

Znanstveno-stručni skupovi

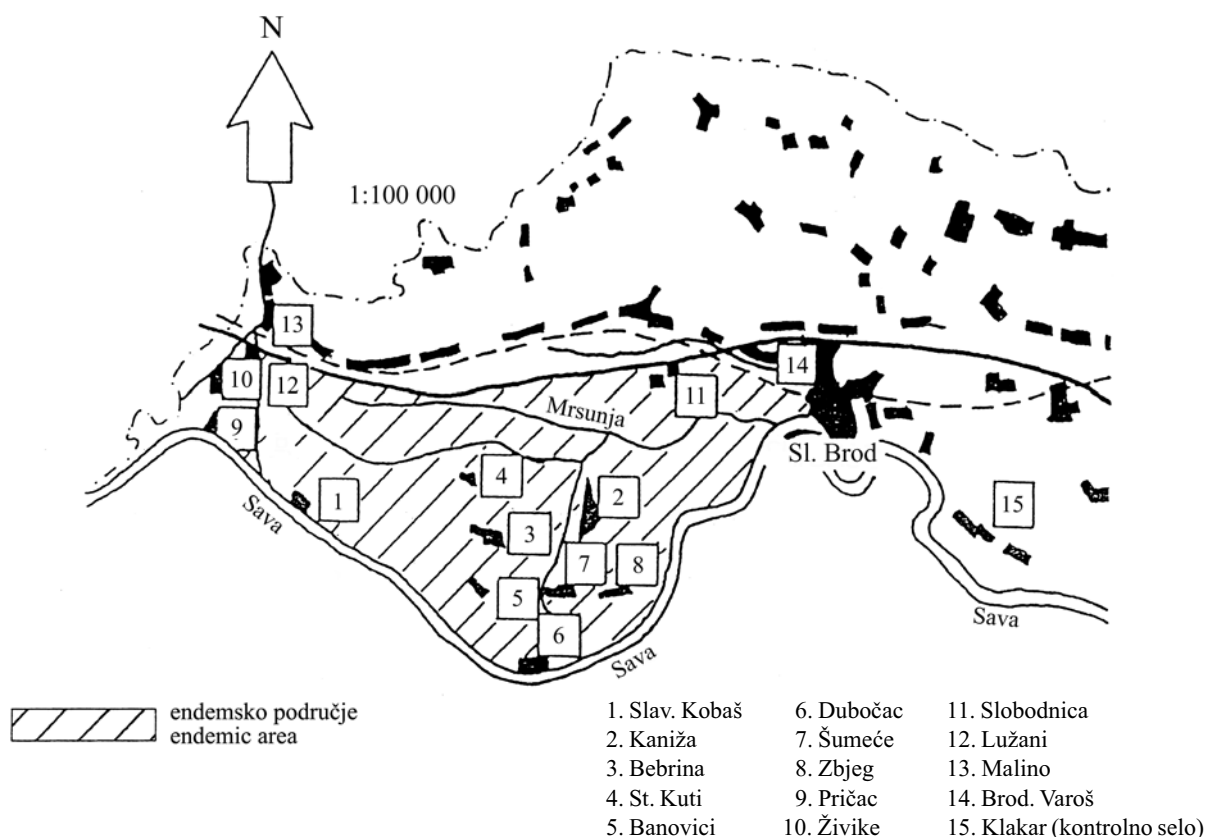
Scientific-Professional Meetings

Osvrt na međunarodni znanstveni skup o endemskoj nefropatiji, 20–22. listopada 2006., Zagreb.

Prije 10 godina održan je sličan međunarodni skup o endemskoj nefropatiji (EN) također u Zagrebu. Namjera je tada bila prikazati sve do tada uočene spoznaje o naravi ove još uvijek misteriozne bolesti, a istovremeno potaknuti znanstvenu javnost, kako domaću tako i inozemnu, na daljnje istraživanje. No, vrijeme je prolazilo bez većeg interesa domaćih stručnjaka za ovu neriješenu specifičnu problematiku. Istovremeno je uočena slična bolest u Belgiji kod žena, koje su u želji smanjenja prekomjerne tjelesne težine, pile čaj kineskog porijekla i pri tom dospjele u terminalnu bubrežnu insuficijenciju [1]. Iz čaja u kojem je identificirana biljka *Aristolochia fangchi* ekstrahirana

je aristolohična kiselina (AA), od ranije poznata kao nefrotoksična i kancerogena tvar [2, 3]. Kod belgijskih bolesnica klinički tijek bolesti bio je ubrzan u odnosu na endemske nefropate. Imale su ekstremno smanjene bubrege, tubularne lezije s hipocelularnom intersticijskom fibrozom i popratnim neoplastičnim promjenama na epitelu gornjih dijelova urotrakta. Takva obilježja aristolohične nefropatije (AAN), nametnula su pitanje, nije li to slična ili identična bolest s endemskom nefropatijom u zemljama jugoistočne Europe, pa tako i u zapadnoj Brodskoj Posavini u Hrvatskoj [4].

Namjera nedavno održanog međunarodnog skupa u Zagrebu upravo je bila pokazati novije rezultate toksične i kancerogene učinke AA s posebnim osvrtom na njezinu prisutnost u biljci *Aristolochia clematitis*, prisutne u endemskom području i njezine moguće uloge u nastanku



Slika 1. Endemsko područje sa selima pokraj Slavonskog Broda
Figure 1. Endemic area with villages near Slavonki Brod, Croatia

EN. Isto je tako bio cilj i prikazati gotovo identične toksične efekte okratoksina A (OTA) na bubreg. OTA je porijeklom iz nekoliko vrsta plijesni, za koju se također pretpostavlja kao mogući uzrok bolesti. Trebalo je pokušati usporediti ove dvije hipoteze i pri tome procijeniti koja bi mogla biti u prednosti.

A. P. Grollman is State University of New York at Stony Brook – USA [5], otkriva na temelju epidemiološke i molekularne studije DNA adduct aristolohične kiseline u bubrežnom tkivu nekoliko bolesnika od EN kao i u epitelnim tumorima gornjih dijelova urotakta također stanovnika iz endemskog kraja Hrvatske. U nizu nalaza pronalazi mutacije p53 gena, što rijetko uočava inače u urotelijalnim tumorima. Predočava hipotezu o toksičnom djelovanju AA iz sjemena *A. clematitis*, koje se prigodom žetve miješa s pšeničnim zrnjem i preko brašna i kruha unosi u ljudski organizam [6]. J. P. Cosyns iz Universite Catholique de Louvain – Brussels, Belgija [7] opisuje patološku sliku bubrega uzrokovanu aristolohičnom kiselinom kod belgijanki (AAN) kao hipocelularnu kortikointersticijsku fibrozu, udruženu s tubularnom atrofijom i globalnom sklerozom glomerula, opadajući od vanjskog prema unutarnjem korteksu. Morfometrijskom analizom ističe identičnost nalaza AAN i EN. Upozorava na uočene patomorfološke razlike prema promjenama izazvane drugim nefrotoksičnim noksama (kadmij, olovo i fosamid), gdje uz intersticijsku fibrozu nema urotelijalnih karcinoma ili opadajućeg kortikomedularnog gradijenta (izuzev kadmija). Razlikuje i analgezijsku intersticijsku fibrozu, koja je hipercelularna i bez uočenog gradijenta. Isto tako razlikuje i intersticijsku fibrozu uzrokovanu okratoksinom A obzirom na celularitet i mogući kortikomedularni gradijent. Iako pridodaje da morfološka slika intersticijske fibroze nije patognomonična za AAN i EN, ipak se patohistološkim nalazom suprostavio drugoj etiopatogenetskoj hipotezi o mogućoj ulozi OTA u nastanku EN.

Naime, OTA [8, 9, 10, 11, 12] je poznata nefrotoksična, genotoksična, mutagena i karcinogena supstanca kumulativnog djelovanja, koju producira nekoliko vrsta plijesni iz roda *Aspergillus*-a i *Penicillium*-a. Sva obilježja predstavljena su od niza istraživača, koji su obavljali detekciju OTA u prehrambenim namirnicama i stočnoj hrani kroz nekoliko proteklih desetljeća, ne samo u endemskim, nego i u kontrolnim široko rasprostranjenim područjima. OTA je pronađena u krvi i mokraći ljudi i majčinom mlijeku. Osim nefrotoksičnosti, OTA izaziva i bubrežne tumore u miševa i štakora, kao i oštećenja DNA te promjene na kromosomima stanica sisavaca in vitro i miševa in vivo [12]. Kod bolesnika s tumorima urinarnog trakta, koji su imali visoki unos OTA, visoku koncentraciju u plazmi i tkivu, uočeni su biomarkeri biološkog efekta kao što su DNA adduct [13]. Određena dilema pojavljuje se što se OTA nalazi u prehrambenim namirnicama kao i u biološkom materijalu ne samo u endemskim područjima, nego i izvan njih. Ipak, najveće dobivene koncentracije su uvijek

bile samo u žarištima bolesti. Nameće se zato misao na sinergističko djelovanje i drugih nefrotoksina (npr. fumozin FB₁) [10]. Iako sva ta opažanja upućuju na moguću implikaciju OTA na nastanak EN, konačnog zaključka još nema.

U rješavanju krucijalnog pitanja etiopatogeneze EN i rasvjetljavanja ovih dviju za sada ne samo najaktualnijih, nego i najizazovnijih hipoteza, nedvojbeno je da su i OTA i AA nefrotoksične, kancerogene, genotoksične i mutagene supstance. To zorno potvrđuje obolijevanje belgijskih žena, koje su intezivno unosile AA putem čaja [4], kao i na danskim farmama uočena nefropatija svinja hranjenih zagađenom hranom OTA [14]. Važna karika za prihvaćanje bilo koje hipoteze je identifikacija mogućeg puta i načina unosa noksne u izloženoj populaciji endemskog kraja.

Toksičnost *A. clematitis* nam je odavno u pažnji iz publikacija Martinčića (1957) [2], pa zatim Kazantzisa (1967) [15] i Ivića (1969) [3]. *A. clematitis* je ubikvitarni korov u endemskom području, najčešće nađena u međama, uz obale, kanale i zapuštene oranice, a rjeđe u obrađenim površinama, npr. u pšenici, vrtnim kulturama ili uređenim pašnjacima i livadama [16]. Biljka je rasprostranjena u endemskim područjima Brodske Posavine i u brdskim dijelovima Županije, kao i uopće širom jugoistočne Europe, pa i dalje gdje nema EN. Naraste 60–70 cm, cvate ponajviše u svibnju i lipnju, a zrelo sjemenje se može naći tek pri kraju ljeta ili u jesen. Ostaje važno pitanje je li mogući unos sjemena ili njegovih razlomljenih dijelova putem brašna u ljudski organizam, kako to iznose predstavnici AA hipoteze [5, 6].

Ako preskočimo vršidbu pšenice na guvnu, uz pomoć konjskih kopita prije 100 godina i posjedovanje malih obiteljskih vodenica, gdje se obavljala meljava vlastitog zrnja i prisjetimo se početka XX. stoljeća, onda se slika bitno mijenja. Nakon obavljene žetve, uobičajene u prvoj polovici srpnja, slijedila je strojna vršidba vršalicama. Pri tadašnjoj vršidbi vjetrenjem i prosijavanjem odvajao bi se kukolj od pšeničnog zrnja. Taj otpad, gdje su se mogle naći i eventualno nezrele sjemenke *A. clematitis* ili njezini dijelovi, sigurno nije korišten za ljudsku prehranu. Moguće je ipak da je bačen kao hrana pred perad ili svinje i tako posredno dospjevao preko jaja ili mesa u čovjeka. Poslije vršidbe pšenicu se vozilo u većim količinama na meljavu prema 5–6 modernijih većih mlinova na rijeci Orpljavi, razmještenih od Slavenskog Kobaša preko Lužana sve do Brodskog Drenovca. Tu su pristizali ratari na svojim kolima s konjskim zapregama ne samo iz endemskih sela nego i iz drugih smještenih ispod obronaka Dilj gore, kao i onih iz brdskih dijelova gdje nema žarišta bolesti. Pšenica se dovozila rano ujutro, izvagala i stresala u veliki koš mlinskog kola, a u toku dana se istim redom dobivala određena količina brašna. Znači da je porijeklo dobivenog brašna moglo biti od bilo kojeg vlasnika koji je tog jutra punio koš. Usprkos tom miješanju pšenice iz širokog područja

zapadnog kraja Brodske Posavine, EN je kroz cijelo 50-godišnje razdoblje ostala samo u 10-tak nizinskih sela grupiranih u južnom dijelu tog bazena. Unaprijeđenjem tehnike, vršalice uzmiču pred žitnim kombajnima 70-ih godina prošlog stoljeća. Istovremeno se pšenica odmah odvozi u velika mlinska skladišta, a svaki vlasnik bi podizao brašno tijekom godine prema potrebi. Postoji mogućnost da se dio pšenice čuvao i u vlastitim spremištima, ali u postojećim mlinovima se obavljala opet zamjena za brašno već samljeveno od pšenice ubrane na bilo kojem mjestu gravitirajućeg područja. U suvremenijim mlinovima, a to znači i onim na rijeci Orljavi, kao i današnjim, obavljalo se ponovno prosijavanje i čišćenje zrna radi uklanjanja sitnih dijelova slame, pljeve i korova, dakle ponovno barijera za bilo koji kukolj ili dijelove raznog bilja dovezenog u vreći s pšenicom. Zbog svega toga važno bi bilo saznati kakvi su nalazi AA ne samo u brašnu uzorkovanog u domaćinstvu s EN, nego i u susjedstvu gdje nije bilo bolesti, kao iz širokog kruga naselja bez EN. Takvih podataka, po mogućnosti iz više izvora, za brodsko-posavsko žarište sada nema. Osim toga, posljednjih 10–15 godina u nekim seoskim kućama kruh se više ne peče redovito, nego se povremeno ili stalno kupuje u trgovini. Ako izuzmemo sjemenke *Aristolochiae clematitis*, vjerovatnost unosa AA nekim drugim putem, npr. razmravljenim suhim lišćem prigodom vršidbe zanemariva je zbog dvostrukog prosijavanja i vjetrenja u daljnjem postupku. Da li je unos moguć putem čaja, kao što su činile adipozne Belgijanke, pitao sam kroz niz godina ne samo bolesnike nefropate, nego i ostale. Odgovor je bio uvijek nijedan. Obzirom na jaki i relativno dugi korijen *A. clematitis*, kojeg je teško u cijelosti iščupati, može se razmišljati o potencijalnom zagađenju tla, a tako i podzemnih voda s AA. No i taj put je presiječen izgradnjom najprije seoskih dubokih arteških bunara po endemskim selima 60-ih i 70-ih godina XX. stoljeća, a iza 80-ih izgradnjom vodovodne mreže crpilišta u Slavanskom Brodu.

Mogući unos mikotoksina putem pljesnive hrane lakše je razumljiv, pogotovo uzimajući stanje sela između dva Svjetska rata i neposredo poslije. Kukuruz je tada u Posavini bio glavna živežna namirnica za stoku i ljude. Skladištilo se u jesen na tavanu seoskih kuća, gdje je zbog nedovoljnog prozračivanja i sušenja često pljesnivio. Zasnih 30-ak godina takva praksa je postupno iščezla, jer su se gradili kukuruzni koševi izloženi suncu i vjetru, u kojima je mogućnost kvarenja znatno smanjena. Druga najčešća namirnica izložena pljesnivosti je suho svinjsko meso. Od početka zime do početka proljeća bilo je obješeno na tavanu stambenih kuća radi dimljenja, a onda kad sunce ugrije krovove, prenosilo bi se u nedovoljno suhe i prozračne smočnice. Pljesnivost je bila česta pojava s dokazanom prisutnošću OTA. I ova praksa sušenja i čuvanja suhomesnatih proizvoda napuštena je već više desetljeća izgradnjom »pušnica« u kojima je, uz dimljenje, osigurano i provjetranje i gdje bi meso ostajalo do konačne upotrebe. Treba spomenuti također hladnjake i zamrzi-

vače, kao i njihovu ulogu u čuvanju svježih namirnica i onih suhomesnatih. Prisutnost rashladnih uređaja u seoskim domaćinstvima broji već drugo ili treće desetljeće, a kod nekih i dulje. Ovim životnim promjenama ili uvjetima treba nadodati napuštanje vodoopskrbe iz vlastitih bunara i korištenje iz javnog vodovoda, uz porast općeg i osobnog higijenskog standarda. Smanjen je rizik izlaganja glodavcima u kući (na tavanu nema skladišta hrane), kao i u polju, gdje nema više kopača, žetelaca i kosača, nego se radi traktorom i strojevima. Na pašnjacima i ritovima nema ni stoke niti njihovih čuvara. Shvaćajući nastanak EN kao posljednicu ekološko ambijetalnih okolnosti, nameće se pitanje, ima li koja navedena promjena odraza na incidenciju bolesti.

Prateći sustavno bolest u brodsko-posavskom žarištu kroz minulo 50-godišnje razdoblje, uočava se blagi pad u većini ispitivanih sela zadnjih dvadesetak godina. Osobiti primjer su dva najveća sela Kaniža i Slavonski Kobaš. Uočeni trend pada proizilazi iz terenskih dugogodišnjih populacijskih ispitivanja s istim dijagnostičkim kriterijima [18]. Pad bolesti podupiru i podaci pada bolničkog morbiditeta novooboljelih bolesnika na Odjelu za unutarnje bolesti Opće bolnice u Slavskom Brodu. Procjenu u kraćim vremenskim razdobljima, osobito ako se radi o tihoj endemiji kao što je EN, treba davati s oprezom [19].

Pad incidencije i prevalencije javljaju i bugarski autori u endemskom području Vratza, jednom od najpoznatijih i najranije uočenom žarištu bolesti [20, 21]. Pad je prisutan i u području Južne Morave u Srbiji [22, 23], a najavljuje se indirektno prema učešću endemskih nefropata na kroničnoj dijalizi i u sjeveroistočnoj Bosni [24]. No i neki drugi klinički parametri govore o promjeni prirode bolesti. EN se javlja u posljednje vrijeme u kasnijoj životnoj dobi, najčešće u 6. i 7. desetljeću života, a nema više primjera njezine agresivnosti kao kada su 40-godišnjaci i mlađi započeli i razvili bolest do terminalne faze za kraće od godinu dana [18]. Polazeći sa stanovišta jedne ili druge najaktualnije etiopatogenetske hipoteze, promjenu naravi bolesti vezati uz okolišna zbivanja je kompleksan ali i riješiv zadatak. Do odgovora treba uložiti puno truda, identificirati stvarni mogući put unosa nokse u organizam, njezinu količinu i dinamiku, kao i uz koju eventualnu asistenciju drugih stimulirajućih čimbenika uključujući i one genetsko-mutagene naravi, može nastupiti bolest endemskog obilježja.

I na kraju može se zapitati, ako su na Simpoziju spomenute i neke druge vizije nastanka EN, npr. hereditarne naravi ili one o toksičnim organskim supstancama iz ugljena, zašto nije bilo ni riječi o virusnoj hipotezi. A. Hrabar i B. Aleraj su nastanak EN pretpostavili kao bolest prirodnog žarišta [25]. Prikupljene su tisuće mišolikih glodavaca po njivama, livadama i šumarcima endemskih sela, napravljeni su kartogrami lokacija zemljišnih parcela nefropata, no dalje se nije išlo niti došlo do bilo kojeg zaključka. Pitam se što bi o EN mogli reći i infektolozi,

ako ne vezano uz koju radnu hipotezu, onda već i zbog toga, što je u brodsko-posavskom žarištu prvo masovno terensko ispitivanje 1957–58. obavila infektologinja dr. Olga Pichler (uz pomoć tada mladog budućeg infektologa dr. Emila Bobinca), ostavila vrlo urednu kartoteku svih ispitivanja i time dala temelj daljnjeg praćenja i izučavanja [27].

Literatura

- [1] Cosyns JP, Yadoul M, Squifflet JP et al. Chinese herbs nephropathy: A clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int* 1994; 45:1680–1688.
- [2] Martinčić M. Toxisce Einwirkungen der Aristolochia cleamtitis auf die Niere des Pferdes. *Vet arh* 1957;27:51.
- [3] Ivić M. Problem etiologije endemske nefropatije. *Liječ vjesn* 1969;91:1273–1281.
- [4] Cosyns JP. Aristolochic acid and »Chinese herbs nephropathy«: a review of the endemice to date. *Drug Saf* 2003;26(1):33–48.
- [5] Grollman AP. Evidence for the role of aristolochic acid in endemic (Balkan) nephropathy. *Coll Antropol* 2006;30(S1):23–23.
- [6] Hranjec T, Kovač A, Kos J et al. Dietary exposure to Aristolochia clematitis is a risk factor for endemic nephropathy. *Coll Antropol* 2006;30(S1):37–37.
- [7] Cosyns JP. Aristolochic acid nephropathy: a pathological clue to (balkan) nephropathy? *Coll Antropol* 2006;30(S1): 29–29.
- [8] O'Brien E, Dietrich DR. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit Rev Toxicol* 2005;35(1):33–60.
- [9] Fuchs R, Peraica M. Ochratoxin A in human Kidney diseases. *Food Addit contam* 2005;22(S1):53–57.
- [10] Peraica M, Domijan AM. Endemic Nephropathy and exposure to mycotoxins. *Coll Antropol* 2006;30(S1):15–15.
- [11] Abouized MM, Horvath AD, Podlesny PM et al. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Addit Contam* 2002;19(8):755–764.
- [12] Walker R, Larsen JC, Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising. *Food Addit Contam* 2005;22(A1):6–9.
- [13] Castegnaro M, Canades D, Vrabcheva T et al. Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(6):519–529.
- [14] Krogh P, Hald B, Pedersen EJ. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* 1973;81:689–695.
- [15] Kasantzis G. General discussion. U: Wolstenholme GEW and Knight JJ, ur. *The Balkan Nephropathy*. London: Churchill Ltd; 1967:100–120.
- [16] Willfort R. Ljekovito bilje i njegova upotreba. Zagreb: Mladost; 1974: 475–476.
- [17] Čeović S. Endemska nefropatija u Brodskoj Posavini. *Infektološki glasnik* 1998;18(3):67–72.
- [18] Čeović S, Miletić-Medved M. Epidemiological features of endemic nephropathy in the focal area of Brodska Posavina, Croatia. U: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, ur. *Endemic Nephropathy in Croatia*, Zagreb: Academia Croatica Scientiarum Medicorum, 1996:7–21.
- [19] Miletić-Medved M. Prevalence of endemic nephropathy and urothelial cancers in Croatia. *Coll Antropol* 2006;30(S1):43–43.
- [20] Dimitrov PS, Simeonov VA, Ganev VS et al. Is the incidence of Balkan endemic nephropathy decreasing? *Pathol Biol* 2002; 50(1):38–41.
- [21] Dimitrov P, Karmaus W, Simeonov V. Current research on Balkan Endemic nephropathy in the Vratza region of Bulgaria. *Coll Antropol* 2006;30(S1):42–42.
- [22] Čukuranović R, Petrović B, Čukuranović Z et al. Balkan endemic nephropathy: a decreasing incidence of the disease. *Pathol Biol* 2000;48:558–561.
- [23] Marković N, Ignjatović I, Čukuranović R et al. Decreasing incidence of urothelial cancer in a Balkan endemic nephropathy region in Serbia. A surgery based study from 1969–1998. *Pathol Biol* 2005;53:26–29.
- [24] Mesić E, Lukić L, Dolenec L et al. Balkan endemic nephropathy in Bosnia and Hezegovina – renal registry report. *Med Arh* 2006; 60(4):240–242.
- [25] Hrabar A, Aleraj B. Na čemu se osniva hipoteza da je endemska nefropatija bolest prirodnog žarišta. *Med vjesn* 1998;20:67–72.
- [26] Pichler O, Bobinac E, Miljuš B et al. O učestalosti pojavi bubrežnih oboljenja u okolici Slavonskog Broda. *Liječ Vjesn* 1959;81: 295–306.
- [27] Bobinac E. Endemska nefropatija – 45 godina poslije, *Infektol glas*, 2002; 22(3):123–125.

Prim. dr. sc., Stjepan Čeović
epidemiolog u mirovini, Slavonski Brod