

COMMENT

ULOGA MIKOTOKSINA U ETIOLOGIJI  
ENDEMSKE NEFROPATIJE  
(u povodu nedavno održanog  
Međunarodnog simpozija o etiopatogenezi  
i ranoj dijagnostici endemske nefropatije)

MARKO ŠARIĆ, MAJA PERAIĆ, BOŽICA RADIĆ I ANA LUCIĆ

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada,  
Zagreb*

Međunarodnom simpoziju o etiopatogenezi i ranoj dijagnostici endemske nefropatije, koji je održan u Zagrebu i Slavonskom Brodu 7.-9. studenoga 1996., prethodilo je više domaćih i međunarodnih skupova na kojima su razmatrani problemi endemske nefropatije. Posebno treba spomenuti Radni sastanak o endemskoj nefropatiji koji je pod pokroviteljstvom Razreda za medicinske znanosti JAZU (sada: HAZU) a u organizaciji Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada održan 1989. u Zagrebu. Radovi s tog skupa uz manje dopune bili su objavljeni 1992. godine u međunarodnom časopisu *Food and Chemical Toxicology* (1). Na tom je skupu važno mjesto zauzela pretpostavka o ulozi mikotoksina u etiologiji endemske nefropatije te je cjelovito prikazana i obrađena. Uloga mikotoksina okratoksina A u nastanku endemske nefropatije već se niz godina istražuje u Laboratoriju za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI) (2-7), gdje je i prvi put dokazana njegova prisutnost u krvi ljudi (8). S vremenom su poboljšane tehnike mjerenja okratoksina A u serumu te je, uz spektrofluorimetrijsku metodu, uvedena i osjetljivija metoda, visokotlačna kromatografija (9). Prikupljeni su podaci o izloženosti ljudi u endemskom i u kontrolnim područjima tom mikotoksinu izravnim mjerenjem njegove koncentracije u biološkom materijalu (serumu) (10).

Na nedavno održanom Simpoziju u Zagrebu i Slavonskom Brodu, s obzirom na etiopatogenezu endemske nefropatije, ponovno je pažnja bila posvećena mikotoksini-ma, a posebice okratoksinu A kao mogućem uzročniku endemske nefropatije. Već u uvodnom izlaganju iznesena je ta pretpostavka (R. Fuchs i S. Čević), a dobila je svoje mjesto i u raspravi oko okruglog stola u završnom dijelu Simpozija. Neki od sudionika te rasprave, (posebno C. D. Gergov s Odjela za nefrologiju Visoke medicinske škole

u Sofiji, Bugarska), eksplicitno su zastupali tu pretpostavku. Ipak, pitanje je i dalje ostalo otvoreno, iako ni jedna druga pretpostavka, uključujući virusnu, nije ozbiljnije razmatrana.

U osvrtu na održana izlaganja i rasprave o dosadašnjim spoznajama u provedenim istraživanjima, postavlja se pitanje mogu li se izvući kakvi konkretniji zaključci s obzirom na nastanak endemske nefropatije. Je li učinjen značajniji pomak koji bi dao pouzdanu potporu pretpostavci o ulozi okratoksina A u nastanku endemske nefropatije? Koji argumenti idu u prilog toj pretpostavci?

Okratoksin A je nefrotoksičan za sve do sada ispitivane životinjske vrste (11-13). Dokazano je da je imunotoksičan (14, 15). Na Simpoziju o endemskoj nefropatiji održanom u Zagrebu i Slavonskom Brodu u studenome 1996. izneseni su rezultati istraživanja mutagenosti (J. Fink-Gremmels), kao i o genotoksičnosti okratoksina A (A. Pfohl-Leskowicz i M. Castegnaro). Dokazi o karcinogenosti ovog mikotoksina već ranije su detaljno obrađeni na Međunarodnom simpoziju koji je održan u Lyonu godine 1991. u organizaciji Međunarodne agencije za ispitivanje raka. Karcinogenost okratoksina A također upućuje na moguću ulogu okratoksina A u nastanku endemske nefropatije, budući da je u područjima s endemskom nefropatijom incidencija malignoma u gornjem dijelu urotela značajno veća od očekivane (16). Osim po mnogo većoj učestalosti u područjima endemske nefropatije, ovi se tumori razlikuju od tumora iste lokalizacije u ljudi iz kontrolnih područja po tome što se javljaju u ranijoj životnoj dobi, češći su u žena, zahvaćaju bubrežnu nakapnicu i mokraćovod, često se javljaju na više mjesta i obično su maligni (17). Stoga je opravdano pretpostaviti da je jednaki uzročnik endemske nefropatije kao i malignoma urotakta.

Brojnim je analizama dokazana prisutnost okratoksina A u pojedinim namirnicama koje uživaju osobe u endemskom području. Prema podacima IMI-ja, okratoksin A nađen je u grahu (18), ječmu, pšenici i kukuruzu (18, 19). Kukuruz se u endemskom kraju upotrebljava i kao ljudska hrana i kao hrana za domaće životinje. Okratoksin A nađen je u serumu i u bubrežima svinja iz endemskog kraja (4), a dokazano je da se može naći u jajima ptica (20). Stoga se može pretpostaviti da su ljudi endemskog kraja izloženi ovom toksinu izravno iz žitarica, kao i preko domaćih životinja, odnosno njihovih produkata.

Neki autori smatraju da okratoksin A nije uzročno povezan s nastankom nefropatije budući da su mikotoksini, uključujući i okratoksin A, svugdje prisutni. Točno je da se okratoksin A može naći u serumu ljudi i ondje gdje nefropatije nema (21). Važno je naglasiti da je, prema istraživanjima IMI-ja, okratoksin A nađen i u endemskim i u kontrolnim područjima, no u endemskom području njegova je prisutnost ustanovljena znatno češće a i koncentracije su u pravilu bile više (10). Okratoksin A je toksin plijesni rodova *Penicillium* i *Aspergillus*. Plijesni proizvode okratoksin A samo kod određene temperature i vlage, koja je specifična za svaki soj (22). Istraživanja izloženosti ljudi iz endemskog kraja u IMI-ju provedena su uvijek u rano proljeće, te je moguće da je relativno mala učestalost nalaza okratoksina A u serumu ljudi posljedica vremenskih prilika u tom razdoblju.

Prisutnost nekog toksičnog spoja u okolišu ili u organizmu čovjeka ne znači da taj spoj i ima otrovni učinak. Važna je veličina doze, dinamika i trajanje unosa dotičnog spoja (agensa) u organizam. Razumije se da su pritom važni i metabolički procesi i tzv. vrijeme polovičnog raspada određenog spoja (agensa), tj. koliko se dugo zadržava u organizmu. Važnu ulogu imaju i svojstva ciljnog organa. U slučaju bubrega mogućnosti

funkcionalne kompenzacije strukturnog oštećenja posebice su izražene. Navedene spoznaje ne mogu se primijeniti na karcinogenezu s obzirom na nelinearnost odnosa između doze i učinka. Podaci koji se temelje na istraživanjima provedenim na endemskom području u nas ne pokazuju linearnu povezanost između nefropatije i malignoma urotakta, iako je, kako je već prije naglašeno, rak urotakta relativno čest u osoba s nefropatijom (16).

Tijekom aktivnosti usmjerenih na to da se razjasne uzroci endemske nefropatije u nas, postavilo se pitanje da li treba čekati na definitivne rezultate istraživanja ili, neovisno o tome, poduzimati određene mjere koje bi mogle povoljno utjecati na smanjivanje incidencije bolesti. Stoga je bilo predloženo lokalnim vlastima i stanovništvu da se, u okviru raspoloživih mogućnosti, nastoje unaprijediti komunalni uvjeti (uređenje prometnica, odgovarajuća vodoopskrba, zaštita od poplava i sl.). Posebice je bila naglašena potreba poboljšanja uvjeta stanovanja. Naglašena je važnost prikladnijeg pohranjivanja žitarica izgradnjom jednostavnih spremnika s dobrim provjetravanjem.

Ne možemo se upustiti u analize u kojoj su mjeri poduzete aktivnosti dale rezultate, no neosporna je činjenica da je zadnjih 15-20 godina došlo do pozitivnih pomaka u kretanju bolesti. Dob oboljelih i umrlih je izmijenjena i sada u većoj mjeri oboljevaju starije osobe (23), a produljeno je vrijeme preživljavanja pacijenata nakon postavljanja dijagnoze (10). Učestalost oboljevanja se smanjuje (23), što se očitivalo i u bolničkom morbiditetu, unatoč činjenici da je u međuvremenu unaprijeđena dijagnostika bolesti i mogućnost njezina liječenja (organiziranjem Odjela za kroničnu dijalizu u bolnici u Slavonskom Brodu). S tim u svezi, mogao se čak očekivati barem prividni porast bolesti, što međutim nije zabilježeno (24). Liječnici Opće bolnice Slavonski Brod (25) objavili su podatke o općem stanju novootkrivenih bolesnika s endemskom nefropatijom. Utvrđeno je da se u posljednjih nekoliko godina bolest otkriva u osoba boljeg općeg stanja negoli prije dvadesetak godina.

U selima s endemskom nefropatijom bolest je vezana za pojedine kuće bez nužne rodbinske povezanosti među oboljelim osobama. To su mahom stare, vlažne kuće s primitivnim uvjetima stanovanja. Većina ih je u međuvremenu napuštena (ili je samo dijelom u uporabi), a preostali su se ukućani uselili u novoizgrađene objekte na istom gospodarstvu. Prilikom posjeta endemskim selima mogli smo se uvjeriti da su takve stare, najvećim dijelom napuštene kuće s učestalim brojem nefropata zaista iznimne u negativnom smislu. Iako nije nikad ustanovljeno dovoljno objektiviziranih razlika između uvjeta života u takvim nastambama u usporedbi s onima bez nefropatije, moglo bi se – slijedom pretpostavke o ulozi mikotoksina u nastanku bolesti – pretpostaviti da su uvjeti za rast plijesni i biosintezu toksina u tim kućama bili prikladniji negoli u bolje uređenim novijim kućama značajno manje podložnim vlaženju.

Kad je riječ o mikotoksičkoj pretpostavci etiologije endemske nefropatije, treba naglasiti da okratoksin A ne mora biti jedini uzročnik. Na Simpoziju u Zagrebu bilo je govora i o fumonizinima, toksinima plijesni nefrotoksičnim za neke pokusne životinje (26, 27), no čije djelovanje na ljude nije do sada istraženo. Možda su uzročnici i drugi mikotoksini nefrotoksičnih svojstava (kao npr. citrinin) (28). Međutim, okratoksin A dostupan je analizi u biološkom materijalu, pa se stoga ispitivanje moguće uloge mikotoksina u nastanku endemske nefropatije obično svodi na istraživanje okratoksina A.

Kao zaključak, moglo bi se reći da bi bilo nedovoljno kritički tvrditi da se problem etiopatogeneze endemske nefropatije već sada može smatrati riješenim. Uz sve pri-

hvatljive dokaze o mikotoksičnom uzroku bolesti, tek bi dodatna istraživanja trebala dati konačne odgovore o uzročniku (ili uzročnicima) bolesti. U svakom slučaju, pretpostavka o ulozi mikotoksina u nastanku endemske nefropatije sada ostaje kao jedina prihvatljiva mogućnost na kojoj treba ustrajati u daljnjim istraživanjima. Nema smisla vraćati se na pretpostavke koje su dosadašnjim istraživanjima odbacene. Virusna teorija također nije, barem zasad, ničim potkrijepljena (29). Pretpostavka da je endemska nefropatija posljedica nasljedne sklonosti može se odbaciti, sudeći prema rezultatima značajnog istraživanja o učestalosti nefropatije u autohtonog stanovništva i u Ukrajinaca koji su se prije stotinjak godina doselili u endemsko područje (30).

Uz dalje praćenje epidemioloških pokazatelja, trebalo bi obratiti posebnu pažnju na moguće značenje drugih mikotoksina u nastanku bolesti, kao i na to da se rasvijetli selektivna pojava bolesti vezana za po nekoliko slučajeva nefropatije u pojedinim kućama unutar endemskog područja. Ciljana istraživanja na pokusnom modelu također će pripomoći da se rasvijetle etio-patogenetski mehanizmi nastanka ove bolesti.

## LITERATURA

1. *Group of authors.* Mycotoxins and Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol* 1992;30:177-224.
2. *Pavlović M.* Mikotoksini i balkanska endemska nefropatija (Magistarski rad). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1972. str. 89.
3. *Fuchs R.* Okratoksini i neki njihovi učinci u pokusnih životinja (Magistarski rad). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1983. str. 88.
4. *Peraica M.* Učinak okratoksina A na neke proteine bubrega (Magistarski rad). Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1986. str. 86.
5. *Fuchs R.* Distribution and fate of ochratoxin A in experimental animals (Ph D Thesis) Uppsala, Švedska: The Swedish University of Agricultural Sciences, University of Uppsala, 1988. str. 92.
6. *Radić B.* Biosinteza aflatoksina i okratoksina A u prisutnosti ksenobiotika (Disertacija). Zagreb: Tehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1990. str. 130.
7. *Medugorac M.* Učinak okratoksina A i stanje clemenata u tragovima u štakora. (Magistarski rad). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 1995. str. 80.
8. *Hult K, Pleština R, Habazin-Novak V, Radić B, Čeović S.* Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Arch Toxicol* 1982;51:314-21.
9. *Beker D, Radić B.* Fast determination of ochratoxin A in serum by liquid chromatography: comparison with enzymic spectrofluorimetric method. *J Chromatogr* 1991;570:441-5.
10. *Fuchs R, Radić B.* Endemic nephropathy. U: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, ur. *Endemic nephropathy in Croatia.* Zagreb: Medicinska naklada, 1995:31-8.
11. *Krogh P, Elling F, Gyrd-Hansen N, Hald B, et al.* Experimental porcine nephropathy: changes of renal function and structure perorally induced by crystalline ochratoxin A. *Acta Path Microbiol Scand Sect A* 1976;84:429-34.
12. *Berndt WO, Hayes AW.* *In vivo* and *in vitro* changes in renal function caused by ochratoxin A in rat. *Toxicology* 1979;12:5-17.
13. *Szczzech GM, Carlton WW, Truite J.* Ochratoxicosis in Beagle dogs. I Clinical and clinicopathological features. *Vet Path* 1973;10:135-54.
14. *Boorman GA, Hong HL, Dieter MP, Hayes HT i sur.* Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;72:304-12.

15. *Haubeck HD, Lorkowsky G, Kolsch E, Roschenthaler R* Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Appl Environ Microbiol* 1981;41:1040-2.
16. *Šoštaric B, Vukelić M*. Characteristics of urinary tract tumours in the area of Balkan nephropathy in Croatia. U: *Castegnaro M, Pleština R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H*, ur. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Scientific Publications No. 115., Lyon, Francuska, 1991:29-35.
17. *Vukelić M, Šoštaric B, Belicza M*. Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. *FD Chem Toxicol* 1992;30:193-200.
18. *Radić B, Fuchs R, Peraica M, Lucić A*. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol Lett* 1977: u tisku
19. *Pavlović M, Pleština R, Krogh P*. Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. *Acta Path Microbiol Scand Sect B* 1979; 87: 243-6.
20. *Fuchs R, Appelgren LE, Hagelberg S, Hult K*. Carbon-14-ochratoxin A distribution in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) monitored by whole body autoradiography. *Poultry Sci* 1988; 67: 707-14.
21. *Speijers GJA, van Egmond HP*. Worldwide ochratoxin A levels in food and feeds. U: *Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G*, ur. *Human ochratoxycosis and its pathologies*. John Libbey Eurotext Ltd. 1993: Vol 231, INSERM, 85-100.
22. *Krogh P*. Role of ochratoxin in disease causation. *Fd Chem Toxicol* 1992; 30: 213-24.
23. *Čeović S, Hrabar A, Šarić M*. Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. *Fd Chem Toxicol* 1992; 30: 183-8.
24. *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: Medicinska naklada, 1995: 31-8.
25. *Čeović J, Leko N, Bistrović D*. Endemic nephropathy at the Department of Medicine, Dr Josip Benčević General Hospital in Slavonski Brod. U: *Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A*, ur. *Endemic nephropathy in Croatia*, Zagreb, Medicinska naklada, 1995: 97-105.
26. *Voss KA, Chamberlain WJ, Bacon CW, Riley RT, Norred WP*. Subchronic toxicity of fumonisin B1 to male and female rats. *Food additives and contaminants*, 1995;12:473-8.
27. *Riley RT, Hinton DM, Chamberlain WJ, Bacon CW, Wang E, Merrill AH Jr, Voss AK*. Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: A new mechanism of nephrotoxicity. *J Nutr* 1994;124:594-603.
28. *Berndt WO, Hayes AW*. Effects of citrinin on renal tubular transport functions in the rat. *J Environ Pathol Toxicol* 1977; 1: 93-103.
29. *Aleraj B*. A study of the viral etiology of endemic nephropathy. U: *Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A*, ur. *Endemic nephropathy in Croatia*, Zagreb: Medicinska naklada, 1995; 23-9.
30. *Čeović S*. Endemska nefropatija u različitim etničkim skupinama. (Disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1978. str. 107.

### Summary

## THE ROLE OF MYCOTOXINS IN THE ETIOLOGY OF ENDEMIC NEPHROPATHY

One of the main arguments of the International Symposium on Endemic Nephropathy held in Zagreb from 7 to 9 November 1996 was the etiology of endemic nephropathy (EN). Several participants of the Symposium suggested that the most plausible theory as to the etiology was the one that pinpointed the mycotoxin ochratoxin A (OA) as a causative agent of the disease. The involvement of ochratoxin A in the etiology of EN has been investigated for a

long time in the Laboratory of toxicology within the Institute for Medical Research and Occupational Health in Zagreb. The obtained laboratory results, independently confirmed by other authors, speak in favor of this hypothesis. OA was found in the serum of persons from an endemic region in Croatia. It has been determined that OA is nephrotoxic for all animal species tested so far, and that hardly is there a reason not to consider it nephrotoxic for humans just as well. Its immunotoxic, mutagenic, genotoxic and carcinogenic properties have been proved on laboratory animals. Epidemiological studies of the endemic areas have revealed unusually high incidence of uro-epithelial carcinomas with rather specific features, different from the carcinomas of the same localization in persons from nonendemic areas. The most serious argument against the theory of involvement of OA in the development of EN is that this mycotoxin is ubiquitous and was found in the human serum in several countries where EN is not known. However, the incidence of OA positive samples as well as its quantity in the sera of persons from endemic villages were higher than from control villages where EN was not found. The toxicity of compounds is dose- and time-related and depends on their bioavailability. Therefore, it is possible that OA reveals nephrotoxic properties only after a longer (or continuous) exposure to higher doses than these found in control villages.

Some improvements in socio-hygienic measures introduced to the endemic region of Croatia may explain the decrease in the incidence of EN and the change in the age distribution (in the last 20 years, EN peak incidence has shifted to older population, the patients are in better general conditions when the disease is diagnosed, and the survival period is longer). The role of OA in causation of EN has not been firmly established as yet, and other factors should not be dismissed. However, further investigation should focus on the involvement of mycotoxins, as the most plausible etiological hypothesis.