, a manjim dijelom od zapadne Rumunjske do općine Vitina na Kosovu s duljinom od otprilike tristo kilometara. Endemska nefropatija se ne širi izvan svojih definiranih žarišta već je ona mozaično raspoređena uz to što je najviše zahvaćen dio središnje Srbije (11). Osim u pogođenim regijama prikazanim na slici 1, sporadični slučajevi endemske nefropatije također su pronađeni i u drugim neendemičnim regijama (12). Bolest pokazuje žarišnu pojavu u nekim, ali ne u svim selima iako se nalaze u endemskom području, premda neke dijeli samo nekoliko kilometara od najzahvaćenijih mjesta. Štoviše, unutar istog sela pogođena domaćinstva često žive u neposrednoj blizini pošteđenih (8,9,13).

Jedno od najuočljivijih obilježja jest obiteljski, ali ne i naslijeđeni distributivni obrazac u združenim kućanstvima. Naslijeđeni obrazac bolesti isključen je zbog činjenice da bolest često zahvati nekoliko članova istog kućanstva jedne ili više generacija, ali koji nisu nužno u krvnom srodstvu (14).

Postoje brojni izazovi koji kompliciraju evaluaciju epidemioloških izvješća endemske nefropatije, a takav nedostatak ažurnih visokokvalitetnih medicinskih podataka uglavnom je rezultat različitih dijagnostičkih kriterija te ograničene svijesti o dotičnoj bolesti. Zasad ostaje nepoznanica o trenutačnom trendu incidencije i prevalencije specifičnima za pojedinu endemičnu zemlju, dakle može se govoriti samo o procjeni statističkih pokazatelja (15).

Procijenjena prevalencija tijekom zadnjih godina smanjeno se kreće od 2 do 5 % (14), dok je prije trideset godina bila nešto viša – između 2 i 10 % (16). Prilično širok raspon varijacija uvelike ovisi

o točnoj regiji i državi u kojoj su prikupljene informacije. Tako oboljeli u Srbiji prosječno čine 6,5 % pacijenata koji su na dijalizi (1), dok u nekim dijelovima Bosne i Hercegovine oko 10 % bolesnika na hemodijalizi ima terminalno zatajenje bubrega. Smatra se da bi prevalencija kod primjene dubljeg probira sumnjivih slučajeva u rizičnim populacijama iznosila čak do 20 %, a učestalost karcinoma prijelaznog epitela gotovo 50 % (17).

Upečatljivo je opažanje da su gotovo svi oboljeli bili dio ruralnog poljoprivrednog stanovništva, dok je autohtono urbano stanovništvo većih gradova izuzeto. Tijekom početnog proučavanja endemske nefropatije bolest je dijagnosticirana već kod tridesetogodišnjih pacijenata, a kasnije je došlo do očitog pomaka manifestacije prema starijoj dobi, pri čemu je manjina identificiranih osoba imala ispod šezdeset godina. Dijagnoza kliničkih oblika kod adolescenata bila je rijetko potvrđena prije njihove dvadesete godine, a kod djece nijedno ispitivanje nije dokazalo mogućnost obolijevanja što ukazuje da je za razbolijevanje potrebna podložnost okolišnom agensu tijekom dugog razdoblja (11).

U Hrvatskoj prosječna dob umrlih od balkanske endemske nefropatije u 1950-ima bila je 45,1 godina, a u 1990-ima 69,2, slična u odnosu na očekivani životni vijek opće populacije (18). Unutar petnaest godina u najpogođenijem žarištu Srbije, prosječna stopa smrtnosti od nefropatije iznosila je 3,3 ‰ (11), a specifična smrtnost od urotelijalnog karcinoma bila je pedeset pet puta veća u rizičnoj regiji Hrvatske nego u drugim dijelovima zemlje. Istodobno, podudarnost je nađena u Srbiji, ali i drugim endemskim državama (14).

S obzirom na stopu mortaliteta i incidenciju bolesti, nema razlike među spolovima iako su neki autori oprečno tvrdili blagu predominaciju žena, ali to bi mogla biti posljedica nepouzdanih dijagnostičkih kriterija i metodologije (11). Između ostalog, ne postoji rizik kod vjerskih ili etničkih razlika, a ujedno rani odlazak iz endemskog žarišta može spriječiti pobol. Imigriranje predstavlja opasnost od nastanka bolesti pod uvjetom da je izloženost bila dovoljna, pri čemu je za to potrebno više od petnaest godina. Najvjerodostojniji izvještaji iz Hrvatske iz 1985. godine govore da je zajednica doseljenih Ukrajinaca živjela više od dvadeset godina u endemskim selima te su imali jednake izgleda za razvitak endemske nefropatije kao i lokalno starosjedilačko stanovništvo (19). S druge strane, grupa Ukrajinaca koja se uselila u neendemska sela u isto vrijeme kad i gore spomenuta zajednica, u konačnici se nije razboljela, niti je u Ukrajini ikada opisana bolest. Iako se

rjeđe pronalaze, postoje podaci da su neke osobe nažalost ipak dobile nefropatiju nekoliko godina poslije emigriranja iz endemskog područja (20).

Preliminarna istraživanja kod zahvaćenih kućanstava otkrila su usputno loše sanitarne uvjete i malnutriciju osoba uz inače nizak životni standard. Međutim, socioekonomski čimbenici, uključujući životne uvjete i kvalitetu vode, nisu se razlikovali između pogođenih i nepogođenih susjednih domaćinstava ili među obližnjim endemskim i neendemskim selima (11).

Prevalencija bolesti bila je tijekom proteklih godina relativno stabilna, doduše sada se ukazuje na postupni silazni trend u većini pogođenih naselja. Iskorak stope incidencije prema starijim dobnim skupinama s duljim kliničkim tijekom sugerira da se intenzitet izloženosti okolišnom faktoru reducirao, stoga bi endemska nefropatija možda mogla i nestati u dalekoj budućnosti. No eto, neobično je što kod dviju endemskih općina Barajevo i Lazarevac u okolnom dijelu Beograda broj slučajeva endemske nefropatije nije promijenjen već dugih trideset godina (20).

Velika unaprjeđenja u praksi žetve i mljevenja pšenice dogodila su se u 1970-ima. Izgradnjom i upotrebom velikih komunalnih mlinova umjesto malih seoskih te korištenjem poljodjelskih strojeva za žetvu s puno manjim rupama u strojevima za prosijavanje, omogućeno je bolje razdvajanje vučje stope naspram pšenice manje veličine. Navedeno može objasniti razlog smanjenja pojavnosti endemske nefropatije unatoč tome što je vučja stopa još uvijek prisutna na ratarskim poljima. Shodno tome, premda je prisutnost vučje stope na poljoprivrednim parcelama pšenice rizični čimbenik, ona je opasna samo kad je povezana s prehrambenom industrijom (14).



Slika 1. Distribucija endemskih žarišta balkanske endemske nefropatije.

Izvor: literaturni navod 9.

### 3. ETIOLOGIJA

Ubrzo nakon izvorne prezentacije endemske nefropatije prije otprilike pola stoljeća, započela je potraga za njezinim uzrokom. Bilo je neminovno da za bolest s tako intrigantnim epidemiološkim profilom postoji širok prostor za svakojaka nagađanja. Za znanstvenike su doduše osebjune karakteristike nefritisa nudile različite mogućnosti jer ispoljava poseban istovrstan fenotip koji obuhvaća omanji dio svijeta, ograničen je na određene priznate regije, a sve zahvaćene osobe lako je identificirati što omogućuje temeljitu istragu. Stoga ne čudi da je jedno od prvih izvješća najavilo krajnji odgovor na etiologiju dotične bolesti, budući da su srpski istraživači smatrali da je navedena nefropatija posljedica trovanja brašna olovom u endemskim područjima.

Kako se pokazalo, pronalaženje uzročnika nije bio lak zadatak ponajviše zbog sumnjive kvalitete epidemioloških podataka iz endemskih zemalja i nepostojanja suradnje kod međudržavnih istraživača što je dovelo do nesrazmjernih rezultata istraživanja (13). U međuvremenu, vjerojatno nijedna druga humana bolest nije razvila toliko hipoteza u pokušaju da se razjasne njezini uzročni čimbenici. Unatoč fascinantnoj prirodi bolesti, izaziva rijedak poremećaj koji pogađa približno četvrt milijuna ljudi u naseljima na Balkanu uz reperkusiju nedostatka financijskih sredstava za njegovo proučavanje. Naposljetku, politički i društveni događaji na nestabilnom teritoriju jugoistočne Europe negativno su utjecali na napore da se pronade rješenje enigme balkanske endemske nefropatije. Treba imati u vidu da su političke napetosti nakon završetka Drugog svjetskog rata stvorile nezgodnu situaciju na Balkanu zbog koje je nefropatija postala više lokalna smetnja nego nacionalni prioritet.

Bez obzira na značajne barijere, istraga uzročnih faktora započela je gotovo odmah nakon što je bolest prvotno identificirana (9). Logična je pretpostavka da bi uzročni čimbenik trebao biti biotički element u zahvaćenom području s obzirom na bolest s tako uskom i dobro definiranom, kao i očuvanom geografskom rasprostranjenosti, ali uz zasigurni ekološki utjecaj ipak se moraju uzeti u obzir i drugi čimbenici.

Tijekom dugog niza godina predložen je popriličan broj potencijalnih etioloških čimbenika od kojih je većina zapravo bila odbačena (17). Sve se formulirane hipoteze mogu podijeliti u dvije temeljne skupine. Prva skupina predstavlja egzogene okolišne faktore u koje se svrstavaju mikotoksini, fitotoksini, teški metali, pliocenski lignit, dok druga skupina uključuje endogene

faktore poput virusa, genetske predispozicije te polimorfizma, kao i nedostatka elemenata u tragovima (9).

Osim toga, svaka etiološka hipoteza trebala bi uzeti u obzir ne samo bolest upale bubrega, nego i povećanu učestalost malignih neoplazmi gornjeg urotela u bolesnika. Treba naglasiti da je samo jedna od teza pružila uvjerljive dokaze da je primarni uzročnik endemske nefropatije, pogotovo s povezanom ulogom za razvoj zloćudnog tumora, kronična intoksikacija fitotoksinom aristolohičnom kiselinom (7,21,22).

Kronološki gledano kao prvo ponuđeno objašnjenje za pojavu endemske nefropatije bilo je trovanje olovom jer je pronađeno u brašnu koje se koristilo za pripremu kruha u zahvaćenim naseljima. Međutim, ova hipoteza nije potkrijepljena u kasnijim studijama (1).

Jedna od prvih, dobro osmišljenih i sveobuhvatnih teorija o etiologiji i patogenezi endemske nefropatije bila je opisana u literaturi ranih 1970-ih. Pretpostavka o kontaminaciji okratoksinom A temelji se na činjenici da su stanovnici u endemskim područjima izloženi njegovom relativno visokim koncentracijama (9). Brojna ispitivanja provedena u Europi, Aziji i Sjevernoj Americi pokazala su da je okratoksin svrstan u grupu mikotoksina, to jest sekundarnih metabolita plijesni koje pripadaju rodovima gljiva, pretežito *Aspergillus* ili *Penicillium*, te je za njega je poznato da djeluje kao prirodni kontaminant mnogih biljnih proizvoda (1). Okratoksin A je dokazana uzročna determinanta svinjske nefropatije s izuzetnom podudarnosti s endemskom nefropatijom. To je prvenstveno tubulointersticijska bolest uz ostale zajedničke patološke osobine s endemskom nefropatijom, a također ima sličnu ograničenu geografsku distribuciju jer se uglavnom javlja u sjevernoj Europi, što bi moglo ukazivati na zajednički uzročni odnos (18,20).

Uspostavljanje uzročno-posljedične veze između bolesti i okolišnog čimbenika pomoću analize izloženosti sastoji se od postupnog pristupa. Uzročnik mora biti prisutan u endemskoj regiji i u dovoljno velikim količinama izazvati oštećenje zdravlja. Osim toga, trebali bi postojati dokazi o tome kako se uzročnik kreće od okolišnog izvora do ljudskog organizma. Štoviše, trebala bi postojati topografska specifičnost što znači da uzročnik mora biti rašireniji u endemskim nego u neendemskim regijama. U konačnici ako se isti čimbenik pojavi u drugim područjima svijeta može se onda očekivati da će se slična bolest naći ondje, a ako nije trebalo bi osigurati obrazloženje. Primjena ovih načela u slučaju povezanosti okratoksina i endemske nefropatije dala je dvojake rezultate.

Neka znanstvena istraživanja otkrila su da je kontaminacija hrane okratoksinom zastupljena više u endemskim žarištima nego u susjednim neendemskim, a također i u zahvaćenim naspram nepogođenim kućanstvima i samim time argumenti su išli u prilog ovoj hipotezi (13). Drugi mikotoksini kao što su zearalenon, citrinin i aflatoksin također su izdvojeni u endemskim područjima.

Eksperimentalni modeli sugerirali su da bi ne jedan, već sinergizam više otrovnih produkata plijesni mogao biti involviran u etiologiju endemske nefropatije (11). Usprkos tome, slična i velika izloženost mikotoksinu događa se diljem svijeta u poljoprivrednim zajednicama koje uglavnom nemaju kroničnu bubrežnu bolest i kauzalni urotelni karcinom. Ostala istraživanja izvijestila su da pacijenti s nefropatijom imaju povećane koncentracije okratoksina A u urinu i krvi što ukazuje na povećanu intoksikaciju istog (23). Iako je kontaminacija hrane sveprisutna, moguće je da su pojedinci izloženi većim dozama okratoksina kao rezultat neke još uvijek neidentificirane prakse kod obrade i konzumacije hrane. Svejedno, pokazalo se u istim studijama da su varijacije u vrijednostima bile visoke unutar endemske populacije i često se uvelike preklapale s vrijednostima iz neendemskih lokacija u svijetu. Štoviše, nije postojala stalna povezanost između konzumacije okratoksina A i njegove količine u krvi ili urinu (13). Iako se ovaj mikotoksin smatra potencijalno kancerogenim za ljude (skupina 2B), prema klasifikaciji Međunarodne agencije za istraživanje raka (IARC, engl. The International Agency for Research on Cancer), nije bio nikada odgovoran za bilo koju vrstu nefropatije kod ljudi (8).

Endemska nefropatija koja je bila primijećena u Tunisu pokazala je određene kliničke i patološke sličnosti s balkanskom endemskom nefropatijom gdje su neka područja bila kontaminirana mikotoksinom. Usprkos tome kod ljudi nije uočena jasno povezana kronična nefrotoksičnost s izloženošću mikotoksina u prehrani (9). Okratoksin A uzrokuje oksidativno oštećenje DNA i dokazano je nefrotoksičan u *in vivo* eksperimentima svih testiranih životinja uključujući glodavce, ptice i sisavce (8).

Jedan od najvažnijih argumenata protiv tvrdnje da je okratoksin kancerogen i glavni rizični čimbenik za urotelni karcinom jest spoznaja da inducira benigne bubrežne adenome kod glodavaca, a ne maligne urotelne karcinome. Patološki nalazi kod endemske nefropatije također se razlikuju u nekim vrlo važnim elementima kao na primjer kod nalaza na životinjskim modelima za nefrotoksičnost, ali su naprotiv gotovo identični kod nefropatije aristolohične kiseline (23).



Istraživanja su, koristeći visoko osjetljive metode detekcije biomarkera izloženosti karcinogeneze takozvanih DNA adukata, pokazala da se okratoksin A ne veže kovalentno na DNA u reakcijama koje kataliziraju humani i štakorski enzimi (21). DNA adukti su oblik oštećenja molekule DNA uzrokovan kovalentnim vezanjem kemijskog dijela što je u ovom slučaju neka kancerogena supstanca. Adukti koje stanica ne eliminira mogu uzrokovati mutacije što može vrlo lako dovesti do zloćudnih novotvorina (24).

Predmet mnogobrojnih istraživanja s ciljem pronalaska molekularnih dokaza o ulozi okratoksina A u etiologiji endemske nefropatije bile su detekcija i kvantifikacija DNA adukata povezanih s okratoksinom u tkivima bubrega i urotelijalnim tumorima oboljelih pacijenata iz Hrvatske, Bugarske i Srbije. Provedeno je opsežno terensko istraživanje u kojem se analizirao okratoksin u hrani koju su konzumirali stanovnici endemskog područja s ciljem dobivanja rezultata koji bi potvrdili visoku izloženost ove populacije čime bi se učvrstila hipoteza da je ovaj mikotoksin involviran u etiologiju endemske nefropatije (1). Nije jasan mehanizam tumorigeneze okratoksina A, a bili su evidentirani proturječni rezultati poveznice između potencijalnog reagiranja okratoksina s DNA i tendencije formiranja kovalentnih adukata DNA (25). Iako su neki znanstvenici objavili podatke mogućeg nastanka kovalentnih adukata DNA uzrokovanih okratoksinom A, neki drugi su pak u *in vitro* i *in vivo* studijama koristili radioaktivno obilježen okratoksin i nisu uspjeli detektirati njegovu kompatibilnost s DNA (26).

Uzimajući u obzir sve dostupne podatke, Znanstveni panel za kontaminante u prehrambenom lancu Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA, engl. The European Food Safety Authority) utvrdio je da ne postoji valjani dokaz o prisutnosti specifičnih okratoksin-DNA adukata te da su genotoksični učinci okratoksina A najvjerojatnije uzrokovani oksidativnim stresom. Također je ustanovio da su epidemiološki podaci nepotpuni te da ne opravdavaju klasifikaciju okratoksina A kao dokazanog kancerogena za bubrege ljudi (27).

Ne postoje uvjerljivi dokazi iz humane epidemiologije koji bi verificirali podudarnost između izloženosti okratoksinu A i incidencije endemske nefropatije odnosno urotelijalnog karcinoma. Takav zaključak se temeljio na važnim činjenicama da je okratoksin očito široko rasprostranjen u kontaminiranoj hrani diljem svijeta te je uočeno značajno preklapanje u prosječnim razinama onečišćenja mikotoksinom relevantnih kategorija hrane između endemskih i neendemskih zona. Između ostalog, više prosječne koncentracije okratoksina u krvi zabilježene su u bolesnika s

različitim kroničnim bubrežnim bolestima, stoga je nakupljanje mikotoksina posljedica, a ne uzrok oštećene bubrežne funkcije (14). Trovanje okratoksinom A doduše može utjecati na metabolizam drugih kancerogena poput aristolohične kiseline u *in vivo* eksperimentima (28).

Sljedeću takozvanu hipotezu lignita uspostavili su znanstvenici iz Geološkog instituta u Sjedinjenim Američkim državama 1990-ih godina. Ovu teoriju predložili su na temelju očiglednog geografskog podudaranja između položaja endemičnih područja i lokacija naslaga lignita iz pliocenske epohe kenozoika na Balkanu (8). Lignit je vrsta smeđeg ugljena najnižeg ranga koji se uobičajeno upotrebljava kao sirovina za proizvodnju energetskog goriva. Hipoteza tvrdi da bi trošenje ugljena moglo generirati složene smjese ugljikovodika koji su topivi u vodi kao što su na primjer anilin, antracen, piren i naftilamin (18,20).

Te otrovne organske kemikalije iz istrošenog lignita mogu se ispuštati iz podzemnih voda i transportiranjem tako zagađivati izvore pitke vode koji su nazočni u aluvijalnim dolinama pored naslaga lignita. Nekolicina istraživanja je pokazala da se spojevi poput fenola, benzena, ftalata, policikličkih aromatskih ugljikovodika i/ili spojeva razgradnje lignita pojavljuju u većim količinama u ekstraktima uzoraka podzemnih voda endemskih naselja (29).

Preliminarne geokemijske analize bunarske vode iz sela, koja se nalaze u endemskim područjima, pokazale su prisutnost toksičnih organskih spojeva, a nisu bili uočeni u vodi iz bunara iz neendemskih sela (30). U Rumunjskoj se kasnije također isto pokazalo da su razine aromatskih i alifatskih spojeva bile više u uzorcima pitke vode u endemičnim žarištima nego u onima iz neendemičnih područja (31). Nasuprot tome, postoje zapisi gdje su dva uzorka vode iz endemskog i jedan iz neendemskog područja u Srbiji pokazali slične visoke koncentracije naftalena, pirena, fenantrena i fluora (32). U konačnici većinska istraživanja nisu pronašla mjerljive razine toksičnih supstanci u uzorcima vodoopskrbe zahvaćenih naselja diljem Balkana i uvidjelo se da nema razlike u koncentracijama tih zagađivača u vodi između zahvaćenih i nezahvaćenih područja (17). Iako su koncentracije ovih organskih molekula u vodi iz bunara niske, dugotrajno izlaganje ili nakupljanje u tjelesnim tkivima može rezultirati tijekom vremena štetnim učincima na zdravlje i dovesti do oštećenja bubrega. Za mnoge od ovih toksičnih organskih spojeva potvrđeno je da su kancerogeni i da bi također mogli uzrokovati rak gornjeg urinarnog trakta (20).

Istraživanje problematike nisko rangiranog ugljena u etiopatogenezi kronične bubrežne bolesti zahtijevalo je podosta terenskih studija, ali nažalost je bilo naglo prekinuto kada je izbio rat u

tadašnjoj Jugoslaviji. Potencijalna primjena ovakve hipoteze o lignitu je ta da bi se ona mogla koristiti kao prognostički model zbog toga što je mjesto u Srbiji, za koje se nije znalo da je endemsko, bilo ustanovljeno kao takvo nakon što je otkriveno da se nalazi blizu nalazišta pliocenskog ugljena. Ovi izvještaji sugeriraju da je konstatacija o lignitu iz pliocenskog razdoblja ograničena na prostornu povezanost prvobitno predloženu u endemskoj nefropatiji. Shodno tome, izloženost pojedinaca izvorskoj vodi koja sadržava organske kemijske spojeve iz naslaga lignita u endemskim područjima nije relevantna za diskutabilnu etiologiju navedene bolesti te je krenula potraga za naredno alternativno pojašnjenje (13).

1975. godine bile su objavljene neke spekulacije o uključenosti virusa u etiologiju endemske nefropatije sugerirajući da je uzrok bolesti kod ljudi ustvari usporena infekcija koronavirusom. Naknadni podaci koji potkrepljuju ovu hipotezu su ostali neuvjerljivi (33). Dokumentirano je da su neki autori uspjeli detektirati novi koronavirus, koristeći primarne kulture epitelnih stanica iz uzoraka bubrežnog tkiva dobivenih biopsijom od pet pacijenata s nefropatijom i tumorima mokraćnog sustava. Četiri od pet uzoraka eksplantata na proširenoj kulturi epitelnih stanica potvrdila su koronavirus koji je pokazao citopatogeni efekt za ljudske fibroblaste i Vero stanice (epitelne stanice bubrega zelenog majmuna), ali nije ni u jednoj iz kontrolnih kultura. Predloženo je da je taj mikroorganizam – novi koronavirus na temelju njegove unakrsne reaktivnosti s ljudskim koronavirusima, kao i virusom transmisivnog gastroenteritisa koji se prenosi kod svinja (34). Kada je testirana seroreaktivnost na antigene iz novog koronavirusa, pokazalo se da je vrlo visoka u bolesnika na dijaliznoj terapiji i kontrolama iz endemskih mjesta, ali ne u kontrolama iz neendemskih mjesta. Usprkos tome, osporena je etiološka hipoteza o koronavirusu kada su Vero stanice zaražene virusom dodatno testirane različitim tehnikama, uključujući metodom elektronske mikroskopije. Utvrđeno je da jedini virus otkriven u kulturama stanica pacijenata nije bio povezan s koronavirusima, budući da su koronavirusi uzrokovali citopatski učinak na zaraženim Vero stanicama koji se razlikuju od onih opaženih nakon njihove infekcije tkiva, navodno povezanim s nefropatijom. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnila priroda virusnih čestica pronađenih u bubrežnom tkivu bolesnika te je uočljivo da se uključenost koronavirusa više ne bi trebala razmatrati u indukciji endemske nefropatije (35).

Što se tiče metala i polumetala, postojala je pretpostavka da njihove visoke ili čak preniske koncentracije mogu posredovati u razvitku endemske nefropatije. Hipoteza se temeljila na saznanjima da neki od njih kao što su olovo, kadmij, arsen, silicij i nikal mogu biti prisutni u vodi i tlu u endemičnim područjima (22). Postoje nagađanja za povezanost pobola s visokim razinama ovih elemenata u vodi, a izlaganje silicijevom dioksidu i niklu za predodređenost stvaranja raka (9). Učinci izvanprofesionalne izloženosti kadmiju sporadično su uspoređivani sa zatajenjem bubrega uočenim u bolesnika s endemskom nefropatijom. Što se tiče nemetala, pokušalo se inkorporirati endemsku nefropatiju sa silicijem i njegovim oksidom. Međutim, epidemiološki podaci pokazuju da je presudan jedan ili više vanjskih čimbenika za pojavu endemske nefropatije i prekomjerne učestalosti karcinoma u endemskim područjima. Također je uočeno da ako su primijenjeni poneki kriteriji poput koncentracija kadmija ili olova unutar načelno dopustive razine, onda bi mogli dovesti do štetnog učinka u sinergiji s drugim čimbenicima, kao što je nedostatak mikronutrijenata (11). Rezultati sustavnog dvogodišnjeg praćenja vode i tla ukazali su da teški metali poput olova i kadmija te polumetala arsena i silicija ne igraju kritičnu ulogu u etiologiji balkanske endemske nefropatije (36).

Nekoliko je publikacija sugeriralo mogućnost da bi nedostatak, a ne obilje nekih esencijalnih elemenata u tragovima, na primjer selena, mogao biti uključen u etiološki kontekst (37). Dobro je zabilježen manjak apsorpcije mikronutrijenta selena u tlu, vodi, stijenama, hrani i uzorcima seruma prikupljenih iz endemskih i neendemskih lokacija u Srbiji (38). Međutim, nije bilo odgovarajućih argumenata da je nedostatak nemetala selena ponuđeni uzročni čimbenik endemske nefropatije i urotelijalnog karcinoma u endemskim područjima (36). Kasniji izvještaji pokazali su da je selen ravnomjerno raspodijeljen između endemičnih i neendemičnih naselja te zbog toga postoji vrlo mala vjerojatnost da bi se on smatrao uzročnikom nefropatije. Sva ova dostignuća dovela su do zaključka da se teški metali, polumetali i elementi u tragovima trebaju isključiti iz uzroka endemske nefropatije (39).

Još je 1969. godine prvi put formulirana hipoteza o potencijalnom utjecaju kronične intoksikacije aristolohičnom kiselinom iz sjemenki vučje stope na pojavnost balkanske endemske nefropatije (1,10,14). Prezentirana su izvanredna zapažanja koja impliciraju nefrotoksičnu aristolohičnu kiselinu kao glavni rizični faktor na temelju epidemioloških, ekoloških i poljoprivrednih istraživanja (8). Da bi se potvrdila ova hipoteza, provela su se terenska istraživanja i uočeno je da

su sjemenke iz biljke *Aristolochia clematitis* bile pomiješane među pšeničnim zrnom tijekom žetve. Budući da je kruh glavni sastojak lokalne prehrane, kontaminacija pšenice čak s malim brojem otrovnih sjemenki može dovesti do dugotrajne intoksikacije u malim dozama (13).

Hrvatski znanstvenici izvijestili su prvi put o trovanju konja koji su bili hranjeni sijenom, a ono je bilo kontaminirano aristolohičnom kiselinom jer je sijeno sadržavalo sjemenke vučje stope te su naposljetku konji razvili simptome zatajenja bubrega. Kada su bubrezi bili histološki analizirani, pokazala su se tubulointersticijska oštećenja s minimalnom upalom, što je ukazivalo na veliku kliničku podudarnost s balkanskom endemskom nefropatijom (13,21). Nakon pozitivnog rezultata, organizirano je istraživanje geografske rasprostranjenosti biljke u endemskom području. U daljnjem eksperimentalnom modelu detektirane su žarišne tubulointersticijske promjene kod štakora i kunića koji su bili otrovani oralnim unošenjem različitih količina pripremljenog brašna od samljevenih osušenih sjemenki vučje stope. Opet su degenerativne promjene na histološkoj razini u potpunosti odgovarale karakterističnim promjenama kod endemske nefropatije (13,18). spio se čak dokazati karcinogenetski potencijal biljke, to jest aristolohične kiseline, zato što su štakori dobili kožne sarkome na mjestu ubrizgavanja vodenih ekstrakata vučje stope (1).

Nažalost, tijekom sljedećih tridesetak godina ova je hipoteza bila ostavljena po strani i nije napravljen nikakav pokušaj da se potvrde ili nadopune ova predviđanja sve do prvog opisa kineske biljne nefropatije kod belgijskih pacijentica koja je skrenula pozornost na srodnosti u patološkim značajkama nefropatije dijagnosticirane u Belgiji i balkanske endemske nefropatije. Ovakva intrigantna izvješća obnovila su znanstveni interes i potaknula nova istraživanja koja su rezultirala snažnim dokazima koji podržavaju dominantnu ulogu aristolohične kiseline u etiopatogenezi endemske nefropatije (13,23).

Nakon svoje metaboličke aktivacije aristolohična kiselina reagira s DNA stvarajući kovalentne aristolaktamske adukte DNA. Neki oblici ovih adukata su stabilni i mogu se otkriti u ugroženim tkivima, stoga bi bubrežne stanice oboljelih pacijenata trebale sadržavati takve adukte. Ova je tvrdnja podržana preliminarnim dokazima o pojavnosti aristolaktamskih adukata DNA u bubrežnom korteksu i u tkivu karcinoma gornjeg urinarnog trakta kod pojedinih testiranih pacijenata s endemskom nefropatijom (40). Kasnija publikacija proširila je te rezultate pokazujući da je nakupljanje specifičnih DNA adukata bilo prisutno u bubrežnom korteksu u pet pacijenata iz endemske regije u Hrvatskoj, ali nije pronađeno kod drugih pet bolesnika s uobičajenim oblicima

kronične bubrežne bolesti, a ni u petero s urotelnim rakom iz neendemskog područja Hrvatske (41).

Poznato je da egzogena izloženost karcinogenima i endogeni biološki procesi uzrokuju mutacije u DNA (23). Neki kancerogeni agensi stvaraju specifičan mutacijski obrazac zato što su specifične vrste i lokacije DNA adukata povezane sa specifičnim mutacijskim spektrom u DNA sekvenci (42). Nadalje, nakon provedbe analize mutacija unutar gena p53 u uzorcima urotelijalnog karcinoma pacijenata koji žive u endemskim žarištima, otkriven je karakterističan mutacijski potpis transverzije adenin-timin (A-T) u timin-adenin (T-A) za aristolohičnu kiselinu (21,43,44). TP53 je tumor supresorski gen koji upravlja staničnim odgovorima na široki spektar stresa (oštećenje DNA, onkogeni stres, hipoksija) induciranjem prolaznog ili trajnog zaustavljanja staničnog ciklusa ili apoptoze i ima ključnu ulogu za prevenciju razvoja raka te je zbog toga poznat kao čuvar humanog genoma. U općoj, svjetskoj populaciji bolesnika s urotelijalnim karcinomom gornjeg mokraćnog sustava supstitucija adenina i timina čini samo 4 % svih mutacija gena TP53 (23). U kohorti oboljelih od endemske nefropatije u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini, mutacije tumor supresorskog gena p53 na parovima adenin-timin činile su 89 % svih mutacija od čega su većina bile A:T→T:A transverzije (45). Kasnije je također dokazana prisutnost aristolaktamskih DNA adukata i karakterističnih mutacija TP53 gena kod rumunjskih i srpskih pacijenata s nefropatijom (4). Aristolaktamski DNA adukti pronađeni su u 95 % slučajeva transverzijske mutacije s A:T u T:A što ukazuje na jasnu poveznicu između biomarkera izloženosti i karcinogenog učinka (14).

Iako je aristolohična kiselina temeljni uzročni faktor za nastanak endemske nefropatije tek približno 2 do 5 % stanovnika u endemskom području uopće razvije bolest (14). To se ne može lako pripisati preferencijalnoj izloženosti aristolohičnoj kiselini tako male skupine stanovništva, ali može biti rezultat sekundarnih endogenih čimbenika poput genske predispozicije i genetskog polimorfizma (13). Opsežna epidemiološka i genetička istraživanja razjašnjuju karakteristike multifaktorijalnog nasljeđivanja endemske nefropatije (46). Genetska osnova multifaktorijalne bolesti je ostvariv ili neostvariv razvoj bolesti kod genetski osjetljivih osoba ovisno o međudjelovanju niza rizičnih čimbenika, genetskih i okolišnih.

Obrazac učestalije pojave endemske nefropatije unutar pojedinih obitelji sugerira multifaktorijalnu prirodu etiologije ove bolesti koja uključuje genetsku predispoziciju oboljelih pojedinaca, ali prijenosni obrazac kod rizičnih obitelji nije tipičan za poremećaje jednog gena (20). Hipoteza o

multifaktorijskoj etiologiji predviđa da interakcija polimorfničkih varijanti gena i okolišnih čimbenika uzrokuje povećani rizik od progresije bolesti bubrega prema urotelnim karcinomima (47). Potpora ovoj pretpostavci uključuje zapažanja da bolest jasno pogađa određene obitelji i da zaobilazi neke etničke skupine koje žive generacijama na tom području kao što je romska nacionalna manjina, a također se može javiti kod pojedinaca iz rizičnih obitelji koji su napustili endemska područja u mladosti s dovoljnom izloženošću (48). Kasnije je hipoteza istražena među velikim brojem bugarskih obitelji u kojima su članovi imali endemsku nefropatiju i uključivala je četiri tisuće sedamdeset sedam ispitanika iz četriristo sedamnaest pogođenih obitelji te je donesen zaključak da su svi oboljeli pripadali određenim obiteljima (46). Utvrđeno je da su čak i stanovnici iz neendemičnih sela kojima je dijagnosticirana potonja bolest članovi zahvaćenih obitelji koje su davno imigrirale iz rodničkih mjesta u endemskim žarištima. Štoviše, u tom ispitivanju epidemiološke karakteristike nefropatije ukazale su na uključenost genetskih poremećaja u kojima je udio oboljelih potomaka bio povezan s brojem oboljelih roditelja (49). Učestalost bolesti proporcionalna je stupnju krvnog srodstva i time je rizik dva puta niži za srodnike drugog koljena nego za srodnike prvog koljena te se posljedično značajno smanjuje za udaljenije rođake (48).

Neka su istraživanja predstavila rezultate koji pokazuju da je polimorfizam gena CYP3A5, marker za njegovu ekspresiju u ljudskom bubregu, povezan s povećanim rizikom za endemsku nefropatiju (47). Sekvenciranjem cijelog humanog egzoma otkrivena su tri mutirana gena HSPG2, CELA1 i KCNK5 kod oboljelih koji su usko povezani s procesom angiogeneze. Autori pretpostavljaju da abnormalna angiogeneza igra važnu ulogu u molekularnoj patogenezi endemske nefropatije te su zbog toga ovi geni izabrani kao njezini mogući posrednici (50).

### 3. 1. Aristolohična kiselina

Aristolohična kiselina je zajednički naziv za skupinu strukturno srodnih spojeva, toksina karakteristično prisutnih u biljkama roda *Aristolochia* i *Asarum* koje su rasprostranjene po cijelom svijetu (51,52). Budući da su od 1990-ih u mnogim zemljama prijavljivani slučajevi nefropatije izazvane aristolohičnom kiselinom te karcinomi prijelaznog epitela gornjeg trakta mokraćnog mjehura (urotelijalni karcinomi), Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. The United States Food and Drug Administration), Europska agencija za lijekove (EMA, engl. European Medicines Agency), kao i regularna tijela nekih drugih zemalja, zabranili su i ograničili primjenu i prodaju proizvoda te preparata koji su sadržavali aristolohičnu kiselinu (53). Nažalost, neželjeni te nepredviđeni problemi povezani sa spomenutom kiselinom događaju se i pojavljuju i danas, posebice u balkanskim i azijskim područjima. Razlog se pripisuje daljnjoj uporabi biljnih pripravaka koji sadrže aristolohičnu kiselinu, posebice u Kini i nekim zemljama u Aziji te konzumaciji hrane koja je njome kontaminirana pri čemu milijuni ljudi mogu biti izloženi riziku trovanja. Biljke ili preparati koji sadrže aristolohičnu kiselinu obično su se primjenjivali za liječenje glavobolje, prehlade, hepatitisa, infekcije mokraćnog sustava, vaginitisa, infekcije gornjih dišnih puteva, ekcema, dismenoreje, artralgijske, hipertenzije, bronhitisa, upale pluća, zatajenja i edema srca, gihta, upalnih bolesti, aftoznog stomatitisa, ugriza zmija te seksualnih disfunkcija, a mogu se i danas lako kupiti putem interneta (54, 55, 56, 57). Stoga, potrebno je educirati javnost i poduzeti strože mjere opreza od izlaganja aristolohičnoj kiselini, kako bi se i dalje visok rizik od bolesti sveo na minimum (58, 59).

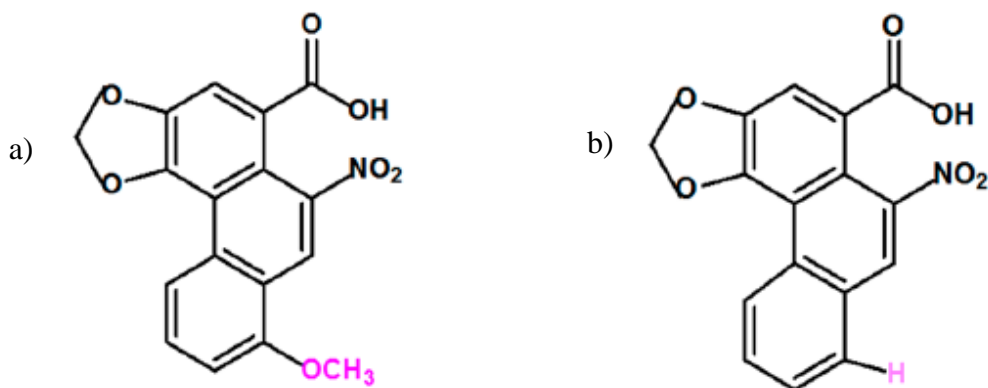
1992. godine visoka prevalencija bubrežnih bolesti praćenih urotelnim karcinomom kod pacijentica iz Belgije koje su pile tablete za mršavljenje s ekstraktom korijenja kineskih biljaka izazvala je svjetsku pozornost, a to je bio događaj nakon kojeg su liječnici i znanstvenici utvrdili nefrotoksični, mutageni, ali i kancerogeni potencijal aristolohične kiseline. Kasnije je otkriveno da je balkanska endemska nefropatija povezana s istom. Od tog trenutka se u brojnim i različitim studijama posvetila pažnja istraživanju, karakteriziranju i kvantificiranju analoga aristolohične kiseline u određenim biljkama i proizvodima, njihovim ulogama u mehanizmima oštećenja bubrega te procjeni izloženosti pomoću specifičnih biomarkera – njezinih DNA adukata. Također, izloženost se može potvrditi karakterističnom mutacijom, transverzijom A→T, supstitucijom



adenina timinom i/ili C→T tranzicijom, supstitucijom citozina timinom. Osim toga, različiti enzimi, transporteri organskih aniona, upale i molekularni mehanizmi mogu biti zaduženi za bubrežna oštećenja (60). Iako su preliminarno otkriveni temeljni etiološki mehanizmi bubrežnih bolesti izazvanih aristolohičnom kiselinom, detaljan princip daleko je od potpunog razumijevanja (54). Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC, engl. The International Agency for Research on Cancer) 2002. godine klasificirala je aristolohičnu kiselinu kao dokazani kancerogen za ljudsku populaciju, kancerogen skupine 1, djelujući genotoksičnim mehanizmom (61).

Do sada je iz prirodnih izvora izolirano više od sto sedamdeset osam analoga aristolohične kiseline (62), u kojima je najmanje sedam vrsta *Aristolochia*, uključujući *Aristolochia clematitis* L. (Europa), *A. indica* L. (Azija), *A. debilis* Sieb i Zucch. (Kina), *A. acuminata* Lam. (Indija), *A. bracteolata* Lam. (Afrika), *A. serpentaria* L. (Sjeverna Amerika) te *A. trilobata* L. (Srednja/Južna Amerika, Karibi), kao i četiri vrste *Asarum*, uključujući *Asarum heteropoides* f. *mandshuricum* (63). Danas se u medicinske svrhe koriste *Asarum sieboldii* Miq (Kina), *Aristolochia europaeum* L. (Europa) i *Asarum canadense* L. (Kanada i Sjedinjene Američke Države) (64). Nadalje, poznato je da se lijekovi koji sadrže aristolohičnu kiselinu koriste u mnogim regijama gdje dijagnoza nefropatije još nije službeno dio rutinske kliničke prakse, uključujući Afriku, Južnu Ameriku i Indijski potkontinent (63).

Aristolohična kiselina, odnosno dva oblika nitrofenantren karboksilne kiseline, aristolohična kiselina I (AAI) i aristolohična kiselina II (AAII) smatraju se najzastupljenijom i najaktivnijom njenom komponentom, a strukturno se razlikuju samo po prisutnosti metoksi skupine (O-CH<sub>3</sub>) na osmom mjestu za AAI i odsutnosti metoksi skupine na osmom mjestu za AAII (slika 2) (2).



Slika 2. Strukturne formule: a) aristolohične kiseline I; b) aristolohične kiseline II.

Izvor: literaturni navod 2.

Kemijske strukture AAI i AAIi smatraju se ključnim determinantama njihovih toksičnih učinaka. Prema dosadašnjim saznanjima, AAI je jedini odgovoran za nefrotoksičnost (65), a ima veću citotoksičnost u odnosu na AAIi (56). S druge strane, AAIi može pokazati veći ili sličan genotoksični i kancerogeni učinak nego AAI (66). Biološki učinkovitu koncentraciju aristolohične kiseline diktira put unosa, doza i metabolizam, čime se modulira razvoj bolesti endemske nefropatije, kao i njena progresija (nastanak urotelijalnog karcinoma). Svi slučajevi bolesti nastali su oralnim gutanjem aristolohične kiseline, shodno tome se apsorbira iz gastrointestinalnog trakta i raspoređuje po cijelom tijelu (10).

Metabolizam aristolohične kiseline istraživana je na ljudima i nekoliko životinjskih vrsta (9). AAI može direktno uzrokovati intersticijsku nefropatiju, ali je za malignu transformaciju nužna reakcija nastajanja međuprodukata AAI pomoću enzimske aktivacije koji će se na koncu vezati za DNA. Zanimljivo je da nakon izlaganja AAI u nekim tkivima nastaju pojedini oksidacijski i reduksijski metaboliti koji se izlučuju urinom i fecesom te na taj način detoksiciraju organizam. U određenim studijama je otkriveno da samo nekoliko osoba u odnosu na cjelokupno proučavane pati i od nefropatije i od karcinoma nakon izlaganja aristolohičnoj kiselini, a pozadinu tog fenomena tek treba razumjeti. Razlog osjetljivosti pojedinca očituje se u vremenu trajanja izlaganja, akumuliranoj dozi, ali i razlici u aktivnostima enzima koji kataliziraju biotransformaciju (aktivaciju i/ili detoksikaciju aristolohične kiseline (9,67)). Istodobno, poznato je da su određene genetske varijacije važne odrednice rizika od pojave karcinoma ili drugih toksičnih učinaka aristolohične kiseline. Mnogi geni enzima, koji su uključeni u njeno metaboliziranje, postoje u različitim oblicima ili pokazuju polimorfizme, a oni uvjetuju različite enzimske aktivnosti genskih produkata (68). Kombinacija polimorfnih enzima i izloženosti aristolohičnoj kiselini može dovesti do povećanog rizika za razvoj endemske nefropatije (69).

### 3. 2. Vučja stopa (*Aristolochia clematitis* L.)

Vučja stopa (žuta vučja stopa, vučja jabučica, divlji jabučnjak, lat. *Aristolochia clematitis* L.) je višegodišnja zeljasta parazitska biljka koja pripada porodici vučjih stopa (lat. *Aristolochiaceae*). Ima uspravnu stabljiku žutozelene boje, velike srcolike listove, svijetložute cvjetove koji u donjem dijelu poprimaju oblik jabučice (slika 3) te zelene plodove u obliku čahura u kojima se nalaze sitne i trokutaste smeđe sjemenke (slika 4), a naraste do visine jednog metra. Neugodnog je mirisa, a iz cvjetova se širi miris trulog mesa privlačeći tako male insekte koji ih oprašuju (70). Svi dijelovi biljke, a osobito sjemenke, sadrže otrovne alkaloidne od kojih je najznačajnija upravo aristolohična kiselina. Raste uglavnom uz ceste, u šikarama, vinogradima te drugim poljoprivrednim područjima, a u toplim i vlažnim krajevima dunavske doline najčešće uz pšenicu (63). Latinski naziv *Aristolochia* potječe od grčkih riječi – „*áristos*“ što znači „lijep“ i „*lochia*“ što znači „porodilja“, odnosno „mjesečnica“ jer su je stari Grci i Egipćani koristili kao ljekovitu biljku za poticanje poroda i olakšavanje ponovnog dobivanja mjesečnice. *Clematitis* dolazi od grčke riječi „*klema*“ što znači „vitica“ označavajući princip rasta same biljke. Oblik cvijeta podsjeća na položaj fetusa pa se smatralo da biljka pospješuje porođaj po čemu je i dobila ime, no veće količine služile su za namjerno izazivanje pobačaja (70,71).



Slika 3. Žuta vučja stopa (lat. *Aristolochia clematitis* L.)

Izvor: *British Medical Journal Publishing Group BMJ 2012;345:bmj.e4993.*

Već je 1962. godine naznačeno da je vučja stopa nefrotoksična za životinje, a 1969. predložena je hipoteza da bi etiologija balkanske endemske nefrologije mogla biti povezana s kroničnim trovanjem jer je više puta uočeno da se njeno sjeme pomiješa sa zrnom pšenice tijekom procesa žetve na lokalnim pšeničnim poljima. Nagađalo se da je konzumacija kruha od brašna dobivenog od kontaminiranih žitarica uzrok ljudske izloženosti toksičnoj komponenti *Aristolochia clematitis*. Provedeno je istraživanje na modelima kunića kod kojih je kontaminirano brašno sjemenkama izazvalo nefropatiju, sličnu dotadašnjim saznanjima o endemskoj nefropatiji. Tad je i dokazan kancerogeni potencijal navedene biljke jer su u narednoj studiji štakori razvili sarkome kože na mjestima gdje im je apliciran vodeni ekstrakt vučje stope. Hipoteza je na kraju i potvrđena na temelju geografskih, epidemioloških i laboratorijskih istraživanja, ali je znanstvenu zajednicu ta pretpostavka zaintrigirala tek mnogo godina kasnije, nakon izvješća iz Belgije (1).

Tek je 2013. godine predložen drugačiji put unosa aristolohične kiseline u ljudski organizam jer je ustanovljeno da neki pšenični usjevi, u kojima vučja stopa raste, stari i razgrađuje se, tijekom godina akumuliraju određenu količinu same kiseline korijenjem iz tla te je tako prenose na druge poljoprivredne vrste. Posljedično, dokazalo se da korijenje kukuruza i krastavaca može apsorbirati aristolohičnu kiselinu što je dovelo do prirodnog unosa kontaminanta u lanac ishrane i jačanje mogućnosti intoksikacije na endemskim područjima (72). Naknadno je proveden eksperiment uzgoja salate, rajčice i mladog luka na onečišćenom tlu te je istraživanje pokazalo da je aristolohična kiselina doista translocirana i bioakumulirana u drugim biljnim strukturama (korijenju, listovima te plodovima), ali i da je otporna na djelovanje mikroorganizama iz tla. Štoviše, ne samo da je kiselina ostala vrlo postojana u metabolizmu biljnih stanica, nego je i dulje vrijeme bila prisutna u prehrambenim proizvodima uzgojenih kultura. Slijedom navedenog, duži period konzumiranja hrane pripremljene od ovakvih usjeva također može rezultirati endemskom nefropatijom (73).



Slika 4. Sjemenke vučje stope

Izvor: literaturni navod 14.

#### 4. PATOFIZIOLOGIJA I PATOLOGIJA

Iako postoje mnogobrojni rezultati istraživanja u literaturi, danas je još uvijek nejasno jesu li nefrotoksični i kancerogeni učinci aristolohične kiseline blisko povezani procesi, ali se zna da su ireverzibilni. Poznato je da se u većini slučajeva urotelijalni karcinom razvija kao kasna komplikacija kod pacijenata s potvrđenom balkanskom endemskom nefropatijom, a inače je ovaj karcinom uvijek bio otkrivan kod bolesnika koji su već bolovali od završnog stupnja kronične bubrežne bolesti. Međutim, samo je u jednom slučaju opisan invazivni urotelijalni karcinom nakon intoksikacije aristolohičnom kiselinom koji se razvio bez teškog zatajenja bubrega (74). Ovo zapažanje može sugerirati da bi nefrotoksičnost i kancerogenost mogli biti neovisni procesi (10).

Kancerogeni potencijal i/ili toksični učinak aristolohične kiseline proučavali su se u raznim istraživanjima na životinjama. Visok rizik od pojave tumora u urinarnom traktu, prednjem dijelu želuca, tankom crijevu, bubregu, jetri, mokraćnom mjehuru, ušnom kanalu i/ili potkožnom tkivu uočen je kod miševa, štakora i/ili pasa nakon njene primjene. Nakon ponovljene doze uočena je bubrežna toksičnost. Između ostalog, gastrotoksičnost izazvana aristolohičnom kiselinom I (AAI) koju karakterizira oštećenje prednjeg dijela želuca javlja se prije oštećenja bubrega. Isto tako, AAI bi mogla izazvati apoptotičku smrt stanica u jajnicima i testisima miševa te uzrokovati ozbiljno smanjenje veličine i težine organa (54).

Mutageni učinak odvija se na način da se aristolohična kiselina (AA, engl. aristolochic acid) pretvara u reaktivni međuprodukt, veže za purinske baze u DNA i formira kovalentne AA-DNA adukte koji mogu ostati desetljećima u korteksu bubrega, a vrlo su postojani u ljudskim tkivima zbog nemogućnosti prepoznavanja, a time izrezivanjem nukleotida za popravak DNA (75,76). Bez učinkovitog popravka, prevladavaju i učestalo se formiraju A→T (adenin→timin) transverzije i/ili C→T (citozin→timin) tranzicije na netranskribiranom lancu tumorskog supresorskog gena p53, „čuvarom“ genoma. Gen p53 ima kritičnu ulogu u sprječavanju nastajanja tumora, kontroli staničnog rasta i održavanju genetske stabilnosti (77). Mutacije p53 i AA-DNA adukti smatraju se biomarkerima za procjenu izloženosti aristolohičnoj kiselini (78), a upravo AA-DNA adukti su nađeni u bubrezima i tkivima uretera belgijskih pacijentica (40), ali i u invazivnim metastazama jetre te raznih drugih ljudskih tkiva izvan urinarnog trakta (44). Mutacija tumorskog supresorskog gena p53 ukazuje na povezanost urotelijalnog karcinoma s endemskom nefropatijom (79), budući

da ni transverzije A→T, niti AA-DNA adukti nisu nađeni u urotelijalnim tumorima i bubrežnom korteksu pacijenata koji žive u neendemskim područjima, dok kod pacijenata koji žive u endemskim područjima jesu (4,80).

Transporteri organskih aniona nalaze se u proksimalnom kanaliću bubrega, a putem njih izlučuju se ili reapsorbiraju ksenobiotici iz organizma. Nefrotoksična aristolohična kiselina selektivno cilja proksimalni kanalić jer AAI oblik ima negativan naboj s anionskom karboksilnom skupinom što privlači transportera koji olakšava unos istog u bubrežne stanice, a to naposljetku ukazuje na specifično akumuliranje toksina u bubrežnom tkivu. Posljedica akumulacije je moguć nastanak nefropatije i/ili tumora (81).

Nadalje, aristolohična kiselina može prouzročiti povećani oksidacijski stres, što dovodi do oslabljene funkcije bubrega. AAI izaziva oštećenje DNA koje je povezano s oksidacijskim stresom na način da smanjuje antioksidans glutation u proksimalnim tubularnim stanicama ljudskog bubrega (82), povećava slobodne radikale (reaktivne oblike kisika) i vjerojatnost tubularne apoptoze smanjenjem dušikovog oksida koja je dokazana u stanicama bubrega miša (83).

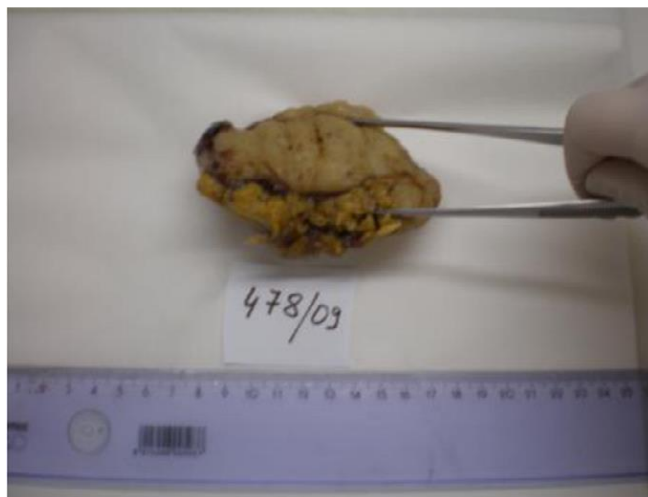
Oksidacijski stres također može biti izazvan interakcijom aristolohične kiseline s NADPH oksidazom te raznim antioksidacijskim enzimima (superoksid dismutazom, katalazom, gvanidinopropionazom) što dovodi do oštećenja mitohondrija i nefrotoksičnosti bubrežnih tubula (84).

Na kraju, još jedan mehanizam povezan s nefrotoksičnošću izazvanom aristolohičnom kiselinom je upala. Nekoliko istraživanja pokazalo je da akutnu fazu nefropatije prati postojana intersticijska upala koja dovodi do fibroze. Fibroza je konačna patološka karakteristika većine kroničnih upalnih bolesti (2,85). Kod životinjskih modela aristolohična kiselina aktivira tumorski faktor nekroze (TNF) i transformirajući čimbenik rasta beta (TGF-beta) koji pokreću niz reakcija dovodeći do aktivacije proupalnih i profibrotičkih gena te tako pospješuju nastanak upale i fibroze (5).

Makroskopski gledano, tipičan nalaz pacijenta s endemskom nefropatijom ukazuje na smanjene bubrege koji na perifernim dijelovima imaju nepravilna i asimetrična tkiva (slika 5). Histologija bubrega bolesnika s balkanskom endemskom nefropatijom u ranom stadiju bolesti pokazuje relativno normalnu veličinu samog bubrega, kortikalnu žarišnu tubularnu atrofiju, intersticijski edem te peritubularnu i glomerularnu sklerozu s ograničenom infiltracijom mononuklearnih stanica

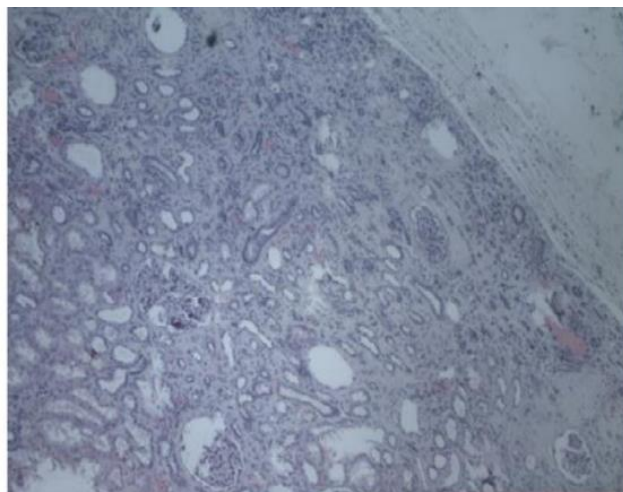
(17). Cijeli niz biopsija zaraženih bubrega također je otkrio opsežne intersticijske fibroze s atrofijama i gubitkom tubula koje počinju od perifernog i napreduju prema vanjskom korteksu (slika 6). Glomeruli su opisani kao nepromijenjeni, iako u kasnijoj fazi bolesti, pokazuju blagi kolaps kapilara i naborane bazalne membrane. Kod nekoliko biopsija uočene su i intersticijske upalne infiltracije što implicira uključenje imunološkog procesa u patološki mehanizam (10) (slika 7).

Poznavanje i razumijevanje molekularnih mehanizama izazvanih aristolohičnom kiselinom od velike je važnosti jer bi moglo pružiti studijski model za istraživanje nefrotoksičnosti bubrega izazvane biljnim proizvodima, lijekovima i nenamjernom konzumacijom te omogućiti otkrivanje zaštitnih mehanizama protiv oštećenja bubrega, endemske nefropatije i karcinoma urinarnog trakta (5).



Slika 5. Makroskopski prikaz bolesnog bubrega.

Izvor: literaturni navod 14.



Slika 6. Mikroskopski prikaz bubrežnog korteksa.

Izvor: literaturni navod 14.



Slika 7. Prikaz presjeka oštećenog bubrega.

Izvor: literaturni navod 14.



## 5. KLINIČKA SLIKA I LIJEČENJE

Klinički znakovi i simptomi endemske nefropatije su nespecifični i često ostaju neprepoznati godinama čak i desetljećima dok ne dođe do značajnog pada funkcije. Nakon početne asimptomatske faze, pacijenti pate od slabosti i malaksalosti, blage lumbalne boli, bljedila kože te bakreno-smeđih promjena boje dlanova i tabana (72). Rani klinički razvoj bolesti manifestira se tubularnom disfunkcijom koja uzrokuje izlučivanje glukoze i proteina u urin. Intermitentna proteinurija koja ukazuje na oštećenje proksimalnih tubula može se rano otkriti, dok u uremijskom stadiju bolesti postaje trajna. U uznapredovalim stadijima bolesti uočena je izrazita tubularna atrofija, ekstenzivna hipocelularna intersticijska fibroza i žarišna glomerularna skleroza. Navedeno se klinički očituje simetričnom redukcijom veličine, kao i gubitkom sposobnosti koncentriranja urina koji prethodi smanjenju brzine glomerularne filtracije, s progresijom do završnog stupnja kronične bubrežne bolesti. Pacijenti su između ostalog imali iznenađujuće visok stupanj anemije koja je povezana sa značajnim gubitkom bubrežne funkcije, hipertenzije, kao i značajan rizik za razvoj urotelne malignosti (86). Konačno, glavna značajka balkanske nefropatije jest jaka povezanost s karcinomom prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava koji također predstavlja najčešći uzrok smrti u pacijenata s ovom nefropatijom. Zloćudni tumor povezan s balkanskom nefropatijom ima iste histološke značajke kao i drugi općeniti oblici urotelijalnih karcinoma, ali je češće bilateralan te rjeđe zahvaća mokraćni mjehur (18).

Osim kod urotelijalnog karcinoma gornjeg trakta, AA-DNA adukti i mutacije tumorskog supresorskog gena p53 također su otkriveni u drugim vrstama raka, kao na primjer karcinomu jetre, što ukazuje na kancerogeni potencijal aristolohične kiseline i na druge organe (87). Klinički gledano, pretpostavlja se da pacijenti s infekcijom virusom hepatitisa B imaju veći rizik od hepatocelularnog karcinoma ako konzumiraju biljne pripravke i prehrambene proizvode koje sadrže aristolohičnu kiselinu te općenito ona ima utjecaj na početak i/ili progresiju karcinoma bubrežnih stanica (54,69).

Donedavno su korišteni različiti dijagnostički kriteriji i postupci na pacijentima kod kojih se sumnja na endemsku nefropatiju. Dijagnoza se obično razmatra kod bolesnika sa sporo progresivnom kroničnom bubrežnom bolešću koji žive na endemskom području ili su se nedavno preselili, pogotovo ako je pozitivna i obiteljska anamneza. Temelji se na prisutnosti neke

kombinacije određenih nalaza: simetrično smežurani, glatki bubrezi bez intrarenalnih ovapnjenja; blago izlučivanje glukoze i proteina u urin, urin niske specifične težine; odgovarajuća vrsta anemije; smanjenje brzine glomerularne filtracije; atipičan izgled tkiva; panel nespecifičnih histoloških nalaza na biopsiji bubrega, iako biopsija bubrega nije potrebna ako su gore navedeni nalazi prisutni kod pacijenta iz endemskog područja ili s pozitivnom obiteljskom anamnezom (8,14).

Što se tiče probira, cjelokupno odraslo stanovništvo endemskog područja treba biti pregledano masovnim pregledima svakih pet godina, a uključuje određivanje tubularne proteinurije, procjenu brzine glomerularne filtracije, broja eritrocita, analizu urina testnom trakicom i citologiju istog. Otkrivene bolesne pacijente treba uputiti lokalnom nefrologu (14).

Liječenje endemske nefropatije je slično kao i kod svih kroničnih intersticijskih nefropatija. Bolesnici trebaju obratiti posebnu pozornost na kardiovaskularni rizik i prestati pušiti, hraniti se zdravo te uravnoteženo i redovito vježbati. Niskoproteinska dijeta može se uključiti u višim stadijima bolesti. Pacijenti se uspješno liječe hemodijalizom, peritonealnom dijalizom, na koncu i transplantacijom bubrega. Bitno je napomenuti da se bolest ne ponavlja nakon transplantacije bubrega, ali bilateralna nefroureterektomija predložena je kao preventivna mjera prije transplantacije. Potrebno je dugotrajno praćenje pacijenata koji duže vrijeme koriste nadomjesnu bubrežnu terapiju jer zbog povećanog rizika mogu razviti urotelijalni karcinom (8), koji treba isključiti prije stavljanja na listu čekanja za transplantaciju bubrega (14). Jedina terapija testirana na ljudima koja djeluje na endemsku nefropatiju je liječenje steroidima, koje je pokazalo ograničeni terapijski odgovor – odgodu napredovanja do završnog stupnja kronične bubrežne bolesti, što nikako nije zadovoljavajuće rješenje (2). Nakon identifikacije belgijskih slučajeva, tijekom godina razvijeni su mnogi eksperimentalni *in vitro* i *in vivo* modeli (88) kako bi dobiveni rezultati objasnili što leži u pozadini molekularnih i staničnih mehanizama patofiziologije balkanske endemske nefropatije, a ona zahtijeva daljnja ispitivanja jer je danas i dalje predmet rasprava među znanstvenicima.

## 6. ZAKLJUČAK

Uporaba biljnih proizvoda i preparata, kao i uobičajena konzumacija prehrambenih proizvoda dobivenih od poljoprivrednih kultura često se smatra bezopasnom, a većina ljudi se osvijesti tek kada se dogodi tragedija s dramatičnim posljedicama kao što je bio slučaj s belgijskim pacijenticama. Taj događaj bio je od ključne važnosti za istraživanje balkanske endemske nefropatije jer je izazvao pozornost svjetske znanstvene zajednice.

Kronična intoksikacija aristolohičnom kiselinom, otrovnim alkaloidom iz biljke vučje stope koja raste na specifičnom endemskom području, glavni je uzročnik endemske nefropatije i usko povezanog urotelijalnog karcinoma. Specifični biomarkeri koji služe za procjenu izloženosti aristolohičnoj kiselini su AA-DNA adukti i karakteristične mutacije, transverzije A→T, pronađene na tumorskom supresorskom genu p53. Genetska predispozicija vjerojatno je odgovorna za osiguravanje ključnih okolnosti nametanja djelovanja drugih okolišnih i endogenih etioloških čimbenika.

Najvažniji zaključak je da se endemska nefropatija može spriječiti jednostavnim mjerama ako se uzme u obzir hipoteza aristolohične kiseline. Danas se sa sigurnošću može predvidjeti, spriječiti i eliminirati kontaminacija brašna sjemenkama biljke *Aristolochia clematitis*, a tome pridonosi i promjena načina života te rada u endemskim područjima. U današnje vrijeme sve je manje obitelji koje peku vlastiti kruh, a radije posežu za industrijsko proizvedenim pekarskim proizvodima što je dovelo do smanjene izloženosti i kontaminacije aristolohičnom kiselinom u prehrani. Raširena uporaba herbicida i uporaba novih tehnika žetve dovela je do smanjenog i kontroliranog rasta vučje stope na poljoprivrednim usjevima, a na nekim područjima i njenu eradikaciju. Vrlo je važno osvijestiti, upozoriti i educirati stanovništvo o navedenim problemima.

Mnogi pomaci u shvaćanju patofiziologije i patologije postignuti su zahvaljujući mnogobrojnim različitim istraživanjima, ali se i dalje u nekim regijama svijeta upotrebljavaju proizvodi koji sadrže aristolohičnu kiselinu. Budući da za sada mehanizmi ireverzibilne nefrotoksičnosti izazvane upravo aristolohičnom kiselinom nisu još u potpunosti razumljivi, a terapijske mjere su ograničene i nepotpuno učinkovite, potrebna su daljnja *in vitro* i *in vivo* istraživanja koja će u budućnosti sigurno dati odgovore na mnogobrojna do sad neodgovorena pitanja.

## 7. LITERATURA

1. Pavlović NM. Balkan endemic nephropathy-current status and future perspectives. *Clin Kidney J.* 2013;6(3):257-265. doi:10.1093/ckj/sft049
2. Anger EE, Yu F, Li J. Aristolochic Acid-Induced Nephrotoxicity: Molecular Mechanisms and Potential Protective Approaches. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1157. doi:10.3390/ijms21031157
3. Vervaet BA, D'Haese PC, Verhulst A. Environmental toxin-induced acute kidney injury. *Clin Kidney J.* 2017;10(6):747-758. doi:10.1093/ckj/sfx062
4. Jelaković B, Karanović S, Vuković-Lela I, et al. Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney Int.* 2012;81(6):559-567. doi:10.1038/ki.2011.371
5. Kiliš-Pstrusińska K, Wiela-Hojeńska A. Nephrotoxicity of Herbal Products in Europe-A Review of an Underestimated Problem. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4132. doi:10.3390/ijms22084132
6. Hranjec T, Kovac A, Kos J, et al. Endemic nephropathy: the case for chronic poisoning by aristolochia. *Croat Med J.* 2005;46(1):116-125.
7. De Broe ME. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney Int.* 2012;81(6):513-515. doi:10.1038/ki.2011.428
8. Stefanovic V, Toncheva D, Polenakovic M. Balkan nephropathy. *Clin Nephrol.* 2015;83(7 Suppl 1):64-69. doi:10.5414/cnp83s064
9. Stiborová M, Arlt VM, Schmeiser HH. Balkan endemic nephropathy: an update on its aetiology. *Arch Toxicol.* 2016;90(11):2595-2615. doi:10.1007/s00204-016-1819-3
10. Jadot I, Declèves AE, Nortier J, Caron N. An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy: Update of the Literature. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):297. doi:10.3390/ijms18020297

11. Djukanović Lj, Radovanović Z. Balkan nephropathy. *Clinical Nephrotoxins*. 2008;843-858. doi:10.1007/978-0-387-84843-3\_38
12. Nikolic J, Pejčić T, Crnomarković D, Gavrilović Z, Tulić CD. Sporadic Balkan Endemic Nephropathy (BEN) beyond the known regions of. *BANTAO Journal*. 2006;4(1):15
13. Bamias G, Boletis J. Balkan nephropathy: evolution of our knowledge. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(3):606-616. doi:10.1053/j.ajkd.2008.05.024
14. Jelaković B, Dika Ž, Arlt VM, et al. Balkan Endemic Nephropathy and the Causative Role of Aristolochic Acid. *Semin Nephrol*. 2019;39(3):284-296. doi:10.1016/j.semnephrol.2019.02.007
15. Cvitković A, Vuković-Lela I, Edwards KL, et al. Could disappearance of endemic (Balkan) nephropathy be expected in forthcoming decades?. *Kidney Blood Press Res*. 2012;35(3):147-152. doi:10.1159/000333836
16. Ceović S, Hrabar A, Sarić M. Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol*. 1992;30(3):183-188. doi:10.1016/0278-6915(92)90031-f
17. De Broe ME. Balkan endemic nephropathy. 2020. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. Dostupno na: <https://www.uptodate.com/contents/balkan-endemic-nephropathy>.
18. Stefanović V, Polenaković M. Fifty years of research in Balkan endemic nephropathy: where are we now?. *Nephron Clin Pract*. 2009;112(2):c51-c56. doi:10.1159/000213081
19. Stefanovic V, Jelakovic B, Cukuranovic R, et al. Diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy: proposal by an international panel. *Ren Fail*. 2007;29(7):867-880. doi:10.1080/08860220701600732
20. Stefanovic V, Cukuranovic R, Miljkovic S, Marinkovic D, Toncheva D. Fifty years of Balkan endemic nephropathy: challenges of study using epidemiological method. *Ren Fail*. 2009;31(5):409-418. doi:10.1080/08860220902839097
21. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12129-12134. doi:10.1073/pnas.0701248104

22. Bui-Klimke T, Wu F. Evaluating weight of evidence in the mystery of Balkan endemic nephropathy. *Risk Anal.* 2014;34(9):1688-1705. doi:10.1111/risa.12239
23. Slade N, Moll UM, Brdar B, Zorić A, Jelaković B. p53 mutations as fingerprints for aristolochic acid: an environmental carcinogen in endemic (Balkan) nephropathy. *Mutat Res.* 2009;663(1-2):1-6. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.01.005
24. Ferenčak K. *Karcinogeneza uzrokovana pušenjem – završni rad.* Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014.
25. Mally A, Hard GC, Dekant W. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: lessons from toxicity studies in rats. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(11):2254-2260. doi:10.1016/j.fct.2007.05.021
26. Mally A, Zepnik H, Wanek P, et al. Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. *Chem Res Toxicol.* 2004;17(2):234-242. doi:10.1021/tx034188m
27. EFSA (European Food Safety Authority) Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. *The EFSA J.* 2006;365:1-56. doi:https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.365
28. Stiborová M, Bárta F, Levová K, et al. The influence of ochratoxin A on DNA adduct formation by the carcinogen aristolochic acid in rats. *Arch Toxicol.* 2015;89(11):2141-2158. doi:10.1007/s00204-014-1360-1
29. Maharaj SV, Orem WH, Tatu CA, Lerch HE 3rd, Szilagyi DN. Organic compounds in water extracts of coal: links to Balkan endemic nephropathy. *Environ Geochem Health.* 2014;36(1):1-17. doi:10.1007/s10653-013-9515-1
30. Orem WH, Tatu CA, Lerch III HE et al. Identification and environmental significance of the organic compounds in water supplies associated with a Balkan endemic nephropathy region in Romania. *J Environ Health Res.* 2004;3:53-61.
31. Orem WH, Tatu CA, Feder GL et al. Environment, geochemistry and the etiology of Balkan endemic nephropathy: lessons from Romania. *Facta Univ Ser Archit Civil Eng.* 2002;9:39-48.

32. Orem WH, Feder GL, Finkelman RB. A possible link between Balkan endemic nephropathy and the leaching of toxic organic compounds from Pliocene lignite by groundwater: preliminary investigation. *Int J Coal Geol.* 1999;40:237-252. doi:[https://doi.org/10.1016/S0166-5162\(98\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0166-5162(98)00071-8)
33. Apostolov K, Spasic P. Evidence of a viral aetiology in endemic (Balkan) nephropathy. *Lancet.* 1975;2(7948):1271-1273. doi:10.1016/s0140-6736(75)90609-1
34. Uzelac-Keserović B, Spasić P, Bojanić N, et al. Isolation of a coronavirus from kidney biopsies of endemic Balkan nephropathy patients. *Nephron.* 1999;81(2):141-145. doi:10.1159/000045269
35. Riquelme C, Escors D, Ortego J, et al. Nature of the virus associated with endemic Balkan nephropathy. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(8):869-870. doi:10.3201/eid0808.020042
36. Karmaus W, Dimitrov P, Simeonov V, Tsoleva S, Bonev A, Georgieva R. Metals and kidney markers in adult offspring of endemic nephropathy patients and controls: a two-year follow-up study. *Environ Health.* 2008;7:11. doi:10.1186/1476-069X-7-11
37. Maksimović ZJ. Selenium deficiency and Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 1991;34:S12-S14.
38. Maksimović ZJ, Djujić I. Selenium deficiency in Serbia and possible effects on health. *Biomed Environ Sci.* 1997;10(2-3):300-306.
39. Batuman V. Fifty years of Balkan endemic nephropathy: daunting questions, elusive answers. *Kidney Int.* 2006;69(4):644-646. doi:10.1038/sj.ki.5000231
40. Arlt VM, Pfohl-Leszkowicz A, Cosyns J, Schmeiser HH. Analyses of DNA adducts formed by ochratoxin A and aristolochic acid in patients with Chinese herbs nephropathy. *Mutat Res.* 2001;494(1-2):143-150. doi:10.1016/s1383-5718(01)00188-7
41. Grollman AP, Jelaković B. Role of environmental toxins in endemic (Balkan) nephropathy. October 2006, Zagreb, Croatia. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(11):2817-2823. doi:10.1681/ASN.2007050537
42. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor

- gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994;54(18):4855-4878.
43. Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis.* 2002;17(4):265-277. doi:10.1093/mutage/17.4.265
44. Arlt VM, Alunni-Perret V, Quatrehomme G, et al. Aristolochic acid (AA)-DNA adduct as marker of AA exposure and risk factor for AA nephropathy-associated cancer. *Int J Cancer.* 2004;111(6):977-980. doi:10.1002/ijc.20316
45. Liu Z, Hergenbahn M, Schmeiser HH, Wogan GN, Hong A, Hollstein M. Human tumor p53 mutations are selected for in mouse embryonic fibroblasts harboring a humanized p53 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2963-2968. doi:10.1073/pnas.0308607101
46. Toncheva D, Dimitrov T. Genetic predisposition to Balkan endemic nephropathy. *Nephron.* 1996;72(4):564-569. doi:10.1159/000188940
47. Atanasova SY, von Ahsen N, Toncheva DI, Dimitrov TG, Oellerich M, Armstrong VW. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 among patients with Balkan endemic nephropathy (BEN). *Clin Biochem.* 2005;38(3):223-228. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.12.002
48. Staneva RG, Balabanski L, Dimova I, et al. Genetic, Genomic and Epigenomic Studies of Balkan Endemic Nephropathy (Ben). *Pril (Makedon Akad Nauk Umjet Odd Med Nauki).* 2015;36(2):101-108. doi:10.1515/prilozi-2015-0058
49. Toncheva D, Dimitrov T, Stojanova S. Etiology of Balkan endemic nephropathy: a multifactorial disease?. *Eur J Epidemiol.* 1998;14(4):389-394. doi:10.1023/a:1007445120729
50. Toncheva D, Mihailova-Hristova M, Vazharova R, et al. NGS nominated CELA1, HSPG2, and KCNK5 as candidate genes for predisposition to Balkan endemic nephropathy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:920723. doi:10.1155/2014/920723
51. Hashimoto K, Higuchi M, Makino B, et al. Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds, contained in some medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 1999;64(2):185-189. doi:10.1016/s0378-8741(98)00123-8
52. Liang A, Gao Y, Zhang, B. Safety problems and measures of traditional Chinese medicine



- containing aristolochic acid. *China Food Drug Admin. Mag.* 2017;11:17-20.
53. Zhang HM, Zhao XH, Sun ZH, et al. Recognition of the toxicity of aristolochic acid. *J Clin Pharm Ther.* 2019;44(2):157-162. doi:10.1111/jcpt.12789
54. Han J, Xian Z, Zhang Y, Liu J, Liang A. Systematic Overview of Aristolochic Acids: Nephrotoxicity, Carcinogenicity, and Underlying Mechanisms. *Front Pharmacol.* 2019;10:648. doi:10.3389/fphar.2019.00648
55. Michl J, Jennings HM, Kite GC, Ingrouille MJ, Simmonds MS, Heinrich M. Is aristolochic acid nephropathy a widespread problem in developing countries? A case study of *Aristolochia indica* L. in Bangladesh using an ethnobotanical-phytochemical approach. *J Ethnopharmacol.* 2013;149(1):235-244. doi:10.1016/j.jep.2013.06.028
56. Balachandran P, Wei F, Lin RC, Khan IA, Pasco DS. Structure activity relationships of aristolochic acid analogues: toxicity in cultured renal epithelial cells. *Kidney Int.* 2005;67(5):1797-1805. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00277.x
57. Yang HY, Chen PC, Wang JD. Chinese herbs containing aristolochic acid associated with renal failure and urothelial carcinoma: a review from epidemiologic observations to causal inference. *Biomed Res Int.* 2014;2014:569325. doi:10.1155/2014/569325
58. Ioset JR, Raelison GE, Hostettmann K. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. *Food Chem Toxicol.* 2003;41(1):29-36. doi:10.1016/s0278-6915(02)00219-3
59. Abdullah R, Diaz LN, Wesseling S, Rietjens IM. Risk assessment of plant food supplements and other herbal products containing aristolochic acids using the margin of exposure (MOE) approach. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2017;34(2):135-144. doi:10.1080/19440049.2016.1266098
60. Zhou Q, Pei J, Poon J, et al. Worldwide research trends on aristolochic acids (1957-2017): Suggestions for researchers. *PLoS One.* 2019;14(5):e0216135. doi:10.1371/journal.pone.0216135

61. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2002;82:1-556.
62. Michl J, Ingrouille MJ, Simmonds MS, Heinrich M. Naturally occurring aristolochic acid analogues and their toxicities. *Nat Prod Rep.* 2014;31(5):676-693. doi:10.1039/c3np70114j
63. Heinrich M, Chan J, Wanke S, Neinhuis C, Simmonds MS. Local uses of Aristolochia species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2--a global assessment based on bibliographic sources. *J Ethnopharmacol.* 2009;125(1):108-144. doi:10.1016/j.jep.2009.05.028
64. Michl J, Bello O, Kite GC, Simmonds MSJ, Heinrich M. Medicinally Used Asarum Species: High-Resolution LC-MS Analysis of Aristolochic Acid Analogs and *In vitro* Toxicity Screening in HK-2 Cells. *Front Pharmacol.* 2017;8:215. doi:10.3389/fphar.2017.00215
65. Shibutani S, Dong H, Suzuki N, Ueda S, Miller F, Grollman AP. Selective toxicity of aristolochic acids I and II. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(7):1217-1222. doi:10.1124/dmd.107.014688
66. Xing G, Qi X, Chen M, et al. Comparison of the mutagenicity of aristolochic acid I and aristolochic acid II in the gpt delta transgenic mouse kidney. *Mutat Res.* 2012;743(1-2):52-58. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.021
67. Stiborová M, Martínek V, Frei E, Arlt VM, Schmeiser HH. Enzymes metabolizing aristolochic acid and their contribution to the development of aristolochic acid nephropathy and urothelial cancer. *Curr Drug Metab.* 2013;14(6):695-705. doi:10.2174/1389200211314060006
68. Stiborova M, Frei E, Arlt VM, Schmeiser HH. The role of biotransformation enzymes in the development of renal injury and urothelial cancer caused by aristolochic acid: urgent questions and difficult answers. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009;153(1):5-11. doi:10.5507/bp.2009.001
69. Chen B, Bai Y, Sun M, et al. Glutathione S-transferases T1 null genotype is associated with susceptibility to aristolochic acid nephropathy. *Int Urol Nephrol.* 2012;44(1):301-307. doi:10.1007/s11255-011-0082-z

70. „Žuta vučja stopa (*Aristolochia clematitis*).“ *Plantea*. Dostupno na: <https://www.plantea.com.hr/zuta-vucja-stopa/>. Pristupljeno 29. 08. 2022.
71. „*Aristolochia clematitis* L. (Common Birthwort).“ *Vogel A. Plant Encyclopaedia*. Dostupno na: [https://www.avogel.com/plant-encyclopaedia/aristolochia\\_clemastitis.php](https://www.avogel.com/plant-encyclopaedia/aristolochia_clemastitis.php). Pristupljeno 29.08.2022.
72. Pavlović NM, Maksimović V, Maksimović JD, et al. Possible health impacts of naturally occurring uptake of aristolochic acids by maize and cucumber roots: links to the etiology of endemic (Balkan) nephropathy (published correction appears in *Environ Geochem Health*. 2013 Jun;35(3):417). *Environ Geochem Health*. 2013;35(2):215-226. doi:10.1007/s10653-012-9477-8
73. Li W, Hu Q, Chan W. Uptake and Accumulation of Nephrotoxic and Carcinogenic Aristolochic Acids in Food Crops Grown in *Aristolochia clematitis*-Contaminated Soil and Water. *J Agric Food Chem*. 2016;64(1):107-112. doi:10.1021/acs.jafc.5b05089
74. Nortier JL, Schmeiser HH, Muniz Martinez MC, et al. Invasive urothelial carcinoma after exposure to Chinese herbal medicine containing aristolochic acid may occur without severe renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(2):426-428. doi:10.1093/ndt/18.2.426
75. Schmeiser HH, Nortier JL, Singh R, et al. Exceptionally long-term persistence of DNA adducts formed by carcinogenic aristolochic acid I in renal tissue from patients with aristolochic acid nephropathy. *Int J Cancer*. 2014;135(2):502-507. doi:10.1002/ijc.28681
76. Lukin M, Zaliznyak T, Johnson F, de los Santos C. Structure and stability of DNA containing an aristolactam II-dA lesion: implications for the NER recognition of bulky adducts. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(6):2759-2770. doi:10.1093/nar/gkr1094
77. Hoang ML, Chen CH, Chen PC, et al. Aristolochic Acid in the Etiology of Renal Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(12):1600-1608. doi:10.1158/1055-9965.EPI-16-0219
78. Stiborová M, Arlt VM, Schmeiser HH. DNA Adducts Formed by Aristolochic Acid Are Unique Biomarkers of Exposure and Explain the Initiation Phase of Upper Urothelial Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2144. doi:10.3390/ijms18102144

79. Moriya M, Slade N, Brdar B, et al. TP53 Mutational signature for aristolochic acid: an environmental carcinogen. *Int J Cancer*. 2011;129(6):1532-1536. doi:10.1002/ijc.26077
80. Arlt VM, Schmeiser HH, Pfeifer GP. Sequence-specific detection of aristolochic acid-DNA adducts in the human p53 gene by terminal transferase-dependent PCR. *Carcinogenesis*. 2001;22(1):133-140. doi:10.1093/carcin/22.1.133
81. Dickman KG, Sweet DH, Bonala R, Ray T, Wu A. Physiological and molecular characterization of aristolochic acid transport by the kidney. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(2):588-597. doi:10.1124/jpet.111.180984
82. Yu FY, Wu TS, Chen TW, Liu BH. Aristolochic acid I induced oxidative DNA damage associated with glutathione depletion and ERK1/2 activation in human cells. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(4):810-816. doi:10.1016/j.tiv.2011.01.016
83. Declèves AÉ, Jadot I, Colombaro V, et al. Protective effect of nitric oxide in aristolochic acid-induced toxic acute kidney injury: an old friend with new assets. *Exp Physiol*. 2016;101(1):193-206. doi:10.1113/EP085333
84. Pozdzik AA, Salmon IJ, Debelle FD, et al. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int*. 2008;73(5):595-607. doi:10.1038/sj.ki.5002714
85. Honarpisheh M, Foresto-Neto O, Steiger S, et al. Aristolochic acid I determine the phenotype and activation of macrophages in acute and chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2018;8(1):12169. doi:10.1038/s41598-018-30628-x
86. Lash LH. Environmental and Genetic Factors Influencing Kidney Toxicity. *Semin Nephrol*. 2019;39(2):132-140. doi:10.1016/j.semnephrol.2018.12.003
87. Rosenquist TA, Grollman AP. Mutational signature of aristolochic acid: Clue to the recognition of a global disease. *DNA Repair (Amst)*. 2016;44:205-211. doi:10.1016/j.dnarep.2016.05.027
88. Huang L, Scarpellini A, Funck M, Verderio EA, Johnson TS. Development of a chronic kidney disease model in C57BL/6 mice with relevance to human pathology. *Nephron Extra*. 2013;3(1):12-29. doi:10.1159/000346180

## 8. ŽIVOTOPIS

Helena Ilijanić rođena je 06. travnja 2001. godine u Rijeci gdje je pohađala Osnovnu školu „Kantrida“ u razdoblju od 2007. do 2015. godine. Salezijansku klasičnu gimnaziju u Rijeci završila je 2019. godine te iste godine upisuje Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Aktivno se služi engleskim jezikom i programima MS Office paketa u radu na računalu.