



Središnja medicinska knjižnica

Vuković Lela, Ivana (2015) *Bubrežno oštećenje u dvjema različitim populacijama endemskoga žarišta [Kidney damage in two different population of endemic focus]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.*

<http://medlib.mef.hr/2240>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Vuković Lela

**Bubrežno oštećenje u dvjema
različitim populacijama endemskoga
žarišta**

DISERTACIJA



Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Vuković Lela

**Bubrežno oštećenje u dvjema različitim
populacijama endemskoga žarišta**

DISERTACIJA

Zagreb, 2015

Disertacija je izrađena u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinike za unutarnje bolesti i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb te u Općoj bolnici "Dr. Josip Benčević", Slavonski Brod. Disertacija je izrađena u sklopu znanstveno-istraživačkih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta br. 108-0000000-0329 "Endemska nefropatija u Hrvatskoj-epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza" i Hrvatske zaklade za znanost br. 04-38 „Molekulsko profiliranje i proteomika karcinoma urotela“. Voditelj oba projekta je prof. dr. sc. Bojan Jelaković.

Mentor: prof. dr. sc. Bojan Jelaković, subspecijalist nefrolog

*Traveller there is no path
The path forms itself as you walk it.*

Antonio Machado

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija endemske nefropatije po zahvaćenim državama.....	2
1.2. Etiologija endemske nefropatije i karcinoma gornjeg dijela urotela.....	15
1.3. Klinička slika EN/UUC i tijek bolesti	20
1.4. Patohistološki nalaz EN/UUC	22
1.5. Laboratorijski pokazatelji bubrežne funkcije u endemskoj nefropatiji	23
1.5.1. Tubularna i glomerularna proteinurija i enzimurija.....	23
1.5.2. Procijenjena glomerularna filtracija	27
1.6. Dijagnostički kriteriji za EN i klasificiranje stanovništva endemskih sela ..	28
1.7. Prevencija i liječenje endemske nefropatije	32
1.8. Svrha istraživanja.....	34
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
2.1. Hipoteza istraživanja	36
2.2. Ciljevi istraživanja.....	36
2.2.1. Opći cilj	36
2.2.2. Specifični ciljevi	36
3. ISPITANICI I METODE	38
3.1. Provedba istraživanja	39
3.2. Ispitanici:.....	40
3.3. Metode:.....	45
3.3.1. Klinički pregled	45
3.3.2. Upitnik	46
3.3.3. Laboratorijska analiza	49
3.4. Statističke metode.....	49
4. REZULTATI	51
4.1. Distribucija ispitanika prema klasifikaciji za EN.....	52
4.2. Demografski podaci i kliničke karakteristike ispitanika	54
4.3. Laboratorijski parametri bubrežne funkcije i ultrazvučni nalaz starijih osoba endemskog, ne-endemskog stanovništva i imigranata.....	62
4.4. Usporedba demografskih, kliničkih i laboratorijskih pokazatelja bubrežne funkcije između promatrane skupine imigranata endemskih sela i imigranata ne-endemskih sela.....	74
4.5. Analiza izloženosti aristolohičnoj kiselini prema odgovorima iz upitnika za period vremena od prije 20 i 30 godina i sada	80
4.6. Analiza izloženosti autohtonog stanovništva aristolohičnoj kiselini u prošlosti i sada.....	84
4.7. Analiza prediktivnih čimbenika za oštećenje proksimalnog tubula	86
4.8. Usporedba različitih kriterija u klasificiranju stanovništva endemskih sela i prevalencija EN u hrvatskom žarištu	89
4.9. Prikaz prevalencije EN i dobi ispitanika u prijašnjim istraživanjima i sada pomoću modificiranih WHO kriterija	95
4.10. Prevalencija i incidencija bolesnika s endemskom nefropatijom u nadomjestanju bubrežne funkcije u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu od 1995. do 2012. godine.....	97

4.11. Broj i dob operiranih bolesnika zbog UUC iz ispitivanih 9 endemskih sela u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu od 1995. do 2012. godine	104
5. RASPRAVA	108
6. ZAKLJUČCI	122
1. Status imigranta i bubrežno oštećenje.....	123
2. Izloženost aristolohičnoj kiselini i rizik oštećenja proksimalnog tubula	124
3. Trendovi prevalencije endemske nefropatije i urotelnih karcinoma gornjeg dijela mokraćnog sustava.....	124
4. Usporedba različitih dijagnostički kriterija za endemsku nefropatiju.....	125
5. Kronična bubrežna bolest u hrvatskom endemskom žarištu.....	126
7. SAŽETAK.....	127
8. SUMMARY.....	129
9. POPIS LITERATURE	131
10. ŽIVOTOPIS.....	147

POPIS OZNAKA I KRATICA

25.-75. P. – 25.-75. percentila (*engl. 25.-75. Percentile*)

95% CI – 95% interval pouzdanosti (*engl. 95% confidence interval*)

AA – aristolohična kiselina (*engl. aristolochic acid*)

AT – arterijski tlak

AH – arterijska hipertenzija

AAN – nefropatija aristolohične kiseline (*engl. aristolochic acid nephropathy*)

ACR – omjer albumina po gramu kreatinina u mokraći (*engl. albumin-creatinine ratio*)

Alb – albumin u urinu

C – medijan (*engl. median*)

CKD-EPI – *engl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

DAT – dijastolički arterijski tlak (*engl. diastolic blood pressure*)

DM – dijabetes mellitus

eGFR – procijenjena glomerularna filtracija (*engl. estimated glomerular filtration rate*)

EN – endemska nefropatija (*engl. endemic nephropathy*)

ESRD – terminalni stadij kronične bubrežne bolesti (*engl. end stage renal disease*)

HD – hemodijaliza

Hgb – hemoglobin

ITM – indeks tjelesne mase (*engl. body mass index*)

KBB – kronična bubrežna bolest

NBF – nadomještanje bubrežne funkcije

OR – omjer vjerojatnosti (*engl. odds ratio*)

P – vjerojatnost (*engl. probability*)

PTD – oštećenje proksimalnog tubula (*eng. proximal tubul damage*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organisation*)

TNM – tumor, limfni čvor, metastaze (*engl. tumor, lymph nodes, metastasis*)

UUC – karcinom gornjeg dijela urotela (*engl. upper urothelial cancer*)

$\alpha 1\text{mg}$ – alfa1mikroglobulin u mokraći (*engl. alfa1microglobulinuria*)

$\alpha 1\text{mCR}$ – omjer alfa1mikroglobulina po gramu kreatinina u mokraći (*engl. alfa1microglobulin – creatinine ratio*)

χ^2 – vrijednost testa proporcija (*engl. chi test*)

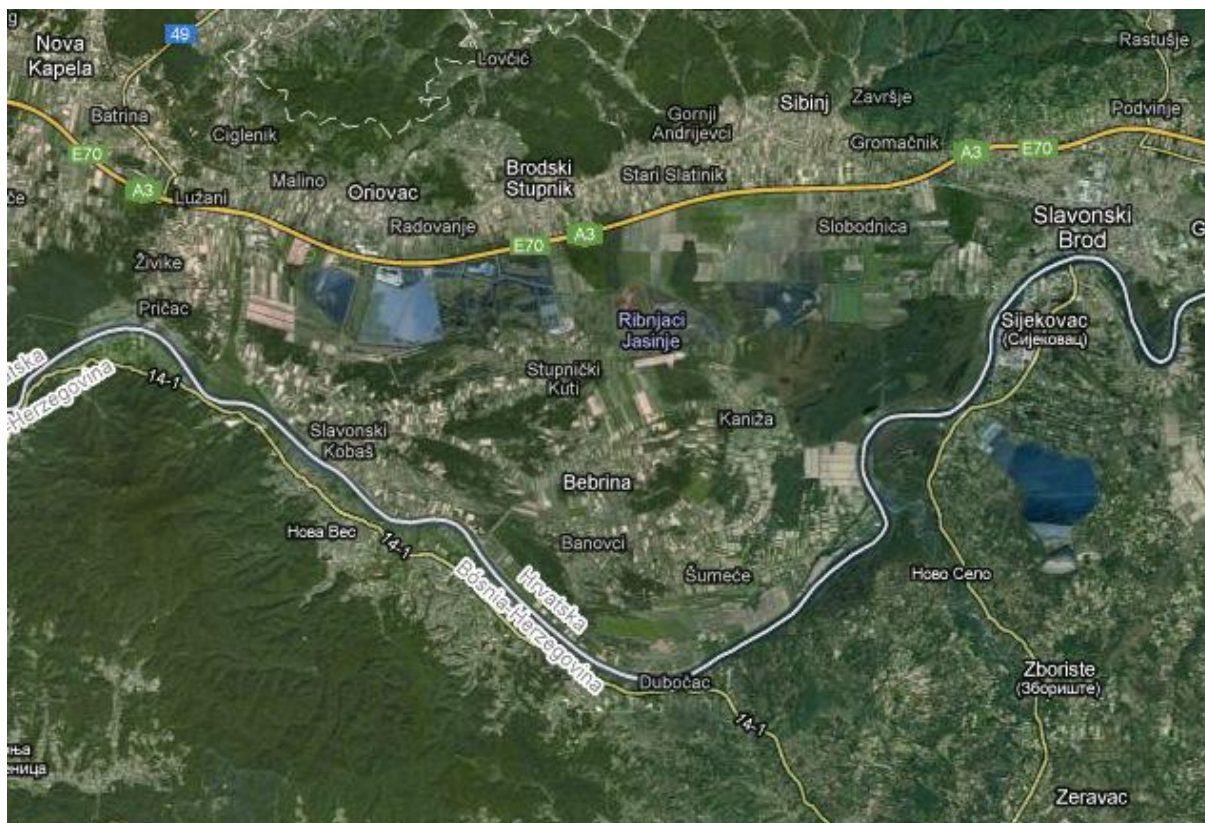
1. UVOD

1.1. Epidemiologija endemske nefropatije po zahvaćenim državama

Endemska (Balkanska) nefropatija (EN) je kronična tubulointersticijska bolest bubrega udružena s karcinomima prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (UUC) koja zahvaća odraslo ruralno stanovništvo aluvijalnih pritoka Dunava u Bosni, Bugarskoj, Hrvatskoj, Rumunjskoj i Srbiji. Najraniji izvještaji o bolesti potječu iz 1941. godine iz sela Karaš u Bugarskoj (1). Tanchev i suradnici su 1956. godine opisali karakteristike bolesti i povezanost s karcinomima mokraćnog sustava (2). Od tada su u zahvaćenim državama provedena brojna, sustavna epidemiološka ispitivanja/probiri populacije endemskih sela s ciljem otkrivanja uzroka, prevencije bolesti i unaprijeđenja zdravlja ugrožene populacije. EN odlikuju određena jedinstvena epidemiološka obilježja: prisutnost isključivo kod seoskog stanovništva koje obitava duže od 15 godina u ograničenom, mozaički raspoređenom geografskom području, pojava bolesti u istom domaćinstvu bez izravnog genskog modela nasljeđivanja, neboljevanje djece mlađe od 15 godina života i značajna povezanost s karcinomima prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (3). UUC iz endemskog područja češće zahvaćaju žene, ureter i pijelonefrit imaju sklonost recidivima i bilateralnom zahvaćanju u odnosu na UUC ne-endemskih područja. U prošlosti su se pojavljivali u mlađoj životnoj dobi nego UUC ne-endemskih područja dok se sada dob bolesnika pri dijagnozi UUC iz endemskih područja povisila i više nema razlike u dobi (4-7). Zajedničko geografsko obilježje svih zahvaćenih država jest da su sela s EN/UUC smještena u nizinama rijeka ili njihovih pritoka te da su često poplavljena (3, 8). U prošlosti je selo proglašeno endemskim ukoliko je dijagnoza endemske nefropatije bila postavljena u najmanje 3 autohtona stanovnika (9). S ciljem utvrđivanja topografske proširenosti bolesti u Hrvatskoj identična terenska epidemiološka istraživanja su jednokratno provedena u selima uzvodno i nizvodno od endemskih sela u slivu Save, te u selima uz Dravu i Dunav. EN nije ustanovljena niti u jednog autohtonog stanovnika tih sela, već kod jednog emigranta iz endemskog sela, što ukazuje na hipotezu da ako osoba provede dovoljno vremena izložena agensu u endemskom kraju, rizik razvoja bolesti nosi sa sobom neovisno o emigraciji u neendemski kraj (10-12). EN je potaknula poboljšanje uvjeta života u endemskim selima, izgradnju nasipa, kanala, melioraciju zemljišta. EN je predstavljala tako velik javno-zdravstveni problem da se tijekom 1960 – tih, osim standardnih mjera poboljšavanja zdravstvenih uvjeta i životnog standarda, napravilo čak i sustavno preseljenje stanovništva Bugarskog sela Karash u ne-endemsko područje. Tom radikalnom mjerom se kasnije potvrdila gornja tvrdnja o mirazu rizika

stanovništva endemskog kraja koji ako dovoljno dugo žive u njemu nose rizik razvoja bolesti, a oni rođeni izvan endemskog kraja nemaju rizik oboljevanja od bolesti, što opet navodi na presudnu ulogu vanjskog etiološkog uzročnika i načina života (13). Analizirajući učestalost bolesti u starosjedioca i Ukrajinaca imigranata ustanovljeno je da u endemskim selima jednakom učestalošću obolijevaju imigranti kao i starosjedioci ukoliko borave duže od 15 godina u endemskom području, dok u isto vrijeme nije zabilježena pojačana incidencija bubrežne bolesti u Ukrajini odakle su se doseljeli ili kod Ukrajinaca koji su nastanili ne-endemska sela. Tim "prvim biološkim pokusom" je jasno dokazana presudna važnost vanjskog čimbenika i načina života u etiologiji i razvoju bolesti i istovremeno isključena izravna genska komponenta (14). Ipak, kako se prevalencija EN u različitim žarištima kreće oko 5 %, i kako se bolest pojavljuje češće ili isključivo u obiteljima s pozitivnom anamnezom za EN, tako se pretpostavlja da je za nastanak bolesti bitna i genska predispozicija (15-18). U istraživanjima genske predispozicije proučavana je aktivnost različitih enzima, polimorfizmi gena koji kodiraju enzime uključene u metaboliziranje ksenobiotika, varijacije u proteinima transportnih sustava te faktori fibroze, sve bez definitivnog odgovora (16, 17, 19). Kako emigranti endemskih sela koji su dovoljno dugo živjeli u endemskim selima nose rizik oboljevanja trajno, tako se može pretpostaviti da je ključna izloženost vanjskom agensu u djetinjstvu. Čeovićevim istraživanjem je ustanovljeno da i imigranti, ukoliko žive dovoljno dugo u EN selima, obolijevaju neovisno o životnoj dobi jednako učestalo kao starosjedioci. Time je pokazano da nije bitan period života u kojem je izloženost nastupila, već je krucijalna duljina izloženost *per se* uz gensku predispoziciju.

U Hrvatskoj je bolest po prvi puta *post mortem* dokumentirana 1948. godine u bolesnika iz Slavanskog Kobaša čija je majka također preminula zbog nefropatije, što kao i župni zapisi, upućuje da je bolest i ranije bila prisutna u našem žarištu (20-22). Žarište u Hrvatskoj čini mozaično raspoređenih 14 sela s populacijom od oko 10 000 stanovnika u dolini rijeke Save: Banovci, Bebrina, Brodski Varoš, Dubočac, Kaniža, Lužani, Malino, Pričac, Slavonski Kobaš, Slobodnica, Stupnički Kuti, Šumeće, Zbjeg, Živike smještenih zapadno od Slavanskog Broda, južno ograničeni rijekom Savom, a sjeverno obroncima Dilj gore (Slika 1.) (3).



Slika 1. Endemsko žarište u Hrvatskoj

Prvo terensko istraživanje (tzv. perlustracija) provedeno je 1957. godine u 3 endemska sela: Bebrini, Pričcu i Slavonskom Kobašu (23), a od 1975. godine su se provodili redoviti pregledi stanovništva endemskih sela koji su u prosjeku obuhvaćali 60-75% stanovništva sela. Kroz cijeli period terenskih istraživanja u endemskim selima, selo Klakar je služilo kao referentno kontrolno selo (3, 24). Prevalencija bolesnih u endemskim selima je od 1975. do 1991. godine u prosjeku iznosila 4,4% (od 0,7% u selu Šumeće do 8,3% u selu Pričac), a sumnjivih da boluju i do oko 20% ukupnog stanovništva sela (6, 12, 25). Kada se uzme u obzir razdoblje od 1980. do 1991. godine, tada je prosječna stopa prevalencije iznosila 1,3% s rasponom od 0,4% do 2,3% u pojedinim endemskim selima (Tablica 1.) (6). Uslijed političko-socijalne situacije u državi smanjila se učestalost terenskih istraživanja, osim u endemskom selu Kaniža. Naredno veće terensko istraživanje obavljeno je 2005. godine. U tom posljednjem probiru populacije 6 endemskih sela (Dubočac, Pričac, Slavonski Kobaš, Šumeće, Zbjeg, Živike) ustanovljen je trend smanjenja ukupne prevalencije bolesti na 1% s rasponom od 0,0 do 2,3% u različitim selima (26). Broj sumnjivih da boluju od EN se kretao od 0,9 do 6,5% i značajno je manji od prijašnjih 11,6 do 27,3% (22). Za naglasiti je da su korišteni identični kriteriji uz usporediv

odaziv stanovnika endemskih sela kao u prethodnim perlustracijama, a k tome je smrtnost između različitih endemskih sela usporediva i nije se povećala. Tijekom ranijih terenskih istraživanja uvijek su postojali oboljeli u endemskom selu, te je za istaknuti činjenicu da u zadnjem istraživanju po prvi puta u jednom endemskom selu, konkretno selu Dubočac, nije detektiran niti jedan oboljeli. Također u posljednjih 10 godina iz endemskog sela Dubočac nije bilo bolesnika u nadomještanju bubrežne funkcije zbog EN u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ (26). Smanjenje prevalencije se ne može objasniti niti dilucijskim fenomenom imigracije iz ne–endemskih sela jer se u selo Dubočac u kojem žive ukupno 282 stanovnika u posljednjih 25 godina doselila 21 osoba iz ne – endemskih područja (7,4% od ukupnog stanovništva) (26). Ovi podaci našeg istraživanja potvrđuju još uvijek postojanje EN u Hrvatskom žarištu, ali govore u prilog smanjenju izloženosti etiološkom agensu.

Tablica 1. Prosječna prevalencija EN u endemskim selima od 1980. do 1991. godine

Endemsko selo	Prosječna prevalencija (%)
Banovci	2,3
Bebrina	2,0
Brodski Varoš	1,0
Dubočac	2,0
Kaniža	1,7
Lužani	1,2
Malino	0,4
Pričac	2,2
Slobodnica*	/
Stupnički Kuti	1,9
Slavonski Kobaš	1,3
Šumeće	0,7
Zbjeg	0,8
Živike	0,4
Ukupno	1,3

Incidencija bolesti u selu Kaniža u prvom petogodišnjem intervalu (1975-1979) je iznosila 5,3 ‰, potom u sljedeća tri intervala (1980-1994) od 2,12 ‰ do 2,46 ‰. Za

istaknuti je zabilježeni porast incidencije svakih 4-7 godina (1977, 1984, 1988, 1993. godine) (3). Petogodišnja incidencija na temelju prve hospitalizacije novodijagnosticiranih bolesnika s EN na Odjelu interne medicine, Opće bolnice „Dr. Josip Benčević” u Slavonskom Brodu se kretala od 1,09‰ do 2,81‰, s najvišom stopom 70-tih godina (3). Opća bolnica „Dr. Josip Benčević” u Slavonskom Brodu skrbi o stanovništvu cijelog hrvatskog endemskog područja. Petogodišnja incidencija UUC na 10 000 stanovnika endemskog područja se kretala od 0,18 ‰ do 1,39 ‰ s najvišom stopom 1980-tih godina (3). Karcinomi gornjeg dijela mokraćnog sustava u općoj populaciji su inače rijetki i češće zahvaćaju muški spol (27). U 35-godišnjem periodu (1965-1994. godine) incidencija UUC u endemskom žarištu je bila 20-26 puta viša nego u ne-endemskom području Brodsko–posavske županije, pri čemu su bolesnici s UUC iz endemskog područja bili mlađi i češće ženskog spola (28). I drugdje UUC uzrokovani izloženošću aristolohičnoj kiselini (AA) češće se pojavljuju u mlađoj dobi i kod ženskog spola (29). Najveća stopa operiranih zbog UUC u endemskom kraju pojavljuje deset godina nakon najviše stope novodijagnosticiranih bolesnika s EN (3). Od 2003. godine do 2009. godine je na razini Hrvatske bilo dijagnosticirano 298 UUC, od kojih je 45 bilo kod stanovnika Brodsko–posavske županije, a 9 u endemskim selima, te je srednja stopa morbiditeta od UUC iznosila 0,96, 3,63 i 13,4 na 100 000 stanovnika pojedinačno za Hrvatsku, Brodsko–posavsku županiju i endemska sela. Specifični morbiditet od UUC u endemskim selima je bio 13,9 puta veći nego u Hrvatskoj i 3,69 puta veći nego u Brodsko–posavskoj županiji (7). Druga skupina autora, uspoređujući zastupljenost UUC u Brodsko–posavskoj županiji sa Zagrebačkom županijom u dva 6-godišnja perioda, međusobno odvojena intervalom od 20 godina, je ustanovila 5 puta veću učestalost karcinoma uretera i pijelona u Brodsko–posavskoj županiji u oba promatrana perioda (79,4 % vs. 14,8 % od 1980 – 1985 godine i 65,8 % vs. 14,3 % od 2000 – 2005 godine). U skladu s prethodnim istraživanjima žene su bile češće zahvaćene, pogotovo u drugom periodu (Ž:M 1,8:1) (30).

Hrvatski registar nadomještanja bubrežne funkcije (NBF) postoji od 2000. godine, a zadnji izvještaj uključuje podatke za 2012 godinu. Iako je ukupni broj bolesnika u NBF (zbirno hemodijalizom, peritonejskom dijalizom, transplantacijom bubrega) neovisno o uzroku zatajenja bubrežne funkcije na razini cijele Hrvatske od 2000. do 2012 godine u stalnom porastu, bitno je uočiti da je do 2004. godine postojao trend brzog prirasta od 7,6% godišnje, od kada je isti smanjen na 2,2% godišnje, tj. 1,3% za 2012 godinu. Petogodišnje preživljenje bolesnika u NBF od devedesetprvog dana prilagođeno za dob, spol i osnovnu bolest u ovom razdoblju je iznosilo 57,4%. U 13 – godišnjem razdoblju od 2000. do 2012. došlo je do smanjenja prevalencije

hemodijaliziranih bolesnika i to na način da je do 2005. godine postojao stalan prirast hemodijaliziranih za 4,6% godišnje od kada nastupa trend smanjenja prevalentnih bolesnika na hemodijalizi. Uz smanjenje prevalencije hemodijaliziranih bolesnika, za navedeni prirast bolesnika u NBF je odgovoran veći broj bolesnika liječenih transplantacijom bubrega s godišnjim prirastom od 12,3%, te 10,2 % u zadnjem izvještaju 2012. godine. U navedenom razdoblju nakon prvotnog dosljednog porasta incidentnih bolesnika od 7,4% godišnje, od 2004. godine se smanjuje broj incidentnih bolesnika za 0,7% godišnje, a za veći ukupni broj bolesnika u NBF je odgovorno bolje preživljenje (od 3,3% za svaku sljedeću godinu početka NBF) zahvajući sve većem udjelu bolesnika sa transplantiranim bubregom. U 2012. godini je 37,2 % od ukupnog broja bolesnika liječeno transplantacijom bubrega kao metodom NBF.

Nadomještanje bubrežne funkcije u bolesnika kojima je osnovna bubrežna bolest i uzrok terminalnog zatajenja bubrežne funkcije EN se najčešće provodi postupcima hemodijalize, potom transplantacijom bubrega, dok su samo sporadični slučajevi upotrebe peritonejske dijalize. Čala je, 2005. godine, izvijestila o statusu bolesnika s EN u NBF u kojem se navodi da je najveći broj bolesnika s EN u NBF u centrima u Slavonskom Brodu (31%), Vinkovcima (26%) i Sisku (13%) (31). Udio bolesnika s EN iznosio je 2001. godine 3,2% od ukupnog broja novih bolesnika u NBF (N=497), te 4% od ukupnog broja prevalentnih bolesnika u NBF (N=2913). Dvjetisuće i druge godine je udio bolesnika s EN bio 2,9% od ukupnog broja incidentnih bolesnika u NBF (N=524), a 2003. godine 1,7% od ukupnog broja incidentnih bolesnika u NBF (N=583), te 2,9% od ukupnog broja prevalentnih bolesnika u NBF (N=3504) (31). Potreban je oprez pri interpretaciji ovih rezultata jer uz jednak priljev bolesnika s EN uz veći broj novodijaliziranih zbog drugih uzroka zatajenja bubrežne funkcije se dobije niži udio bolesnika s EN u NBF upravo zbog porasta broja novodijaliziranih zbog drugih uzroka bubrežnog zatajenja, a ne zbog smanjenja priljeva bolesnika s EN. Ipak, apsolutni brojevi dijaliziranih zbog EN govore u prilog trenda smanjenja broja dijaliziranih bolesnika zbog EN. Apsolutni brojevi dijaliziranih zbog EN od 2000. do 2003. godine su iznosili 120, 114, 112, te 101 s tim da se ne navodi promjena mortaliteta (31). Udio bolesnika s EN među incidentnim bolesnicima u NBF se od 2004. do 2012. godine kretao između 1 – 2 % (Tablica 2.).

Tablica 2. Udio bolesnika s EN u ukupnom broju incidentnih bolesnika u nadomještanju bubrežne funkcije po godinama u državi Hrvatskoj

Godina	2001.	2002.	2003.	2004.	2005.	2006.	2007.	2008.	2009.	2010.	2011.	2012.
Udio bolesnika s EN (%)	3,2	2,9	1,7	2,0	3,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	1,0

Od 1960-tih do 1991. godine se bilježi pomak dobi bolesnih od EN prema starijim dobnim skupinama, sa prijašnjih 45-55 godina na 55-65 godina uz trajnu predominaciju ženskog spola (Ž:M 3,2:2). U razdoblju od 2000. do 2003. godine medijan dobi bolesnika s EN pri započinjanju hemodijalize je bio 68 godina. U razdoblju od 2000 do 2005 srednja dob muškaraca pri postavljanju dijagnoze UUC iz endemskih područja je bila 67,2 godine, a žena 75,3 godine što se nije razlikovalo od dobi bolesnika s UUC iz ne – endemskih područja, a bila je značajno viša nego u prošlosti kada je UUC endemskog područja zahvaćao stanovnike u dobi od oko 60 godina (3, 7, 30). Očekivano trajanje života osoba s EN u razdoblju od 1991. do 2001. godine je bilo 69,2 godine i nije se značajnije razlikovalo od prosjeka populacije čitavog endemskog žarišta (67,8 godina), pri čemu je bilo značajno dulje nego sedamdesetih godina prošlog stoljeća, kada je iznosilo 45,1 godinu (3, 6).

Opći mortalitet u endemskom žarištu od 1991 do 2002 godine se nije razlikovao od onog u Brodsko – Posavskoj županiji ili Hrvatskoj (10,3 vs. 11,1 vs. 11,4 na 1000 stanovnika) (6). Specifični mortalitet od EN od 1991.- 2002. godine je bio 0,65 na tisuću stanovnika endemskih sela i time 3 puta manji u odnosu na 1970-te godine kada je iznosio 2,06 na tisuću stanovnika. Čala u izvještaju registra navodi da je od ukupno 168 bolesnika s EN u NBF, njih 68 preminulo do 2003. godine, te da bolesnici s EN u NBF žive dulje od ostalih bolesnika (31). Specifični mortalitet od karcinoma pijelona i uretera u endemskim selima od 1995. – 2002. godine je iznosio 6,902 na 100 000 osoba što je bilo 14 puta više od specifičnog mortaliteta Brodsko–posavske županije (0,495 na 100 000 stanovnika), a 55 puta više od specifičnog mortaliteta cijele Hrvatske (0,126 na 100 000 stanovnika), dok pritom učestalost drugih karcinoma nije viša u endemskim područjima. Kao i u razlici zahvaćenja spolova karcinomima gornjeg dijela urotela u endemskom kraju s predominacijom ženskog spola tako je i specifični mortalitet od UUC viši kod žena u endemskom području (9,020 vs. 4,967) dok je na razini Hrvatske viši kod muškaraca (6). U odnosu na gore navedeno razdoblje od 1995. do 2002. godine, u daljnjem praćenju od 2003. do 2009. godine se vidi smanjenje specifičnog mortaliteta od UUC u

endemskom području na 5,25 na 100 000 stanovnika u odnosu na Brodsko–posavsku županiju gdje iznosi 0,72 na 100 000 stanovnika i Hrvatsku 0,2 na 100 000 stanovnika, te je sada specifični mortalitet od UUC za 7,3 puta i 23,3 puta viši u endemskom području nego u Brodsko – posavskoj županiji i Hrvatskoj. Uspoređujući dva sedmogodišnja intervala za uočiti je da se specifični mortalitet od UUC na razini Brodsko – posavske županije i Hrvatske povećao što nije slučaj u endemskom području. Standardizirani specifični mortalitet govori koliki je rizik smrti od određene bolesti, u našem slučaju UUC i računa se djeljenjem umrlih od UUC s očekivanim brojem umrlih, te je u endemskim selima 8 puta viši rizik smrti od UUC nego u Brodsko–posavskoj županiji i 32 puta viši nego u Hrvatskoj (7).

Neobjašnjiv porast broja seljaka s terminalnim stadijem bubrežne bolesti uočen je i u Bosni, Bugarskoj, Rumunjskoj i Srbiji te će prema zemljopisnom položaju biti i opisan.

Bosansko endemsko žarište se nalazi na sjeveroistoku države i zahvaća 6 općina (Bijeljina, Brčko, Bosanski Šamac, Orašje, Modriča, Odžak), s ugroženom populacijom od oko 434 180 stanovnika (32). Prvo epidemiološko ispitivanje provedeno je 1957. godine u Bosni kojim je ustanovljena prevalencija od oko 6 % u (2 endemska sela) Velom Selu i Golom Brdu (33, 34) što je 1975. godine potvrđeno istraživanjem 6 endemskih općina s prosječnom ukupnom prevalencijom od 7,09 % (35), a ista se prema priopćenjima na kongresima iz 2002. i 2006. godine nije značajnije mjenjala i iznosi 6,2 % i 6,4 %. Međutim, treba naglasiti da u posljednja 2 desetljeća nisu provedena sustavna terenska ispitivanja specifična za dijagnostiku EN nego je na temelju podataka o mikroalbuminuriji i sniženoj glomerularnoj filtraciji, te priljevu bolesnika s EN u hemodijalizne centre učinjena procjena veličine prevalencije u cijelom Bosanskom žarištu (36). U sklopu programa „Otkrivanja kronične bubrežne bolesti u Bosni i Hercegovini“ 2009. godine je u endemskom selu Domaljevac i ne – endemskom selu Svilaj općine Odžak organiziran sistematski pregled stanovništva. Registriran je visok postotak hipertenzije, dijabetesa i proteinurije / mikroalbuminurije u Brodskoj Posavini, bez razlike između endemskog i ne – endemskog stanovništva. Ipak, ispitanici s pozitivnom obiteljskom anamnezom na EN su češće imali proteinuriju / mikroalbuminuriju od ostalih ispitanika endemskog sela, kao i od ispitanika iz ne–endemskih sela. Odaziv je bio svega 10% stanovništva sela Domaljevac i 20% stanovništva sela Svilaj, te to onemogućuje ikakve ekstrapolacije na populaciju sela, a ako se tome pridoda činjenica da je svrha istraživanja bila prevalencija kronične bubrežne bolesti, dijabetesa i arterijske

hipertenzije, a ne isključivo EN, stječe se dojam da je to predodredilo odazvanu skupinu s povišenim rizikom (37).

Zabilježen je pad prevelencije dijaliziranih bolesnika zbog EN među hemodijaliziranom populacijom u periodu od 2001. do 2011. godine, bez značajnije promjene u mortalitetu ili promjene ukupnog broja hemodijaliziranih bolesnika što govori u prilog sniženom priljevu bolesnika sa EN na hemodijalizu, tj. sniženoj incidenciji EN među dijaliziranom populacijom. EN je 2001. godine bila uzrok zatajenja bubrežne funkcije u oko 16,8 % dijalizirane populacije cijele Bosne, zatim 14,7% u 2006. godini, te u 11,2 % 2011. godine (38, 39). Prevalencija UUC među hemodijaliziranom populacijom zbog EN u Bosni iznosi oko 11,47% (39). Unatoč smanjenju prevalencije EN među hemodijaliziranom populacijom cijele Bosne, u sjeveroistočnom dijelu Bosne, EN je još uvijek vodeći uzrok NBF i za 2010. godinu je udio bolesnika s EN iznosio 64%.

U Srbiji je EN prvi puta opisana 1941. godine u slivu rijeke Kolubare, u selu Dudovica općine Lazarevac koja sveukupno broji oko 60 000 stanovnika, a od ukupno 14 endemskih sela tog područja kao najzahvaćenija se navode Šopić, Petka i Vreoci (40). Prvo terensko istraživanje je provedeno 1971. godine u 3 endemska sela: Šopić, Petka i Vreoci i registrirana je prosječna prevalencija od 8,3 %, u rasponu od 1,03% do 10,23% (41, 42). Dvadeset i jednu godinu poslije, 1992. godine, u selu Šopić je ponovljen pregled s usporedivim odazivom stanovništva od 85,7% i istom metodologijom, te je prevalencija oboljelih s nekadašnjih 4,4% pala na 2,6% uz pomak dobi oboljelih udesno, sa 54 god na 63 godine. No, prema Daniloviću, prevalencija EN se izražava zbrojem prevalencije bolesnih i sumnjivih stanovnika, te je prema tome prevalencija u selu Šopić 1971. godine iznosila 6,4%, a 1992. 8,9% na račun porasta broja sumnjivih, a ne oboljelih. U razdoblju od 1971. do 1992. godine registriran je 161 novooboljeli iz sveukupno 28 obitelji s EN. U daljnjem prospektivnom trogodišnjem praćenju započetom 1998 godine od 50 članova iz 5 nasumice odabranih obitelji s EN evidentirana su 3 nova bolesnika s EN. Značajno je da su novi slučajevi otkriveni samo u kućanstvima s pozitivnom obiteljskom anamnezom (43).

Nastavkom terenskih istraživanja 2002. godine obuhvaćeno je selo Vreoci s prevalencijom bolesnih 0,77%, a združenom prevalencijom bolesnih i sumnjivih od 1,70% što je nepromijenjeno u odnosu na 1971. kada je prevalencija bolesnih bila 0,81%, tj. 1,67% bolesnih i sumnjivih (44) uz pomak zahvaćenih prema starijoj dobi s prijašnjih 46 na 68 godina. Sljedeće istraživanje je združilo podatke prethodna dva istraživanja u selu Šopić i Vreoci i uključilo u analizu podatke iz sela Petka te

prikazalo promjene u prevalenciji i incidenciji EN u 3 najzahvaćenija sela općine Lazarevac u 36-godišnjem razdoblju. U prvom 16-godišnjem razdoblju (1973 – 1988) stopa incidencije EN prilagođena za starosnu dob se značajno smanjila s 340,46 na 37,39 na 100 000 stanovnika, a potom do 2008. godine narasla na 152,61 na 100 000 stanovnika. U prvom intervalu se radilo o godišnjem značajnom sniženju incidencije od 8,6%, a u drugom o trendu godišnjeg porasta od 4,6% bez statističke značajnosti. Trendovi stopa incidencije su se razlikovali između sela, a stope incidencije su bile najveće u godinama terenskih istraživanja. Bitno je za istaknuti da je u selu Petka 2008. godine zabilježena značajno niža prevalencija bolesnih i sumnjivih od EN u 37-godišnjem razdoblju od prvog terenskog istraživanja (5,7% vs. 10,2%; $p=0,001$) i iako je u istraživanje populacije sela Petka bilo uključeno svih 18 obitelji s EN zabilježenih 1971. godine, autori navode da se velik broj potomaka ovih obitelji preselio u Lazarevac te da se time može objasniti smanjenje prevalencije. Ipak, migracijska analiza nije učinjena (45). Analizirajući stopu incidencije u cijeloj općini Lazarevac od 1977. do 2009. godine utvrđen je značajan pad od 10% godišnje u prvom promatranom desetljeću, te potom neznačajan porast od 3,9% u sljedeća 2 desetljeća (45). Naposljetku, istraživači zaključuju kako je EN još prisutna u selima općine Lazarevac, ali uz značajno stariju dob pojavljivanja.

Učestalost karcinoma gornjeg dijela urotela u endemskom žarištu rijeke Kolubare prati učestalost EN u tom području. U 30-godišnjem razdoblju (1952 – 1982) je UUC dijagnosticiran u 59 bolesnika, od kojih je 33 (56%) živjelo u hiperendemskim selima Petka, Šopić i Cvetovac. U istraživanju provedenom 1982. godine incidencija UUC se u različitim selima općine Lazarevac kretala od 0,2 do 18,7 na tisuću stanovnika. Od svih bolesnika s dijagnozom UUC njih 84,7 % je imalo i EN (41). U općini Lazarevac je opisan 95 puta veći rizik razvoja UUC u endemskim nego u ne-endemskim selima (46). Od 1992. do 1994. godine u Klinici za urologiju i nefrologiju Beograd i Institutu za endemsku nefropatiju Lazarevac je liječeno 73 bolesnika s histološki potvrđenim UUC iz općine Lazarevac uz dosljedno najveću zastupljenost stanovnika endemskih sela Šopić i Petka (38,4%). Najčešće se radilo o karcinomima pelvisa (42,5%) ili uretera (39,7%), ili obje lokalizacije (17,8%), dok je bilateralna pojava karcinoma evidentirana u 13 (17,8%) osoba i to u 69,2 % slučajeva sukcesivno (47).

Zbirno je od 1952. – 1998 godine od 2110 UUC u cijeloj Srbiji njih 113 dijagnosticirano u općini Lazarevac, od kojih je 91 potjecalo iz četiri hiperendemska sela. Prosječna godišnja incidencija za navedeni četrdesetogodišnji period združeno za ta četiri sela (Šopić, Petka, Cvetovac, Vreoci) je bila 34,69 na 100 000 stanovnika što je za 115,6 puta više nego u ne-endemskom kraju (Vojvodina 0,2 UUC na 100 000 stanovnika) (48). Značajan je pomak dobi pri dijagnozi za u prosjeku 5,5 godina,

sa 56,6 god u razdoblju od 1952 do 1978 godine na 62 u razdoblju od 1979. do 1998. godine (48). Iako trend incidencija UUC u endemskom žarištu općine Lazarevac ne pokazuje značajan pad bitno je naglasiti da je u endemskim selima s najvećom incidencijom vrhunac pojavnosti UUC bio 1970–tih godina, potom u onima s manjom incidencijom 1980 – tih, te u endemskim selima s najmanjom incidencijom 1990–tih godina nakon čega slijedi pad incidencije. Nikolić zaključuje da je razina incidencije bolesti u pojedinom selu diktirala vremenski maksimum pojavnosti UUC od kada kreće pad uz pomak oboljelih prema starijoj dobi bez novih slučajeva mladih bolesnika s UUC (48, 49). Bukvić je analizirajući 161 bolesnika u programu NBF hemodijalizom u razdoblju od 1979. do 1993. godine ustanovila da je anamneza UUC pozitivna u 29,8 % bolesnika bez razlike u distribuciji spolova (M:Ž 26:22), te da se karcinomi češće (67,4%) javljaju prije terminalnog zatajenja bubrežne funkcije; i to u prosjeku 5 godina ranije (4). Učestalost drugih karcinoma je iznosila 6,3% kod endemskih nefropata na hemodijalizi i bila je čak niža nego kod bolesnika s drugim uzrocima zatajenja bubrežne funkcije (50).

Drugo žarište EN i karcinoma gornjeg dijela urotela u Srbiji se nalazi u slivu rijeke Južne Morave idući od sjevera prema jugu u općini Aleksinac, Niš i Leskovac i to u selima: Mezgraja, Donja Trnava, Nozrina, Lužane, Brestovac, Kulteš i Pukovac (51). Prevalencija EN u selu Mezgraja je od 1981. godine sa 3,8 % pala na 0,52 % u 2002. godini, a u selu Donja Trnava sa 2,7 % na 1,4 % u 2005. godini (52, 53). Od 1974. do 2006. godine 143 osobe su započele s postupcima NBF zbog EN iz 5 endemskih sela sliva rijeke Južne Morave (Brestovac, Kutleš, Mezgraja, Donja Trnava i Nozrina), od čega je 121 osoba liječena hemodijalizom, 15 peritonejskom dijalizom, a kod 7 osoba je učinjena transplantacija u bubrega. Srednja dob bolesnika pri započinjanju NBF je od 1974. do 1978. iznosila 49,1 godinu, a od 2004. do 2006. 72,5 godina. Srednja dob bolesnika s EN pri započinjanju NBF se nije razlikovala od one kod bolesnika u NBF zbog drugih uzroka bubrežnog zatajenja. Nadalje, u intervalu od 1998. do 2006. godine je došlo do značajnog sniženja prevalencije bolesnika s EN među cijeloj hemodijaliziranoj populaciji s 10 % na 3,1 % (54, 55). Od 1969. do 1988. godine su karcinomi uretera i pijelona bili 57 puta učestaliji u endemskim nego u ne-endemskim selima, dok se u 10-godišnjem razdoblju od 1989. do 1998. godine razlika učestalosti smanjila i bila 11 puta viša u endemskim naspram ne-endemskim selima, kako zbog sniženja incidencije UUC u endemskim tako i zbog povećanja u ne-endemskim selima, bez navođenja podataka o pojačanoj migraciji stanovništva (55, 56).

Također, EN je registrirana na teritorijalnom dijelu Kosova i Metohije, u slivu rijeke Binačke Morave, u općini Vitina i okolnim selima (Gornja Morava), s epicentrom pojavnosti u selu Vrbovac od 10,8 % i incidencijom od 3 % u razdoblju od 1986. do 1990. godine te 3,5 % u sljedećem razdoblju od 1991. do 1996. godine (57). Šubarić Gorgieva i suradnici su 2003. godine proveli probir u općini Vitina i okolnim srpskim selima s odazivom 28 % odraslog stanovništva prema kojem zaključuju da je bolest još uvijek prisutna, ali bez navođenja decidiranih podataka o prevalenciji (58).

Zaključno, prevalencija EN i incidencija novodijaliziranih su stabilne u slivu rijeke Kolubare, dok su u slivu rijeke Južne i Gornje Morave u padu, uz tendenciju smanjenja incidencija UUC u svim područjima.

Sljedeće geografsko žarište EN je registrirano 1958. godine u erozivnim dolinama Karpata u jugozapadnoj Rumunjskoj u pokrajini Mehedinti i Caras–Severin. Endemsko žarište pokrajine Mehedinti je iscrpnije proučavano, te se većina podataka o EN u Rumunjskoj odnosi na populaciju tog žarišta, dok ne postoje recentna terenska istraživanja Caras–Severin žarišta. Neaktivnost Caras–Severin žarišta se očituje u tome da nije ustanovljen ni jedan bolesnik s EN iz tog kraja (59). Stopa prevalencije EN 60 – tih godina prošlog stoljeća se kretala od 2 do 15% na ukupno stanovništvo od 40 000 osoba pri čemu je specifični mortalitet zbog bubrežne insuficijencije u endemskom području bio 5 puta veći od onog u ne-endemskom uz isti opći mortalitet (60). U Mehedinti županiji postoji 108 endemskih sela s ugroženom populacijom od 68 325 osoba prema popisu iz 2005 godine, a najpoznatija su Erghevița, Bistrita, Hinova i Poroina Mare smještene u dolinama rijeka. Aktualno nema podataka o prevalenciji EN u Rumunjskoj na temelju populacijske analize endemskog žarišta, već se zaključci o eventualnim promjenama učestalosti bolesti izvlače iz analize učestalosti bolesnika s ESRD zbog EN među ostalima u NBF ili učestalosti UUC iz endemskih krajeva. Bolesnici u NBF zbog EN se dijaliziraju u 2 dijalizna centra grada Drobeta Turnu–Severin, Mehedinti županije i udio bolesnika koji se dijaliziraju zbog EN među svim dijaliziranim tih centara je trajno u porastu, s 20 % 1990–tih na 51 % 2008. godine kada je u apsolutnim brojevima od ukupno 187 bolesnika u NBF, njih 96 bilo u ESRD zbog EN. Dvjetisuće osme godine su 22 bolesnika započela s NBF zbog EN u navedenim centrima (59). Da je broj bolesnika u NBF na milijun stanovnika najviši u endemskom kraju, govore podaci iz 2003. godine kada se u gradu Drobeta Turnu–Severin, Mehedinti županije, dijaliziralo 517 osoba na 1 000 000 stanovnika, za razliku od 463, 275, 285 na milijun stanovnika redom u Timisoaru, Resiti, Aradi, u preostalim dijelovima države. Tijekom 2007. godine je 20 % bolesnika s EN u NBF imalo anamnezu UUC-a, za razliku od 3% bolesnika iz ne – endemskog kraja. Podaci o UUC iz endemskog žarišta govore o

aktivnosti bolesti. Incidencija UUC u Mehedinti županiji je od 1978. godine u porastu sa 6,69 na 12,8 slučajeva na 10 000 stanovnika u 1991. godini, te nadalje na 20,4 slučaja na 10 000 stanovnika u 1991 godini (61). Naime, od 1992. do 2004. godine je na Odjelu urologije županijske bolnice Drobeta Turnu–Severin operirano 182 osobe s urotelijalnim karcinomima od čega je 114 (62,6%) bilo iz endemskih sela. Od svih urotelijalnih tumora u osoba iz endemskog kraja 78,95% je zahvaćalo gornji urinarni sustav, 8,77% donji, a 12,28% i gornji i donji urinarni sustav (59).

Krajnje istočno žarište EN je smješteno u sjevero-zapadnom dijelu Bugarske i sastoji se od 21.og endemskog sela i glavnog grada istoimene pokrajine Vratza i 4 sela u susjednoj pokrajini Mihajlovgrad. Žarište je 1970. – tih godina obuhvaćalo oko 80 000 stanovnika s stopom incidencije od 30 – 50 slučajeva godišnje na 10 000 stanovnika (62). U odnosu na ostala žarišta bugarski istraživači prijavljuju najvišu prevalenciju koja je 1964. godine u gradu Vratza iznosila 6 na 1000 stanovnika, a u zahvaćenim selima 12,3 na 1000 stanovnika. Od 1964. godine u Županijskoj bolnici Vratza su se prikupljali i na godišnjoj razini zadržavali podaci o bolesnicima s EN iz cijele Vratza regije koji su sadržavali ime, prezime, godinu rođenja i smrti, te mjesto i prebivalište. Retrogradnom analizom navedenog registra Dimitrov i suradnici su ustanovili smanjenje incidencije EN. Stopa incidencije u cijeloj pokrajini Vratza je od 1965. do 1975 godine bila 0,7 na 1000 osoba-godišnje, a potom je u sljedećem desetljeću (1976. - 1987.godine) nastupilo značajno sniženje incidencije na 0,3 na 1000 osoba-godišnje. Kada se promatra promjena stope incidencije za 20 endemskih sela pokrajine Vratza, tada se vidi da se ista smanjila sa 1,7 na 1000 stanovnika–godišnje na 0,8 na 1000 stanovnika – godišnje. U prvom promatranom desetljeću (1965 – 1975) je distribucija zahvaćenih spolova pokazivala dominaciju ženskog spola (1,5:1), dok u drugom (1976 – 1987) nije postojala predominacija spola. U drugom razdoblju se bilježi i veći postotak bolesnika u dobnoj skupini od 50 godina i starijih (79 % vs. 62 %), a k tome se medijan preživljenja nakon postavljanja dijagnoze sa 2 godine u prvom proučavanom razdoblju povećao na 5 godina u drugom uz napomenu da je prvi centar za dijalizu u tom području otvoren 1972. godine. Dvije stotine godine je ustanovljeno da postoji 114 prevalentnih bolesnika s dijagnozom EN u praćenju Odjela nefrologije Vratza bolnice, s predominacijom ženskog spola (2,5:1) i 15 godišnjim medijanom preživljenja od postavljanja dijagnoze. Ograničenje navedenog istraživanja promjena incidencije je nepostojanje kliničkih podataka, te činjenica da se samo 8 od mogućih 59 bolesnika s EN iz 2000. godine poklapalo s podacima iz registra. Ipak, autori navode da su redovita praćenja rađena na godišnjoj razini i unošeni su novi slučajevi što govori u prilog postojanju

određenog probira populacije i sve je rađeno u jednoj ustanovi što pak upućuje na dosljednu metodologiju i primjenjene kriterije pri dijagnosticiranju (63).

U Bugarskoj ne postoji registar bolesnika u programu NBF, te u literaturi ni ne postoje podaci o EN među hemodijaliziranom populacijom.

Petrinska – Venkovska je još 1965. godine dovela u vezu EN i UUC nalazom UUC na autopsiji 38% bolesnika s EN (48, 64), što je u skladu sa studijom Atanasova koji navodi da u Bugarskoj 20 – 40 % bolesnika s endemskom nefropatijom razvije UUC (48). Prema Nikolovu i sur. incidencija UUC se razlikuje u endemskim selima ovisno o prevalenciji same EN, pa je tako u selima visoke prevalencije EN iznosila 88,8 za muškarce i 194,5 za žene na 100 000 stanovnika, a 9,8 za muskarce i 11,2 za žene na 100 000 stanovnika u selima niske prevalencije EN (65) i navodi da su sada UUC češći u drugim selima nego u dobro poznatim endemskim selima (48).

1.2. Etiologija endemske nefropatije i karcinoma gornjeg dijela urotela

Zajednička pojavnost dvije inače rijetke bolesti, kronična tubulointersticijska nefropatija i karcinomi prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava, na ograničenom geografskom području je ukazivao na zajedničku etiologiju. Stoga je u definiranju etiologije EN bilo potrebno istražiti nefrotoksičnost i kancerogenost ispitivanog agensa *in vitro* i *in vivo*, kako na animalnim modelima, tako i u ljudi, te utvrditi je li ugroženo stanovništvo bilo izloženo toksičnoj ili većoj dozi ispitivanog agensa (66, 67). Od početka proučavanja EN ispitivane su i redom odbacivane hipoteze o pojedinim vanjskim uzročnicima EN i udruženih tumora prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (19, 68). Ispitivala se etiološka povezanost EN i mikroelemenata (selen), teških metala (kadmij i olovo), policikličnih aromatskih ugljika iz bunarske vode, mikroorganizama (virusa, bakterija), kao i uloga humoralne i stanične imunosti, te nasliedne, genske komponente. Nije nađena povezanost ijednog od navedenih s EN, a istraživanja okratoksina A i aristolohične kiseline (AA) u etiopatogenezi EN su značajna za izdvojiti s naglaskom na AA kao etiološkom uzročniku EN/UUC.

Mikotoksin, okratoksin A, iako ubikvitarno rasprostranjen je dugi niz godina bio u centru istraživanja. Naime, na animalnom modelu svinje je opisana povezanost s kroničnom bubrežnom bolesti (69) i razvojem karcinoma bubrega (70), te je

dokazana viša koncentracija okratoksina u hrani (71), plazmi i urinu (72, 73) ispitanika iz endemskih područja u odnosu na ne–endemska. Postoje nedosljednosti u detekciji adukata između različitih istraživačkih skupina, a i mehanizam karcinogeneze je nepoznat (74-76). Bitno je istaknuti da EN specifični UUC nisu nađeni kod eksperimentalnih životinja izloženih okratoksinu A. Nadalje, navedene koncentracije okratoksina A nisu bile više od međunarodno dopuštenih i korelirale su s onima u ne – endemskim područjima gdje EN nije opisana (77), a budući da su takve povišene vrijednosti ustanovljene kod osoba s kroničnom bubrežnom bolesti iz ne–endemskih područja Europe može se zaključiti da su povišene vrijednosti okratoksina A odraz akumulacije okratoksina A zbog snižene glomerularne filtracije, znači posljedica, a ne uzrok KBB (78-80). Kako do sada nefrotoksičnost, ni karcinogenost nije potvrđena u ljudi, tako je prema međunarodnoj klasifikaciji za karcinome okratoksin A svrstan u kategoriju 2B (81) koja obuhvaća supstance za koje ne postoje dokazi o karcinogenosti u ljudi, dok je ona ustanovljena kod eksperimentalnih životinja. Analizirajući devet uvjeta potrebnih za definiranje uzročne veze između agensa i bolesti, zaključeno je da zasada ne postoji dovoljno dokaza koji bi doveli okratoksin A u uzročno posljedičnu vezu s EN/UUC (67, 81).

Naš istraživački tim s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u suradnji s kolegama Opće bolnice „Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu i Zavodom za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije, te s liječnicima obiteljske medicine u endemskim selima, istraživačima Instituta Ruđer Bošković i University of New York, State University vođen hipotezom o kroničnoj ingestiji aristolohične kiseline je 2003. godine započelo projekt s ciljem definiranja etiopatogeneze, dijagnostike i epidemiologije EN.

Biljke *Aristolochiae spp.* sadrže mješavinu nitrofenantrenskih karboksilnih kiselina, 8-methoksi-6-nitrofenantro-(3,4-D)-1,3-dioksolo-5-carboksilne (AA-I) i njene 8-demetoksilirane forme (AA-II) (82). Termin nefropatija aristolohične kiseline AAN (83, 84), umjesto nefropatija kineskih trava, je uveden nakon što se ustanovilo da je aristolohična kiselina iz kineske trave *Aristolochiae fanchgi* odgovorna za otprilike 100 slučajeva brzo-progresivnog zatajivanja bubrega mladih, inače zdravih žena iz Belgije (85). Naime, njima su u tretmanu mršavljenja bile propisane pilule koje su sadržavale ekstrakte raznih kineskih trava u kojima je *Stephania tetandra* (*Han Fang-ji*) s diuretičnim učinkom, zabunom zbog nedovoljnog poznavanja kineske farmakopeje, zamijenjena s nefrotoksičnom i karcinogenom *Aristolochia fangchi* (*Guang Fang-ji*) (86). Od ukupnog broja izloženih osoba (N=1800) njih 5 % je oboljelo (87), baš kao što je slučaj i u populaciji endemskih sela, što ukazuje na

inter-individualne razlike u metaboliziranju (aktivaciji/detoksikaciji) AA kao i na razlike u mehanizmima reparacije DNA i eliminiranja AA-DNA adukata. Ekstrakti biljke *Aristolochiae spp.* su se tijekom povijesti koristili u medicinske svrhe za tretiranje artritisa, gihta, rana, ugriza zmija, te u porođiljstvu (88). S obzirom na široku, nekritičku upotrebu kineskih biljnih pripravaka u medicinske svrhe, nedvojbeno postoje brojni neregistrirani slučajevi AAN diljem svijeta (89), pa tako vrlo vjerojatno i u Hrvatskoj. AAN je brzo-progresivna tubulointersticijska bolest bubrega. Nju, upravo kao i EN obilježava intersticijska fibroza hipocelularnog tipa i atrofija tubula karakterističnog gradijenta od vanjskog prema unutarnjem korteksu (90, 91) s laboratorijski očitom tubularnom proteinurijom (92) i anemijom izraženijom od stupnja bubrežnog zatajenja (93). Bolest je u 46% slučajeva udružena s tumorima gornjeg dijela mokraćnog sustava (94), a opisani su slučajevi izolirane pojave tumora gornjeg dijela mokraćnog sustava nakon ingestije AA bez pridružene bubrežne insuficijencije (95, 96). Biomarker izloženosti AA je prisustvo kovalentno vezanih AL-DNA adukata u bubrežnom korteksu, te u tkivu tumora (97-99), koji su detektirani čak 20 godina nakon prestanka izloženosti AA, te predstavljaju doživotni tkivni biomarker i potvrdu izloženosti toksinu (100). U tkivima AAN udruženih tumora prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava pronađena je pojačana ekspresija tumor-supresijskog gena p53 (101), a daljnjim analizama ustanovljeno je da u spektru mutacija gena p53 dominira AT→TA transverzija (99, 102, 103). Uzrok doživotnog biomarkera leži u činjenici da se AT→TA mutacije nalaze skoro isključivo u ne-prepisivačkom dijelu DNA, a XPC-RAD23B, kao popravljivač genoma, se ne može vezati za dvostruku zavojnicu DNA (104-106).

U istraživanjima etiopatogeneze EN Ivić je, još davne 1969. godine, postavio hipotezu da su sjemenke *Aristolochiae clematitis* u narodu poznate, između ostaloga kao vučja stopa, tijekom žetve, obrade i skladištenja bile pomiješane sa sjemenkama žita te je tako inkriminirajući toksin, aristolohična kiselina dospijevao u brašno, a potom i u kruh, glavnu prehrambenu namirnicu stanovništva ovog područja (107-109). Svoju hipotezu je potvrdio epidemiološkim opažanjima biljke na poljima, te klinički i patohistološki na animalnom modelu zeca. Dekadu ranije, neovisno jedan od drugog, Dumić i Martinčević su isto utvrdili na animalnom modelu konja (110, 111). Nažalost, navedena hipoteza je ostala zanemarena, sve do tragedije s AA u Belgiji kada je Cosyns (90) opet skrenuo pozornost na iznimnu sličnost dva entiteta i zainteresirao znanstvenu javnost o proširenosti upotrebe AA i rasprostranjenosti same AAN. Očita je klinička i patohistološka sličnost AAN i EN (Tablica 3.), s glavnim razlikom u vremenskom periodu proteklom do postizanja kritične, kumulativne doze toksina što se u konačnici odražava u različitoj brzini progresije

bolesti bilo do terminalnog bubrežnog zatajenja ili do nastanka karcinoma. Naime, brzo-progresivni oblik bolesti registriran u Belgiji, ali i u drugim državama, se objašnjava unosom velike doze toksina kroz kraći period s pojavom bolesti kroz period od 3-86 mjeseci, a sporo-progresivni oblik, tipičan za EN, odgovara kroničnom unosu malih doza toksina kroz duži period, kao što je to u Kini ili Tajvanu, s klinički očitom bolesti tek nakon 15–tak godina od izloženosti toksinu. Oboljele žene u Belgiji su u prosjeku unosile 0,025 mg/kg AA kroz period od 13 mjeseci (87) što odgovara dozi oboljelih iz Kine koji su u prosjeku konzumirali 0,7-1,5 mg AA/dnevno kroz 1-10 godina (84). U belgijskoj kohorti, kao i tajvanskoj populaciji kumulativna doza toksina je bila značajan neovisni rizični čimbenik za razvoj bolesti (112, 113). Žene koje su unjele 200 gr biljke su imale 50 % šansu razvoja UUC (94). U svijetlu hipoteze o aristolohičnoj kiselini kao etiološkom faktoru EN i udruženih karcinoma, inicijalno je provedeno pilot epidemiološko ispitivanje pojačane izloženosti endemskih nefropata AA. Time je ustanovljeno da su bolesnici na hemodijalizi zbog EN češće viđali biljku *Aristolochiae* na svojim žitnim poljima (OR 7.2 95% CI (1.8 - 29.0); $p < 0.001$) i njene sjemenke među sjemenkama žita namjenjenim za brašno (OR 12.1 95% CI (2.7 - 55.5); $p = 0.002$), te tako i imali veći rizik izloženosti AA putem ingestije toksina kruhom od bolesnika na hemodijalizi zbog drugih uzroka (108). Analizom količine AA u sjemenki biljke utvrđeno je da 1 gram sjemenki *Aristolochiae* sadrži 6,5 mg AA, te da bi zagađenje kruha samo jednom sjemenkom *Aristolochiae* i konzumacija oko 0,5 kg takvog kruha kroz 8 – 10 godina odgovarala dozi koje su žene u Belgiji unjele tijekom 20 mjeseci (108). Ispitivano je i unošenje AA putem biljnih pripravaka u obliku čaja, te su Ivković i sur. ustanovili da nije bilo razlike u konzumaciji čaja između oboljelih i neoboljelih stanovnika endemskih sela Hrvatskog žarišta, te da stanovništvo endemskih sela nije konzumiralo čajeve od biljaka koje sadrže AA (114). Druga skupina autora navodi pojačanu konzumaciju čaja napravljenog od listova *Aristolochiae* u dijaliziranih osoba zbog EN u Rumunjskoj, međutim bez korelata u detekciji AA u plazmi ispitanika (61). Krunska potvrda izloženosti endemskog stanovništva aristolohičnoj kiselini je bio dokaz prisustva adukata metabolita aristolohične kiseline na adenozijskim i gvaninskim bazama DNA u korteksu bubrega analiziranih bolesnika oboljelih od EN i u tumorskom tkivu bolesnika iz endemskog kraja operiranih zbog karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava. Od ukupno 19 mutacija p53 tumorsupresorskog gena 89% je uključivalo A:T par, a od toga je 78% bilo AT→TA transverzija na kodonu 179 – 2, 280 – 3, 291 – 1, što odgovara mutacijskom spektru evidentiranom na kulturi stanica tretiranih s AA (115-117). Adukti su detektirani pomoću obilježavanja s ^{32}P koristeći poliakril gel elektroforezu (115) i nedvojbeno potvrđeni i kvantificirani masenom

spektroskopijom (118). Epidemiološko – molekularni pristup je korišten u sljedećem istraživanju na većoj kohorti od 67 bolesnika operiranih zbog UUC iz endemskih sela 3 različita geografska žarišta; Bosne, Hrvatske i Srbije kada su dosljedno potvrđeni prethodni rezultati. Okolišna izloženost AA u prošlosti je bila značajna, 95,7% bolesnika je uzgajalo žito pred 20 – 30 godina, 86,4% viđalo biljku *Aristolochiae* na svojim poljima, te 97,9% peklo kruh od brašna dobivenog od vlastitog žita. Adukti AA su bili prisutni u 70% uzoraka tkiva korteksa bubrega, a u mutacijskom spektru p53 gena 64% su bile mutacije AT para, a 25% AT→TA transverzije. Ono što je značajno je da su adukti AA u korteksu bubrega bili prisutni u 95% slučajeva s AT→TA transverzijama što potvrđuje uzročnu vezu da izloženost AA u genetski predisponiranih pojedinaca dovodi do AAN/UUC. U niti jednom uzorku renalnog korteksa kontrolnih UUC iz ne–endemyjskih područja nisu detektirani adukti aristolaktama (119). Druga, neovisna skupina istraživača je ustanovila adukte i specifične AT→TA mutacije na kodonu 168 Tp53 supresorskog gena kod bolesnika s UUC Rumunjskog endemskog žarišta (120).

Uzimajući u obzir sve navedene dokaze i istraživanja međunarodna znanstvena zajednica zaključuje da je EN jedan od oblika AAN (121), bolesti raširene po cijelom svijetu (122, 123).

Tablica 3. Karakteristike endemske nefropatije i nefropatije aristolohične kiseline

	doza AA	Klinički tijek bubrežne bolesti	Postotak oboljelih od ukupnog broja izloženih	Karcinomi urotela	Jačina fibroze	Celularnost	Kortikomedularni gradijent
AAN	Velika doza u kratkom vremenu	Akutni, brzoprogresivni	5%	40-46%	+++	-	+
EN	Manja doza u duljem vremenskom razdoblju	Kronični, spori razvoj	5%	41%	+++	-	+

AAN - nefropatija aristolohične kiseline, AA – aristolohična kiselina

1.3. Klinička slika EN/UUC i tijek bolesti

Klinički EN počinje neprimjetno bez akutnih prodromalnih simptoma i tijekom vremena dovodi do progresivnog oštećenja bubrežne funkcije i do terminalnog stadija bubrežne bolesti. U ranoj fazi se mogu pojaviti nekarakteristični, intermitentni bolovi u lumbalnom dijelu kao i žućkasta diskoloracija lica, dlanova i obraza. Kako bubrežno zatajenje napreduje tako se razvija slabost, bljedilo, izmokranje većeg volumena razrijeđenog urina, glavobolja i gubitak tjelesne mase (2, 124). Stupanj anemije je redovito izraženiji od stupnja kroničnog bubrežnog zatajenja (125) te čak i bolesnici na hemodijalizi zahtijevaju više doze eritropoetina za isto povišenje razine hemoglobina u odnosu na hemodijalizirane bolesnike zbog drugih uzroka bubrežnog zatajenja (126, 127). Razlog tome leži u činjenici da se eritropoetin sintetizira u bubrežnom korteksu i meduli u peritubularnim intersticijskim stanicama nalik fibroblastima (128, 129) i u stanicama proksimalnog tubula u uvjetima hipoksije (130), a upravo su te stanice zahvaćene bolešću. Arterijska hipertenzija (AH) i edemi nisu obilježja rane faze EN i razvijaju se tek u terminalnom stadiju bubrežne bolesti kada oko 40% oboljelih ima AH (124, 125, 131). Patofiziološki bi se to moglo objasniti time što dolazi do gubitka soli urinom (engl. salt wasting nephropathy) (89). Međutim, nekoliko nedavno provedenih studija na malom broju ispitanika navode višu prevalenciju AH u sklopu EN (132, 133) što je potvrđeno studijom Dike i suradnika u kojoj je dokazana veća prevalencija AH u endemskim selima u usporedbi s kontrolnim ne – endemskim selima (134). Porast prevalencije AH u EN populaciji se objašnjava starenjem populacije, produljenjem životnog vijeka oboljelih i starijom dobi oboljelih, kada je viša i incidencija AH, sjedilačkim načinom života, pretilošću, lošim socioekonomskim statusom kao i pretpostavkom o slabljenju ili nestajanju etiološkog agensa, te time i nestajanju rane faze EN. Izgledno je da svi ti čimbenici suvremenog načina života mogu nadmašiti antihipertenzivni učinak (tubulopatiju s gubitkom soli) rane faze EN. U terminalnom stadiju bubrežne funkcije razvijaju se uobičajeni simptomi i znakovi uremijskog sindroma (2, 124, 125).

EN je sporoprogresivna bolest, iako se u početku istraživanja EN postojali navodi da je brzina progresije azotemije u uremiju 1-3 godine (125). U skupini od 18 bolesnika s EN u različitim fazama bubrežnog zatajenja ustanovljeno je prosječno godišnje sniženje klirensa kreatinina za 2.74 mL/min. Trideset i tri posto ispitanika u razdoblju od 15 godina je razvilo terminalni stadij bubrežnog zatajenja, s tim da je s adekvatnim liječenjem brzina smanjenja glomerularne filtracije bila 2,1 mL/min/1,73m² godišnje, a bez medicinske supervizije 5,1 mL/min/1,73m² (135). Analizom podataka o preživljenju 265 bolesnika s EN iz općine Lazarevac, Velimirović je u 12-godišnjem

intervalu našao da su bolesnici s EN koji su 1971. godine bili u ranoj fazi u prosjeku živjeli 7,4 godine, a oni u fazi kroničnog bubrežnog zatajenja 5,7 godina (136). Bukvić, pak, u retrospektivnoj analizi preživljenja EN bolesnika dijagnosticiranih 1971. godine nalazi ukupno srednje preživljenje od 16,4 godine (23,1 za sumnjive da boluju i 13,3 za manifestno bolesne od EN) tijekom analiziranih 27 godina (137).

Karcinomi gornjeg dijela mokraćnog sustava se najčešće klinički prezentiraju bezbolnom hematurijom (48, 138), a kod opstrukcije i proksimalne dilatacije uretera i osjećajem boli u slabinskom dijelu kralježnice ili renalnih kolika.

UUC nije čest karcinom mokraćnog sustava, a bilateralna pojava bilo istovremeno ili sukcesivno se bilježi u prosjeku u oko 1-3% slučajeva UUC. Taj postotak kod UUC iz endemskih područja značajno viši i u različitim serijama bolesnika iznosi između 10 – 17,8 % (4, 48, 139, 140). AA uvjetovani UUC, kao što je to slučaj i kod UUC u endemskim selima, imaju tendenciju bilateralne prezentacije (29). Snižena bubrežna funkcija pri nefroureterektomiji zbog UUC je češća kod stanovnika endemskih sela nego kod kontola (58 % vs. 20 %) (5), što je u skladu s rezultatima tajvanske populacije gdje češće dolazi do razvoja terminalnog zatajenja bubrežne funkcije u sklopu UUC zbog izloženosti AA (28% vs. 12%) (29). Nikolić nalazi da je u 63% od 710 nefrektomiranih bolesnika iz endemskih krajeva Srbije glomerularna filtracija bila niža od 80 ml/min/1,73m², što je još viši postotak, ali uz neadekvatnu graničnu vrijednost za definiranje KBB (48). Nema razlike u prognozi bolesnika operiranih zbog karcinoma pelvisa ili uretera, s tim da je kod bolesnika iz endemskih krajeva veća vjerojatnost recidiva karcinoma (141). U prošlosti se zbog niskog stupnja malignosti i dobrog ishoda neovisno o radikalnosti operativnog zahvata zagovarao pošteđni operacijski pristup odstranjenja tumora uz očuvanje tkiva bubrega (48, 142, 143). Međutim, Čukuranović i sur. su u posljednjem desetljeću uočili više graduse karcinoma pri operativnom zahvatu i kraće postoperativno preživljenje te se preporučuje radikalni operacijski pristup (5, 48, 144).

UUC nije čest kod dijaliziranih zbog drugih uzroka zatajenja bubrežne funkcije (145). S druge strane karcinomi drugih organskih sustava nisu učestaliji kod bolesnika s EN (4) ili u endemskom žarištu (146). U 6 – godišnjem razdoblju u Hrvatskoj je među dijaliziranim EN bolesnicima njih 8,3 % razvilo UUC, a u Bosni 10,4 % (147). U Centru za dijalizu Lazarevac, u Srbiji, 29,8 % bolesnika s EN je imalo i UUC (4). Čukuranović i sur. su ustanovili da je preživljenje bolesnika s EN u NBF bolje od preživljenja bolesnika zbog drugih uzroka terminalnog zatajenja bubrežne funkcije (4.84 (95% CI 3.97–5.70) vs. 3.1 (95% CI 2.78–3.84); p<0,01) (148), a Bukvić i sur. da nema razlike u preživljenju hemodijaliziranih bolesnika zbog EN sa ili bez UUC (46,1 vs 46,8 mjeseci; p>0,05) (4).

1.4. Patohistološki nalaz EN/UUC

EN se u patomorfološkom smislu prezentira kao kronična tubulointersticijska nefropatija i/ili kao papilarni karcinom gornjeg dijela urotela (90, 94, 101, 149-152), a sukladno tome, kako je već navedeno, klinički kao kronična bubrežna bolest i/ili kao izolirana pojava tumora prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (96). Makroskopski su bubrezi obduciranih bolesnika s EN ravne površine, izrazito smanjeni s težinom oko 20 do 40 grama (153).

Iako patohistološke promjene EN nisu patognomonične, ima određenih osobitosti koje ju onda u cjelokupnom kliničko – epidemiološkom kontekstu diferenciraju od drugih entiteta. Međusobno neovisni istraživači potvrđuju da se radi o procesu koji primarno zahvaća proksimalni tubul te dovodi do multifokalnih promjena epitela i atrofije tubula (150, 152-156). U kasnijim stadijima bolesti i glomeruli bivaju žarišno zahvaćeni po tipu hijalinoze, zadebljanja bazalne membrane, a u konačnici i globalne skleroze (150, 157).

Najznačajnije patohistološko obilježje je izrazita intersticijska fibroza hipocelularnog tipa koja počinje od korteksa i širi se prema meduli (149).

Od početka razvoja bolesti se opisuje hijalinoza izvanglomerularnih arteriola i ogranaka a. interlobularis, bez promjena venskog segmenta (150) što odgovara promjenama tijekom fiziološkog procesa starenja. Ferluga navodi da patohistološke promjene nalikuju kroničnoj formi trombotičke mikroangiopatije ili onima kod ciklosporinske toksičnosti (150, 157). Na obdukcijским nalazima bolesnika s EN visok je indeks apoptoze stanica proksimalnih, distalnih i sabirnih tubula, s tim da su u radu Belitze i sur. najviše bile zahvaćene stanice distalnih tubula (158). Imunoglobulini ili komponente komplementa se većinom ne nalaze, iako ponegdje postoji nespecifično, diskretno i segmentalno nakupljanje IgM i C3 (33). Novije studije potvrđuju depozite C3 komponente komplementa u tubulima što može biti posljedica toksičnog oštećenja i aktivacije epitelnih stanica proksimalnih tubula, te nalaze koekspresiju vimentina i citokeratina u tubulima, kao i izraženiju ekspresiju kolagena IV i laminina u zadebljanim membranama tubula i peritubularnih kapilara (150, 157, 159, 160). Analizom preparata pomoću elektronskog mikroskopa se vidi razmicanje stanica te promjene morfologije mitohondrija proksimalnih tubula, zadebljanja i raslojavanje bazalne membrane peritubularnih kapilara (161) kao i zadebljanje subendotelnog prostora glomerula te interpozicija mezangijskih stanica i matriksa (157).

U slučaju onkogeneze najčešće se radi o unilateralnom, multifokalnom karcinomu prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (prijelon i/ili ureter) (4, 94, 101).

Makroskopski se nalaze ili papilarne, polipoidne tvorbe koje zauzimaju šupljinu pelvisa/ureterea ili ulcerativne, infiltrativne tvorbe koje dovode do zadebljanja stijenke organa (162). Patohistološki se radi o karcinomima prijelaznog urotelijalnog epitela, te se svjetlosnom mikroskopijom UUC iz endemskih područja ne razlikuju od onih iz ne – endemskih područja (163). Histopatološkom analizom udaljenog tkiva bubrega bolesnika nefroureterektomiranih zbog UUC se mogu naći promjene specifične za EN, ali je bitno naglasiti da se većinom radi ili o toliko uznapredovalo promjenjenom tkivu ili o superpoziciji sekundarnih promjena da to onemogućuje definitivno postavljanje dijagnoze EN bez dodatnog određivanja AA adukata i specifičnih mutacija (119). Do 2004 godine su se karcinomi svrstavali u gradus 1, 2 ili 3 (G1, G2, G3), a prema WHO klasifikaciji iz 2004. godine razlikuju se invazivni karcinomi i tri skupine neinvazivnih karcinoma: carcinoma in situ, papilarni karcinomi niskog stupnja malignosti, te karcinomi niskog ili visokog stupnja malignosti (162). Također, se određuje i stadij bolesti prema „TNM” sustavu ovisno o zahvaćanju limfnih čvorova ili širenju u susjedne ili udaljene strukture (164, 165). TNM stadij i gradus karcinoma su temeljni prognostički čimbenici.

1.5. Laboratorijski pokazatelji bubrežne funkcije u endemskoj nefropatiji

1.5.1. Tubularna i glomerularna proteinurija i enzimurija

Etiologija EN je dugo bila enigma, a bolest obilježava i dugi latentni tijek, te je stoga velika pažnja bila posvećena otkrivanju ranog biljega zbog čega je proučavan čitav spektar raznih proteina i enzima u urinu (25, 166-168). Među prvim istraživanjima o tipu proteinurije u EN su bili rezultati Halla i suradnika, te Hrabara i suradnika koji su ukazali na veću učestalost niskomolekularne, tubularne proteinurije kod zahvaćenog stanovništva endemskih sela (169, 170), što je kasnije višekratno potvrđeno (167). Budući da egzotoksin primarno zahvaća proksimalni tubul, biljezi oštećenja proksimalnog tubula su ključni u ranoj detekciji bolesti. Tubularna proteinurija, kao takva, je minuciozno obrađena u radovima o kadmijskoj nefropatiji (171-174). U kontekstu EN najviše su proučavani alfa1 – mikroglobulin (α 1mg) i beta2 – mikroglobulin (β 2mg), te će u nastavku teksta biti elaborirana ta istraživanja s naglaskom na α 1mg (168, 175-177). β 2mg je dugo bio u centru pozornosti, a čak se spekuliralo da bi mogao biti i etiološki agens (178, 179). Međutim, s obzirom da se radilo o povišenim vrijednostima u serumu uslijed pada glomerularne filtracije uskoro

su otklonjene takve hipoteze (175, 180-182). $\beta 2\text{mg}$ je niskomolekularni (11800 Da) amiloidogeni protein koji predstavlja laki lanac HLA -1 kompleksa (183). $\beta 2\text{mg}$ je nedvojbeno povišen u urinu bolesnika s EN što je potvrđeno u nizu studija (184) i stoga je uvršten u WHO kriterije za dijagnosticiranje EN (167, 185), te pri vrijednostima iznad 300 mg/g (0,3 mg/L) sa 75% osjetljivosti i 63% specifičnosti klasificira EN (167). Međutim, veliki nedostatak $\beta 2\text{mg}$ jest degradacija pri nižim vrijednostima pH i pri stajanju na sobnoj temperaturi, te lažno višim vrijednostima uz leukocituriju (186, 187). U kontekstu epidemioloških, terenskih istraživanja taj predanalitički segment je izuzetno bitan jer je potrebno vrijeme do dostave i obrade uzoraka. Usporedbom $\alpha 1\text{mg}$ i $\beta 2\text{mg}$, Stefanović i sur. su konstatirali da oni imaju sličnu osjetljivost i specifičnost kao i prediktivnu vrijednost u razlikovanju EN od drugih bubrežnih bolesti ili kontrola te se preporuča korištenje ili jednog ili drugog ovisno o uvjetima i mogućnostima studije (188).

$\alpha 1\text{mg}$ je niskomolekularni (27kDa) glikoprotein od 183 aminokiseline (189, 190) kojeg kodira AMBP gen na kromosomu 9q32-33 (190), a sintetizira se u jetri (191). Pripada porodici lipokalina koji pomoću slobodne cisteinske skupine vežu proteina (192-194) i poznata je njegoa imunomodulirajuća funkcija u organizmu. Poremećaji funkcije organa uključenih u sintezu i metaboliziranje $\alpha 1\text{mg}$, jetre (195-197) i bubrega (198, 199), dovode do promjene koncentracije $\alpha 1\text{mg}$ u plazmi. Međutim, koncentracija $\alpha 1\text{mg}$ u plazmi je stabilna u širokom spektru patoloških stanja kao što su reakcije akutne faze, infekcije, upalna zbivanja, neoplazme, poremećaji centralnog živčanog sustava (195, 196, 200). Iz plazme slobodni $\alpha 1\text{mg}$ prolazi kroz glomerule u primarni urin gdje u fiziološkim uvjetima biva apsorbiran putem endocitičkog receptora megalina u proksimalni tubul i kataboliziran, rezultirajući neznatnim količinama $\alpha 1\text{mg}$ u „krajnjem“ urinu (192, 201, 202). Ovisno o metodi određivanja, fiziološko dnevno izlučivanje varira između 3,6 mg/dU i 5,7 mg/dU (203, 204). Kod poremećaja funkcije proksimalnog tubula ili zasićenja receptorskog sustava dolazi do povišenja vrijednosti $\alpha 1\text{mg}$ u urinu (205). Nadalje, i male količine albumina, koje se u fiziološkim uvjetima filtriraju kroz intaktni glomerul, kod oštećenja proksimalnog tubula se izlučuju urinom. Tako kod stanja s tubularnom lezijom postoji i primjesa glomerularne proteinurije. U svrhu razlučivanja radi li se o glomerularnoj ili tubularnoj proteinuriji razvijen je omjer $\alpha 1\text{mg}/\text{alb}$ čija vrijednost, ako je jednaka ili iznad 0,91 uz patološke vrijednosti albumina, govori u prilog tubularne proteinurije (205).

U epidemioloških istraživanjima populacije je praktički neizvedivo 24 – h skupljanje urina za određivanje proteinurije, a omjer proteina ili albumina s kreatininom u jednokratnom uzorku prvog ili drugog jutarnjeg urina na populacijskoj razini dobro

korelira s 24 – h izlučivanjem proteina / albumina uz pretpostavku prosječnog izlučivanja kreatinina od oko 1000 mg/dan (206, 207). Na individualnoj razini postoje nedostaci zbog razlike u izlučivanju kreatinina kod osoba velike mišićne mase kada se korekcijom podcjenjuje razina stvarne proteinurije i obrnuto kod osoba manje mišićne mase. Starenjem se također smanjuje izlučivanje kreatinina u urinu. Brojne rasprave podvojenih stavova su se vodile o potrebi korekcije metabolita u urinu prema kreatininu u urinu, te ukoliko se učini korekcija o različitim graničnim vrijednostima ovisno o spolu i dobi (208, 209). Međutim, u KDIGO smjernicama iz 2012. godine preporuča se korekcija proteina / albumina prema kreatininu u urinu uz jednu graničnu vrijednost zbog jednostavnosti na populacijskoj razini, što vrijedi i za α 1mg (210). U određivanju metabolita u urinu ključna je adekvatnost uzorka što podrazumjeva specifičnu težinu između 1,010 i 1,030 te se u istraživanjima preporuča isključiti ispitanike s neadekvatnom specifičnom težinom urina, a u kliničkom radu ponoviti uzorkovanje (174).

U adekvatnom uzorku urina rezultati analiziranja α 1mg ostaju postojani pri širem rasponu različitih specifičnih težina, gustoća urina, te kreatinina u urinu za razliku od β 1mg (174). Primjerena reproducibilnost α 1mg između dva mjerenja kao i podudaranje s vrijednostima iz 24-satnog urina omogućava jednokratno uzorkovanje urina te probir na razini populacije (173, 211). Stoga, α 1mg, uz predanalitičku prednost pred β 1mg (212), ima i prednost u analitičkom segmentu u istraživanjima opće populacije (173, 174, 211).

α 1mg je pouzdan biljeg oštećenja proksimalnog tubula (213) i kao takav je najviše istraživani i koristan u sklopu dijagnosticiranja tubulointersticijskih bolesti (214), trovanja teškim metalima (171, 172, 215), a opisane su povišene vrijednosti α 1mg u urinu i u sklopu arterijske hipertenzije (216, 217), dijabetesa tipa I i II (218-221), te multiplom mijelomu (222). Yu i suradnici su našli da se kod granične vrijednosti od 15 mg/g kreatinina vrlo vjerojatno radi o disfunkciji proksimalnog tubula i posljedično tubularnoj proteinuriji (213). U literaturi se navodi da medijan koncentracije α 1mg u tubulointersticijskim bolestima iznosi 37 mg/l uz porast pri sniženju GFR (214).

U EN postoji intermitentni, tubulointersticijski obrazac proteinurije kojeg karakterizira tubularna proteinurija sa ili bez albuminurije koja, ako i postoji, ne prelazi 1 g/dU (166). Itoh i sur. navode da su u žarištima endemske nefropatije vrijednosti α 1mg iznad 20 mg/l nekorrigirane prema kreatininu u urinu prisutne kod 85,7% bolesnih od EN, 50% sumnjivih da boluju, 10,2% rizičnih i 8,1% ispitanika nezahvaćenih EN iz endemskih sela, a s obzirom na nepostojanje pozitivnog nalaza u kontrolnoj skupini, zaključuju da navedena vrijednost od 20 mg/L dobro diferencira endemsko od ne – endemskog stanovništva (168). Čvorišćec je vrijednost poviše 15 mg/g korigiranog

α 1mg prema kreatininu u urinu (α 1mCR) utvrdila kod 90% bolesnih, 41,6% sumnjivih, 7,1 % rizičnih i 8,9 % nezahvaćenih EN (166). Naposljetku, analizom urina 1140 stanovnika Hrvatskog endemskog žarišta ustanovljeno je i prihvaćeno da se uz graničnu vrijednost α 1mCR od 31,5 mg/g kreatinina u urinu s osjetljivošću od 96,3% i specifičnošću od 94,05% dijagnosticira EN (223, 224). Zaključno, prema KDIGO 2012 smjernicama α 1mg je preporučeni biljeg tubularne proteinurije (203, 210, 225). U svijetlu navedenih spoznaja sadašnja preporuka prema novom konsenzusu kriterija je korištenje stabilnijeg α 1mg kao markera tubularne proteinurije u dijagnozi EN (166, 213, 224, 226).

Također se raspravljalo o vrijednosti albuminurije u probiru i dijagnosticiranju EN (227). Štoviše, u istraživanjima EN opisana je i glomerularna ili mješana proteinurija (133), kako u uznapredovalim stadijima bolesti kada dolazi i do glomerularnog oštećenja, tako i kod zdravih članova obitelji s EN (228), ali uz nedostatak prilagodbe za poznate ne – renalne uzroke albuminurije i bez proučavanja omjera α 1mg/alb u urinu. Samo neki od uzroka ne – renalne albuminurije su pojačana fizička aktivnost, vrućica, upalno stanje kao što je npr. zubobolja, endotelna disfunkcija, a u bubrežnoj bolesti je albuminurija primarno odraz oštećenja glomerularne bazalne membrane, te se u primarno tubulointersticijskoj bolesti, kakva je EN, može raditi o „tubularnoj“ albuminuriji zbog izostanka funkcije proksimalnog tubula. Upravo stoga sama albuminurija nije našla mjesto u smjernicama za dijagnosticiranje EN, već omjer α 1mg/alb koji pomaže u diferencijaciji glomerularne i tubularne proteinurije.

Vođeni idejom da oštećenjem proksimalnog tubula dolazi i do pojačane enzimurije, u sklopu EN su proučavani i enzimi četkaste prevlake (AAP, LDH) te lizosomi proksimalnih tubula (NAG). Rezultati istraživanja su potvrdili pojačanu enzimuriju u početnim fazama oštećenja proksimalnog tubula (167, 229), ali napredovanjem strukturalnog oštećenja ona jenjava (156, 230), te usprokos dobroj osjetljivosti, zbog izrazito slabe specifičnosti za EN, enzimurija nije pronašla primjenu u dijagnosticiranju EN.

S obzirom na izraženu intersticijsku fibrozu za očekivati je povećano izlučivanje TGF- β u urinu kod bolesnika sa već razvijenom bolešću. Ipak navedeno nije potvrđeno u recentnom istraživanju našeg endemskog fokusa (223).

1.5.2. Procijenjena glomerularna filtracija

Postoji niz formula za procjenu glomerularne filtracije, a odluka o izboru ovisi o osobinama ispitivane skupine. KDIGO smjernice iz 2012. godine savjetuju uporabu CKD-EPI formule (*engl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) za procjenu GFR kod odraslih osoba (210). U većini istraživanja na polju EN za izračun glomerularne filtracije (GFR) su korištene skraćena MDRD (*engl. Modification of Diet in Renal Disease*) formula ili Cockrault Gault formula (3, 25, 43). CKD - EPI formula je razvijena 10 godina nakon MDRD formule upravo za korištenje u epidemiološkim istraživanjima i koristi iste varijable kao MDRD formula uz veću preciznost kod $eGFR > 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ (231). Budući da terenska istraživanja u endemskim žarištima obuhvaćaju cijelu odraslu populaciju sela, a skraćena MDRD formula u populaciji dominantno s normalnim vrijednostima kreatinina ima tendenciju izračuna lažno nižih vrijednosti eGFR, te time precjenjuje prevalenciju kronične bubrežne bolesti (KBB), preferira se upotreba CKD - EPI formule (232). Dokazavši da MDRD formula značajan broj starijih ispitanika i žena klasificira kao KBB, a kod mlađih muškaraca precjenjuje eGFR, Wetzles i suradnici su preporučili različite granične vrijednosti eGFR za klasifikaciju u stadije KBB (233). Dosta rasprava se vodilo oko korištenju različitih graničnih vrijednosti za klasificiranje KBB ovisno o spolu i dobi ispitanika, ali prema nedavnom izvještaju KDIGO radne skupine stratifikacija prema dobi je odbačena (234).

S ciljem usporedbe rezultata između različitih laboratorija serumski kreatinin bi se trebao određivati metodom slijedivom internacionalnom standardu koji predstavlja izotopna dilucijska masena spektrometrija (IDMS). Važno je za spomenuti da se kod pojedinih bolesnika preporuča navođenje točne vrijednosti eGFR radije nego svrstavanje u stadij KBB (210). U novim smjernicama je objavljena i modificirana klasifikacija u stadije KBB koji sada uzimaju u obzir i albuminuriju korigiranu prema vrijednostima kreatinina u urinu s ciljem boljeg predviđanja prognoze i ishoda (Slika 2.).

Proгноза KBB према категоријама GFR и албуминурије: KDIGO 2012				Категорије перзистентне албуминурије Опис и распон		
				A1	A2	A3
				Normalna до благо повишена	Умјерено повишена	Значајно повишена
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR категорије (ml/min/1.73m ²) Опис и распон	G1	Normalna или visoka	≥90			
	G2	Blago snižena	60-89			
	G3a	Blago до умјерено snižena	45-59			
	G3b	Умјерено до значајно snižena	30-44			
	G4	Значајно snižena	15-29			
	G5	Zatajenje bubrega	<15			

Слика 2. Стадији хроничне бубрежне болести према категоријама eGFR и албуминурије

1.6. Дијагностички критерији за EN и класификацију становништва ендемских села

Prepoznavši razmjere i značaj bolesti Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) je još 1965. godine, na temelju laboratorijskih pokazatelja objavila kriterije za klasifikaciju stanovnika endemskih sela u vjerojatno oboljele u početnom i uznapređovalom stadiju EN na temelju potvrđene proteinurije, povišenja razine kreatinina, nemogućnosti koncentriranja mokraće i postojanja anemije, te sumnjive da boluju s opetovanom proteinurijom, uz obavezno isključenje ostalih uzroka bubrežne bolesti (185). Razvoj medicinske struke i spoznaja o bolesti uvjetovao je modificiranje izvornih kriterija WHO u žarištima EN. Budući da nije pronađen patognomoničan biomarker, dijagnoza EN se još uvijek postavlja kombinacijom epidemioloških i laboratorijskih parametara, a kako su se u državama jugoistočne Europe koristili različiti kriteriji tako nije bilo moguće usporediti naše žarište s žarištima susjednih država. Naime, ili se radi o različitim kombinacijama pojedinih elemenata za klasifikaciju u skupine ili o različitim graničnim vrijednostima laboratorijskih biljega ili različitim dijagnostičkim biljezima (α 1mg ili β 1mg) (185, 235, 236).

U dijagnostičkom algoritmu terenskih istraživanja populacije endemskog žarišta bitno je isključiti uzorke urina neadekvatne specifične težine, te anamnezom, fizikalnim statusom, biokemijskim metodama, analizom urina, slikovnim metodama, a po potrebi i biopsijom bubrega isključiti druge uzroke bubrežnog zatajenja (224).

U hrvatskom endemskom žarištu Brodske Posavine u sukcesivnim istraživanjima od 1980 – tih godina, s usporedivim odazivom ispitanika, dosljedno su se primjenjivali modificirani kriteriji WHO što omogućuje praćenje dinamike bolesti tijekom vremena. Dijagnoza EN prema modificiranim WHO kriterijima se postavlja ukoliko su prisutni sljedeći elementi: a) pozitivna obiteljska anamneza domaćinstva na EN; b) proteinurija ($\alpha 1\text{mCR} > 14 \text{ mg/g}$ ili $\alpha 1\text{M} > 10 \text{ mg/L}$), c) anemija (Hgb muškarci $< 120 \text{ g/l}$, žene $< 113 \text{ g/l}$); d) azotemija (serumski kreatinin $> 132,6 \text{ }\mu\text{mol/l}$) uz obavezno isključenje ostalih uzroka bubrežnog zatajenja ili kombinacija pozitivne obiteljske anamneze, tubularne proteinurije i anemije ili postojanje tubularne proteinurije, anemije i azotemije. Osoba se proglašava sumnjivom da boluje od EN ukoliko je prisutna pozitivna obiteljska anamneza i tubularna proteinurija ili tubularna proteinurija i anemija, a osobe koje su pod većim rizikom od obolijevanja od EN su one koje žive u kućanstvima gdje je bilo oboljelih od EN, to jest gdje je obiteljska anamneza pozitivna.

U Bosni i Srbiji najčešće su se koristili tzv. Danilovićevi kriteriji (185, 235, 236). Danilovićevi kriteriji su sljedeći: a) boravak u endemskom području i pozitivna obiteljska anamneza, b) proteinurija ($\beta 2\text{mg} > 200 \text{ mg/g}$ kreatinina ili $\alpha 1\text{mCR} > 13,26 \text{ mg/g}$ kreatinina tj. $> 1,5 \text{ mg/mmol}$ kreatinina ili proteinurija detektirana sulfasalacilnom kiselinom, c) anemija (Hgb $< 130 \text{ g/L}$ za muškarce i žene u postmenopauzi; Hgb $< 120 \text{ g/L}$ za žene s održanim menstrualnim ciklusom), d) zadržavanje dušičnih spojeva (ureja $> 17,8 \text{ mmol/l}$; serumski kreatinin $> 132,6 \text{ }\mu\text{mol/l}$), e) niska specifična težina urina ($< 1,005$), f) simetrično smanjeni bubrezi ($< 10 \text{ cm}$). Uz obavezno pozitivne prva dva kriterija kada se osoba smatra da je pod rizikom od obolijevanja, još jedan pozitivan kriterij ju svrstava u sumnjive da boluje, a povrh toga još jedan kriterij je potreban da bu osoba bila klacificirana kao bolesna EN.

Danilovićevi kriteriji, ako se koristi samo detekcija proteinurije sulfasalacilnom kiselinom, a ne i $\alpha 1\text{mg}$ kao biljeg proteinurije, omogućavaju razlikovanje EN bolesnih i sumnjivih od zdravih kontrola, ali ne i od osoba s drugim bubrežnim bolestima (237), što govori u prilog tome da se u prošlosti neprecizno klasificiralo stanovništvo endemskih žarišta Srbije.

Uočeno je da dijagnostički kriteriji postavljaju dijagnozu EN tek u uznapređovalom stadiju bubrežnog zatajenja, te su provedene brojne studije s ciljem otkrivanja prediktivnih čimbenika za razvoj EN, kao i specifičnijih graničnih vrijednosti ili

dijagnostičkih biljega (223, 237-239). Đukanović i suradnici su, u multivarijatnom logističkom modelu svih Danilovićevih dijagnostičkih varijabli, ustanovili da su jedino povišeni α 1mg i smanjena duljina bubrega prediktivni čimbenici EN koji diferencijalno dijagnostički razlikuju EN od drugih skupina bubrežnih bolesti (OR 5.41, 95% CI 1.20–24.44; $p=0,0283$ za α 1mg i OR 0.96, 95% CI 0.94–0.98; $p=0,0007$ za duljinu bubrega) i od zdravih osoba (OR 7.72, 95%CI 1.90–31.36; $p=0.0042$ za α 1mg i OR 0.96, 95%CI 0.93–0.99; $p=0.0174$ za duljinu bubrega). Gledajući koji čimbenici razlikuju EN od pojedinih bubrežnih bolesti utvrđeno je da niža razina proteinurije omogućuje razlikovanje EN od glomerulonefritisa, viši sistolički AT i manja duljina bubrega od ostalih tubulointersticijskih bolesti, dok viši α 1mg razlikuje EN od hipertenzivne nefroangioskleroze. No, nedostatak potpunijeg raščlanjivanja je mali broj ispitanika pojedine skupine drugih bubrežnih bolesti; 20 ispitanika s glomerulonefritsom, 17 s tubulointersticijskim bolestima druge etiologije i 20 s nefroangiosklerozom (240). Druga skupina autora smatra da je ultrazvučno određena duljina bubrega nedovoljno osjetljiva za detektiranje početka razvoja bolesti, te da su u početku bolesti bubrezi normalne veličine ili diskretno manji, dok se tek razvojem bolesti dodatno izrazito smanjuju kada je već bolest u poodmakloj fazi, te se opisuje da su bubrezi bolesnika s EN među najmanjima na autopsijskim nalazima (153).

Hanjangsit i suradnici su koristeći statističku „path“ analizu ustanovili direktan i indirektan utjecaj obiteljske anamneze putem smanjenja dužine bubrega i glomerularne filtracije na predikciju pojave EN (241). Ista, Bugarska skupina istraživača ističe da čak i „zdravi“ potomci obitelji s EN imaju više vrijednosti ukupnih proteina, albumina i β 1mg u urinu, te manju longitudinalnu duljinu bubrega i širinu korteksa u odnosu na kontrole bez pozitivne obiteljske anamneze te smatraju da su navedeni parametri stoga primjereni biljezi rane faze EN (133, 242). Za naglasiti je da je duljina bubrega potomaka bolesnika s EN u ovim istraživanjima još uvijek u referentnim intervalima, te da nije učinjena prilagodba prema visini i masi, tj. uspoređene skupine prema volumenu bubrega.

S ciljem selekcije elemenata s jačom dijagnostičkom snagom u postavljanju dijagnoze EN te isključenja redundantnih podataka, Cvitković je pomoću višedimenzionalne CoPlot analize ispitao međudjelovanje dijagnostičkih biljega prema WHO klasifikaciji i ustanovio da su elementi WHO kriterija s najvećom korelacijom uz različite orijentacije prikaza: pozitivna obiteljska anamneza, glomerularna filtracija procijenjena Cockroft Gaultovom formulom, proteinurija, hematokrit i α 1mg. Za uočiti je da eGFR ima veću korelaciju od izolirane vrijednosti kreatinina. Duljina boravka u obitelji, regiji ili selu i dob su redundantni podaci te je, ako se uključuju u kriterije, potrebno izabrati samo jedan od njih, a oni negativno

koreliraju s obiteljskom anamnezom za EN prema čemu autor zaključuje da bi genska predispozicija mogla utjecati na brže oboljenje kod jednako izloženih ispitanika (238, 239).

Dika je potvrdila superiornost eGFR nad izoliranom vrijednosti kreatinina u razlikovanju zahvaćenog stanovništva od kontrola, kao značaj smanjenog uzdužnog promjera i debljina parenhima bubrega, te istaknula važnost pozitivne obiteljske anamneze u determinaciji ishoda. Anemija je imala najslabiju moć diskriminacije WHO podskupina. Testirajući dijagnostičke kriterije određena je granična vrijednost korigiranog $\alpha 1\text{mCR}$ od 31,5 mg/g koja sa 96,3% osjetljivosti i 94% specifičnosti klasificira stanovništvo endemskih sela (223).

Budući da se pomoću kriterija dijagnoza EN postavlja tek u poodmaklom stadiju ciljna skupina terenskih istraživanja su sumnjivi da boluju od EN koji predstavljaju najugroženiju subpopulaciju sela (223, 237).

Svjesni ograničenja i opsolentnosti, kao i potrebe ujednačenih kriterija u različitim žarištima, tim s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu osnovao je radnu skupinu stručnjaka iz područja EN i AAN i još 2008. godine na Braču postavljen je kao glavni cilj budućih istraživanja definiranje kriterija za postavljanje dijagnoze EN, te je 2013. godine rezultiralo konsenzusom o probiru, dijagnosticiranju i liječenju EN prema kojem se stanovništvo endemskih sela klasificira pomoću tzv. Bračkih kriterija (224).

U konsenzusu za dijagnostiku EN je poseban naglasak stavljen na postojanje tubularne proteinurije koja je definirana vrijednošću $\alpha 1\text{mCR}$ iznad 31,5 mg/g i omjerom $\alpha 1\text{mg}/\text{alb}$ većeg ili jednakog 0,91 uz postojanje albuminurije kao potvrde dominantno tubularnog podrijetla proteinurije. Redefinirane su i granične vrijednosti za anemiju ovisno o dobi ženskog spola. Po prvi puta su u obzir uzeti karcinomi gornjeg dijela urotela kao dio entiteta EN koji u udruženosti s tubularnom proteinurijom i boravkom u EN području potvrđuju dijagnozu EN. Sami UUC endemskog područja uzrokovani AA se dijagnosticiraju uobičajenim metodama prema smjernicama koje podrazumjevaju citološku analizu urina ili slikovne metode (CT, MRI urografija, ureterskopija, retrogradna pijelografija) (138, 243), a po nefroureterektomiji bi iz tkiva korteksa bubrega udaljenog od tumora trebalo odrediti AA adukte, te specifičnu mutaciju tp53 gena u tumorskom tkivu kao definitivnu potvrdu AA induciranog UUC. U konsenzusu je ključna pozitivna anamneza domaćinstva jer ona indirektno definira izloženost individue. Boravak u endemskom selu je bitan u kombinaciji s UUC, dok je u prethodnim Danilovićevim kriterijima boravak u endemskom selu predstavljao „*conditio sine qua non*“ za definiranje dijagnoze EN, te time ograničavao dijagnosticiranje sporadičnih slučajeva EN izvan

endemskih sela. Uključivanjem UUC u definiranje bolesti i dugotrajnog boravka u domaćinstvu s anamnezom EN omogućeno je postavljanje dijagnoze sporadične EN i izvan endemskog područja (224).

1.7. Prevencija i liječenje endemske nefropatije

Epidemiološka i etiološka istraživanja EN su potaknula napredak u endemskim selima. Terenskim istraživanjem ustanovljeno je da bolesni posjeduju veću ukupnu količinu zemlje i da su njihove livade i polja smještene uz rub močvara, a time i češće poplavljena što potiče rast vučje stope (244). Budući da je zahvaćeno područje često bilo plavljeno prelijevanjem rijeke Save i kako se smatralo da je zagađena voda uzrok bolesti, 1978. godine je izgrađen nasip, 1980. tih godina sustav odvodnih kanala, a 1990. tih je proveden vodovod za vodoopskrbu iz glavnog vodovoda Slavenskog Broda.

U svijetlu otkrića etiološkog uzročnika EN, dodatni naponi se trebaju uložiti u svrhu prevencije izloženosti aristolohičnoj kiselini. Usprkos tome što su same tehnološke promjene žetve osigurale smanjenje izloženosti endemskog stanovništva aristolohičnoj kiselini, još je uvijek neophodna edukacija stanovništva o uzroku EN, nefrotoksičnim i kancerogenim svojstvima AA te izbjegavanju izloženosti aristolohičnoj kiselini.

Ključno je također provoditi edukaciju stanovništvo o općim mjerama prevencije razvoja KBB pomoću implementacije zdravih životnih navika, a samo neke od njih su nepušenje, konzumacija hrane s manje soli (do 3 gr dnevno), redovita tjelesna aktivnost i održavanje primjerene tjelesne mase. Jednako bitne su i mjere sekundarne prevencije čimbenika rizika koje obuhvaćaju strogu kontrolu arterijskog tlaka, regulaciju glikemije, lipidnog profila i primjerene tjelesne težine.

Bolesnik s EN u terminalnom stadiju bubrežnog zatajenja na raspolaganju ima sve tri metode NBF (peritonejsku dijalizu, hemodijalizu te transplantaciju bubrega). Prognoza bolesnika na hemodijalizi zbog EN je neovisna o postojanju UUC (4) i opisano je čak dulje preživljenje bolesnika s EN na HD u usporedbi s ostalom hemodijaliziranom populacijom (148). Međutim, transplantacija bubrega je metoda izbora NBF zbog boljeg preživljenja (245-247), usprkos većem riziku razvoja karcinoma čemu predisponira imunosupresijska terapija. Kako je EN udružena s karcinomima gornjeg dijela urotela koji se paralelno s EN razvijaju u 10-30%

slučajeva (4, 147, 248), tako je potrebna detaljna pretransplantacijska obrada s ciljem detekcije karcinoma. Općenito je rizik razvoja karcinoma 13 puta češći kod bolesnika s transplantiranim organom nego kod opće populacije (249) i 10 puta češći nego kod hemodijalizirane populacije (250), a kod transplantiranih bolesnika s EN rizik razvoja UUC u posttransplantacijskom periodu je značajan. Naime retrospektivnom analizom 601 transplantiranog bolesnika od 1995. do 2004. godine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb ustanovljeno je da je od 9 bolesnika s EN kod kojih je učinjena transplantacija bubrega njih troje (33,3%) razvilo UUC, što je značajno više u usporedbi s 0,67 % UUC kod ostale transplantirane populacije (251). Usprkos malom broju bolesnika s EN, budući da je EN rijetka bolest, bolesnici starije životne dobi, te zahvaćena područja nemaju adekvatno razvijen transplantacijski program ovo je značajno istraživanje.

Stoga bi, kandidatima za transplantaciju s EN mlađim od 65 godina, bilo uputno učiniti binefroureterektomiju vlastitih bubrega, a kasnije u imunosupresijskom protokolu koristiti m-Tor inhibitore zbog manjeg proneoplastičnog djelovanja. Isto se preporuča i za osobe starije od 65 godina ukoliko su već imali karcinom urotelnog sustava ili pozitivnu obiteljsku anamnezu za UUC (224). Uz uobičajeno redovito praćenje bolesnika s transplantiranim organom, u slučaju da nije učinjena nefrektomija, kod bolesnika s EN je uputno analizirati urin citološki svakih 6 mjeseci, a jednom godišnje učiniti slikovnu dijagnostiku (224). Nije opisan povratak bolesti u transplantirani bubreg, a funkcija grafta je usporediva s onom kod transplantacije zbog drugih uzroka bubrežnog zatajenja (252).

U slučaju primarnog razvoja UUC potrebno je učiniti radikalnu nefroureterektomiju s odstranjenjem dijala mokraćnog mjehura zbog učestalih lokalnih recidiva, a ako je tehnički izvedivo analizirati postojanje AA adukata u korteksu bubrega i Tp53 mutacija tumorskog tkiva. Samo uz strogu kliničku indikaciju, kod ograničenog obostranog UUC se može učiniti unilateralno pošteditna, a kontralateralno radikalna operacija uz redovito i dugoročno praćenje. Kod proširene ili neresektabilne bolesti, ukoliko to dozvoljava opće stanje bolesnika i komorbiditeti, upotrebljavaju se standardni kemoterapijski protokoli, adjuvantno liječenje te potporne mjere (243).

1.8. Svrha istraživanja

Prevalencija EN je desetljećima bila stabilna, a posljednjim terenskim istraživanjem u sklopu projekata Ministarstva znanosti obrazovanja i športa, Hrvatske zaklade za znanost i FIRCA-e (*engl. Fogarty International Research Collaboration Award*), kojeg je dio i ovaj rad, je ustanovljeno da je prevalencija EN u opadanju, dok je dob oboljelih pomaknuta prema starijim dobnim skupinama. Uzrok navedenom najvjerojatnije je smanjenje izloženosti vanjskom uzročniku u hrvatskom endemskom žarištu što bi za posljedicu moglo imati postupno nestajanje EN. Unazad 15-20 godina došlo je do značajnih tehnoloških promjena u procesu obrade zemlje, tretiranju usjeva, žetve, čišćenja žita, pohrane, proizvodnje i nabavke kruha te stoga stanovnici endemskog kraja više nisu izloženi učincima AA. U tom razdoblju u hrvatsko endemsko žarište kao posljedica ratnih, ali i ekonomskih zbivanja, je uselio velik broj stanovnika iz bosanskih ne-endemskih sela, te bi se spomenuto smanjenje ili nestajanje izloženosti kod onih koji su naselili endemska sela nakon agrikulturnih promjena (<30 godina), a žive dovoljno dugo da razviju početno oštećenje bubrežne funkcije, ukoliko izloženost postoji (>15 godina), trebalo reflektirati u nepromijenjenoj bubrežnoj funkciji unatoč boravku u endemskim selima. Nakon tzv. „prvog biološkog pokusa“ s Ukrajincima (14) koji je pokazao da je za nastanak EN presudna izloženost vanjskom čimbeniku i način života u određenoj sredini, ovaj „drugi biološki pokus“ pokazat će postoji li i dalje izloženost vanjskom faktoru, ili je izloženost prestala, te može li se očekivati postupno iščezavanje EN. Ovim „drugim biološkim pokusom“ će se odrediti aktivnost žarišta, ali i potvrditi etiološka uloga AA u EN.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza istraživanja

U proteklih dvadesetak godina došlo je do značajnih tehnoloških promjena žetve, vršidbe, mljevenja žita, te načina pripreme i nabavke kruha zbog čega osobe u endemskim selima danas nisu izložene toksičnom učinku AA. Zbog toga osobe koje su se u endemska sela doselile iz ne-endemskih krajeva Bosne nakon smanjenja izloženosti, premda žive dovoljno dugo u EN selu, više nemaju rizik obolijevanja od EN, te je u toj podskupini imigranata endemskih sela učestalost bubrežnog oštećenja značajno manja od učestalosti u starosjedioca i jednaka je učestalosti u kontrolnog ne-endemskog stanovništva.

2.2. Ciljevi istraživanja

2.2.1. Opći cilj

Odrediti učestalost bubrežnog oštećenja u starosjedioca endemskih sela, u imigranata iz ne-endemskih sela koji su se doseljeli unatrag 15 do 30 godina u endemska sela, i stanovnika ne-endemskih sela.

2.2.2. Specifični ciljevi

Procijeniti promjenu izloženosti aristolohičnoj kiselini u odnosu na razdoblje prije 20-30 godina na temelju epidemiološkog upitnika. Odrediti povezanost oštećenja bubrežne funkcije s izloženosti aristolohičnoj kiselini.

Odrediti prevalenciju EN pomoću tri vrste kriterija (WHO, Brački konsenzus, Danilović kriteriji), te usporediti različite vrste kriterija.

Odrediti prevalenciju EN i dob ispitanika s EN i usporediti s podacima prijašnjih epidemioloških studija koristeći WHO kriterije.

Odrediti broj i dob bolesnika koji su u razdoblju od 1995. do 2012. godine iz svih endemskih sela hrvatskog žarišta započeli s nadomještanjem bubrežne funkcije zbog EN u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu, te broj i dob bolesnika

iz ispitivanih endemskih sela koji su od 1995. do 2012. godine operirani zbog UUC u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Provedba istraživanja

U ovom presječnom opservacijskom istraživanju bila je uključena populacija 9 sela endemskog hrvatskog žarišta: Banovci, Bebrina, Dubočac, Kaniža, Pričac, Slavonski Kobaš, Šumeće, Zbjeg, Živike, te 3 kontrolna sela: Donja Bebrina, Klakar i Rastušje. Istraživanje je provedeno jednokratnim probirom stanovništva 2005., 2008. i 2010. godine kao dio u znanstveno-istraživačkog projekta „Endemska nefropatija u Hrvatskoj - epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza“(108-00000000-0329), Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta.

U istraživanju su sudjelovali liječnici, medicinske sestre i tehničari Zavoda za arterijsku hipertenziju, nefrologiju, dijalizu i transplantaciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Klinike za unutarnje bolesti te Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu i Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije, te liječnici obiteljske medicine iz Slavanskog Kobaša, Bebrine i Lužana. Istraživanje je započelo nakon dobivenih etičnih odobrenja nadležnih institucija, održanih javnih tribina u endemskim selima, te uz potpisani informirani pristanak ispitanika. Svi punoljetni stanovnici ispitivanih sela su dobili na kućnu adresu termin ambulantnog pregleda uz uputu o mogućnosti dogovora i informirani pristanak za sudjelovanje.

U provedbenom smislu istraživanje je podijeljeno u dva dijela, prvi u mjesnoj ambulanti te drugi u kućama stanovnika.

Prvi dio se sastojao od kliničkog pregleda, osobne i obiteljske anamneze, uzimanja uzorka krvi natašte i 2. jutarnjeg uzorka mokraće te ultrazvučnog pregleda urotrakta. Odmah po uzorkovanju uzorci su pripremljeni i pohranjeni na suhom ledu, te transportirani u Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb gdje su po primitku analizirani.

U drugom dijelu istraživanja liječnici su „od vrata do vrata u domaćinstvima sela“, ujednačenom metodom provodili detaljan epidemiološki upitnik i mjerili arterijski tlak. Ispitivači su u nekoliko navrata obilazili domaćinstva ukoliko su ukućani bili odsutni. Uzorci i upitnik ispitanika su bili šifrirani unaprijed definiranim jedinstvenim šesteroznamenkastim identifikacijskim kodom.

Terenski dio istraživanja je trajao etapno od početka ožujka 2005. do kraja travnja 2010. godine. Prikupljeni podaci iz upitnika i laboratorijski nalazi su unešeni neovisno od stane kolega u Slavonskom Brodu i Zagrebu u Microsoft XL Excell 2007 Office paketu te su potom baze usporedjene, a neslaganja su prekontrolirana u originalnim

nalazima i zapisima. Podaci o novodijaliziranim i operiranim bolesnicima zbog UUC od 1995. do 2012. godine prikupljeni su iz aktualne medicinske dokumentacije i arhiva Odjela za dijalizu, te arhiva Odjela za patologiju Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu, medicinskih kartona obiteljskih liječnika iz ispitivanih endemskih sela, te Zavoda za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije.

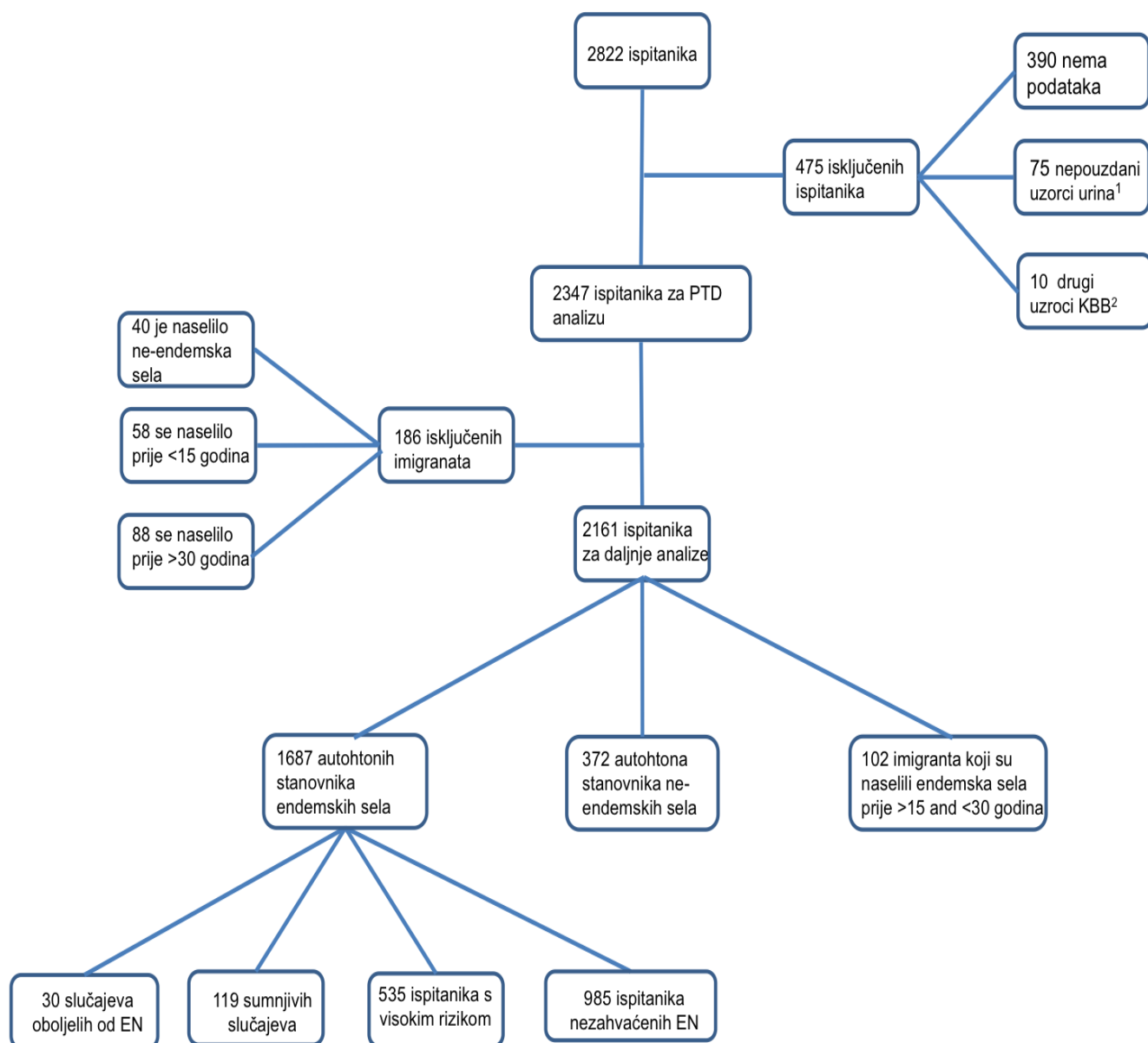
3.2. Ispitanici:

U epidemiološkom, terenskom istraživanju (povijesno zvanom „perlustracija“) je sveukupno pregledano 2822 punoljetna stanovnika iz 9 hrvatskih endemskih sela: Kaniža, Bebrina, Banovci, Slavonski Kobaš, Živike, Pričac, Šumeće, Zbjeg i Dubočac, te tri kontrolna sela: Klakar, Donja Bebrina i Rastušje (Tablica 4.). Istraživanje je obuhvatilo značajan i usporediv postotak ispitanika iz pojedinog sela u odnosu na prethodne perlustracije (3).

Tablica 4. Postotak pregledanog stanovništva iz pojedinog sela

Selo	Godina terenskog istraživanja	Punoljetno stanovništvo	Pregledano stanovništvo	
		N	N	(%)
Slavonski Kobaš	2008.	893	750	(84)
Živike	2008.	183	125	(68)
Pričac	2008.	76	63	(83)
Kaniža	2005.	561	297	(53)
Bebrina	2005.	350	203	(58)
Banovci	2005.	250	149	(60)
Šumeće	2010.	415	330	(80)
Zbjeg	2010.	336	231	(69)
Dubočac	2010.	163	131	(80)
Donja Bebrina	2005.	317	227	(72)
Klakar	2008.	201	181	(90)
Rastušje	2010.	219	135	(62)
Ukupno		3964	2822	(71)

Od ukupnog broja uključenih ispitanika iz analize je isključeno 390 ispitanika zbog nedostatka podataka ključnih za klasifikaciju, 75 zbog neadekvatne specifične težine urina ($< 1,002$ ili $>1,030$), a 10 zbog zatajenja funkcije bubrega uslijed druge etiologije, ostavljajući ukupan broj od 2347 ispitanika za procjenu čimbenika rizika oštećenja proksimalnog tubula (PTD), kao početnog biljega EN i klasifikaciju ispitanika prema kriterijima za EN. U ovom istraživanju fokusirali smo se na skupinu imigranata iz bosanskih ne – endemskih sela koji su se doseljeli nakon predmnjevanog smanjenja/nestanka izloženosti AA uslijed agrikulturnih promjena, a koji su živjeli dovoljno dugo u endemskom kraja da razviju početno oštećenje bubrežne funkcije ukoliko izloženost postoji. Stoga su u daljnu analizu uključeni imigranti iz ne–endemskih sela Bosne koji su se doseljeli u razdoblju unatrag 30 godina, a koji su živjeli dulje od 15 godina u hrvatskim endemskim selima (BoEN, N=102), a imigranti endemskih sela koji su živjeli dulje ili kraće su isključeni iz analize, kao i imigranti ne-endemskih sela, rezultirajući s ukupnim brojem od 2161 ispitanika za glavnu analizu. (Slika 3.). Posebno je uspoređena bubrežna funkcija skupine bosanskih imigranata endemskih sela ($>30<15$ godina) s bosanskim imigrantima ne – endemskih sela.



Slika 3. Dijagram istraživanja.

PTD – oštećenje proksimalnog tubula definirano vrijednošću $\alpha 1\text{mCR} > 31,5 \text{ mg/g}$, EN – endemska nefropatija, KBB – kronična bubrežna bolest

¹ specifična težina urina manja od 1.002 ili veća od 1.030.

² zatajenje funkcije bubrega uslijed drugih uzroka (polycistična bolesti bubrega kod jednog bolesnika, nefrolitijaza kod jednog bolesnika, planocelularni karcinom urotela kod jednog bolesnika, dijabetička nefropatija kod dva bolesnika, nefroangioskleroza kod dva bolesnika, reumatoidni artritis kod jednog bolesnika, kronični pijelonefritis kod dva bolesnika)

Temeljna klasifikacija endemskog stanovništva učinjena je prema novom konsenzusu, tzv. Bračkim kriterijima (224) koji su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Klasifikacija stanovništva endemskih sela

<u>I. Bolesni EN</u> 1. Patohistološki nalaz karakterističan za EN ili 2. Boravak u EN domaćinstvu > 20 godina + tubularna proteinurija¹ + snižena eGFR² + anemija³ ili 3. Boravak u EN selu > 20 godina + UUC + tubularna proteinurija¹	<u>II. Sumnjivi da boluju</u> 1. Boravak u EN domaćinstvu > 20 godina + snižena eGFR² + anemija³ ili 2. Boravak u EN domaćinstvu > 20 godina + tubularna proteinurija¹ ili 3. Boravak u EN selu > 20 godina + UUC
<u>III. Rizični za EN</u> 1. Boravak u EN domaćinstvu > 20 godina 2. Boravak u domaćinstvu sa sporadičnom/sumnjivom EN > 20 godina	<u>IV. Sporadična EN</u>⁴ Patohistološki nalaz karakterističan za EN u bolesnika s UUC ili u istom domaćinstvu izvan endemskih žarišta

¹ α -1MCR >31.5 mg/g i α 1mg/alb $\geq$ 0.91, ² eGFR <60 ml/min/1,73m², ³ Hgb <120 g/l za muškarce i žene >50 godina; <110 g/l za žene $\leq$ 50 godina,

⁴ Isključiti ispitanike s kroničnim tubulointersticijskim nefritisom druge etiologije (refluksna nefropatija, kronični, rekurentni pijelonefritis, hipertenzivna nefroangioskleroza, izloženost olovu, kadmiju, biljkama koje sadrže aristolohičnu kiselinu, ciklosporinu A, ifosfamid, pamidronat, litij, nitroureji, nesteroidnim antireumaticima, te dijabetičku nefropatiju, policističnu bolest bubrega ili glomerulonefritise.

Kako bi se napravila analiza kretanja prevalencije bolesti u našem žarištu kroz vremenski period od tridesetak godina populacija je klasificirana i pomoću modificiranih kriterija WHO iz 1965. godine (185). Budući da je jedan od ciljeva istraživanja usporediti različite kriterije u klasificiranju stanovništva endemskog područja, naša skupina je klasificirana i prema tzv. Danilovićevim kriterijima najčešće korištenim u istočnim endemskim žarištima (235). U izvornim Danilovićevim kriterijima postojanje tubularne proteinurije je bilo definirano pozitivnim testom sulfasalicilne kiseline, a kasnije povišenim vrijednostima β 2mg ili α 1mg. Dijagnoza EN prema modificiranim WHO kriterijima iz 1965. godine je postavljena ukoliko su prisutni svi sljedeći elementi: a) pozitivna obiteljska ili anamneza domaćinstva na EN; b) proteinurija (α 1mCR > 14 mg/g ili α 1mg > 10 mg/L) c) anemija (Hgb muškarci < 120 g/l, žene < 113 g/l); d) azotemija (serumski kreatinin > 132,6 μ mol/l) ili kombinacija b+c+d ili a+b+c uz isključenje ostalih uzroka bubrežne

bolesti. Osoba se proglašava sumnjivom da boluje od EN ukoliko su ispunjeni a+b ili b+c, a ugrožene osobe su one koje žive u kućanstvima gdje je bilo oboljelih od EN, to jest gdje je obiteljska anamneza pozitivna.

Danilovićevi kriteriji i granične vrijednosti korištene u klasifikaciji su sljedeće: a) pozitivna obiteljska anamneza i boravak u endemskom području, b) proteinurija ($\alpha_1\text{mCR} > 13,2 \text{ mg/g}$), c) anemija ($\text{hgb} < 130 \text{ g/l}$ za M i žene u menopauzi, $< 120 \text{ g/l}$ za ostale Ž), d) azotemija (serumski kreatinin $> 132,6 \text{ } \mu\text{mol/l}$), e) niska specifična težina urina ($< 1,005$), f) simetrično smanjeni bubrezi (uzdužni promjer $< 10 \text{ cm}$). Bolesni od EN se smatraju oni koji zadovoljavaju prve dvije točke uz još dvije, sumnjivi da boluju od EN oni koji ispunjavaju prve dvije uz još jednu, a ugroženi prve dvije točke. Kombinacije elemenata modificiranih WHO kriterija, konsenzusa, te Danilovićevih kriterija za klasifikaciju stanovništva endemskih sela su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Kombinacije elemenata za klasifikaciju EN prema modificiranim WHO kriterijima, konsenzus “Brač”, te Danilovićevim kriterijima

	Kriteriji za dijagnosticiranje EN		
	“Brački” konsenzus	Modificirani WHO	Danilovićevi
Bolesni	a+b+c+d a+b+e f	a+b+c+d b+c+d a+b+c	a+b + još 2 elementa* *ili c ili d ili simetrično smanjeni bubrezi(<10cm) ili niska spec.težina urina
Sumnjivi da boluju	a+b a+c+d a+e	a+b b+c	a+b+još 1 element
Rizični za EN	a	a	a+b
Ostali/nezahvaćeni	negativne kombinacije kriterija		
a) pozitivna obiteljska anamneza i/ili >20 god u EN selu ili kućanstvu b) tubularna proteinurija c) anemija d) ↑ kreatinin ili ↓ eGFR e) karcinom gornjeg dijela urotela f) patohistološki nalaz karakterističan za EN			
isključenje ostalih uzroka KBB			

isključenje ostalih uzroka KBB

Prevalencija EN je izražena u obliku postotka, a vrijednosti su dobivene dijeljenjem oboljelih od EN i ukupnog broja stanovnika pojedinog endemskog sela prema važećem popisu stanovništva iz 2011. godine. Prevalencija EN je izračunata koristeći sve tri vrste kriterija, Bračke, modificirane WHO i Danilovićeve kriterije. U usporedbi s prevalencijom EN u prošlosti je promatrana prevalencija dobivena modificiranim WHO kriterijima jer su oni korišteni u ranijim istraživanjima. Za naglasiti je da u dosadašnjim istraživanjima prevalencije i promjene prevalencija endemske nefropatije nije rađena standardizacija prema populaciji, te se s obzirom na to ograničenje i u ovoj usporedbi treba s oprezom interpretirati dobivene rezultate.

3.3. Metode:

3.3.1. Klinički pregled

Tijekom kliničkog pregleda izmjerena je tjelesna visina, tjelesna masa, određen indeks tjelesne mase (ITM), te izmjeren arterijski tlak (AT). Prema smjernicama Europskog društva za hipertenziju (253), AT je mjereno tri puta Omron digitalnim tlakomjerom s odgovarajućom manžetom u sjedećem položaju nakon 5 minuta odmora. AT je mjereno u kućnoj posjeti i prilikom ambulantnog pregleda po tri puta i srednja vrijednost od zadnja dva mjerenja pojedinog posjeta je smatrana konačnom vrijednošću. Hipertenzija je definirana kao vrijednost $AT \geq 140/90$ mmHg i/ili korištenje antihipertenzivne terapije. Dijabetes je dijagnosticiran ukoliko su vrijednosti glukoze natašte bile veće od 7 mmol/L i/ili korištenje antidijabetičke terapije (254). Veličina glomerularne filtracije procijenjena je pomoću 2009 CKD-EPI jednadžbe (231): $eGFR = 141 \times \min(kreatinin(s)/k, 1)^\alpha \times \max(kreatinin(s)/k, 1)^{-1.209} \times 0.993^{dob} \times 1.018$ (ako je ispitanik žena) $\times 1.159$ (ako se radi o crnoj rasi). Konstanta k iznosi 0.7 za ženski spol i 0.9 za muški spol, α je -0.329 za ženski spol i -0.411 za muški spol, min označava minimum kreatinina (s)/k ili 1, i maks označava maksimum kreatinina (s)/k ili 1. Vrijednosti eGFR ispod 60 ml/min/1,73m² su bile granične za postavljanje dijagnoze KBB, a stadiji KBB su definirani prema KDIGO smjernicama (210, 234) (Tablica 7). Oštećenje proksimalnog tubula je smatrano prisutnim ukoliko je vrijednost α_1mCR bila poviše 31,5 mg/g kreatinina u urinu. U istraživanju je

korišten ultrazvučni aparat Siemens Sonoline SI 250 s konveksnom sondom od 3,5 MHz za analiziranje morfologije bubrega, te mjerenje duljine bubrega.

Tablica 7. Stadiji kronične bubrežne bolesti

Stadij	Opis	eGFR (ml/min/1,73m ²)
1	Bubrežno oštećenje s normalnom ili visokom GF	> 90
2	Blago snižena GF	60 – 90
3a	Blago do umjereno snižena GF	45 – 59
3b	Umjereno do značajno snižena GF	30 – 44
4	Značajno snižena GF	15 – 29
5	Zatajenje funkcije bubrega	<15

3.3.2. Upitnik

U svrhu ispitivanja nekadašnje i sadašnje izloženosti aristolohičnoj kiselini napravljen je epidemiološki upitnik koji sadržava demografske podatke, podatke o bolestima i navikama, te podatke o izloženosti potencijalnim nefrotoksinima s posebnim naglaskom na izloženost aristolohičnoj kiselini putem prehrane, kao i podatke o promjenama načina života koje su mogle dovesti do promjene u izloženosti toksinu tijekom posljednjih 20-30 godina.

Pitanja iz upitnika koja su analizirana u ovom radu su podijeljena u podskupine:

- socio–demografski podaci i podaci o podrijetlu, migracijama i domaćinstvu
- podaci o navikama (pušenje)
- podaci o sijanju žita, načinu obrade, vršidbi, stanju polja prije 20-30 godina i sada
- podaci o viđanju biljke *Aristolochia clematitis* (vučja stopa) na poljima i njenih sjemenki među sjemenkama namijenjenim za brašno prije 20–30 godina i sada
- podaci o mljevenju brašna, pripremi te konzumaciji kruha prije 20-30 godina i sada.

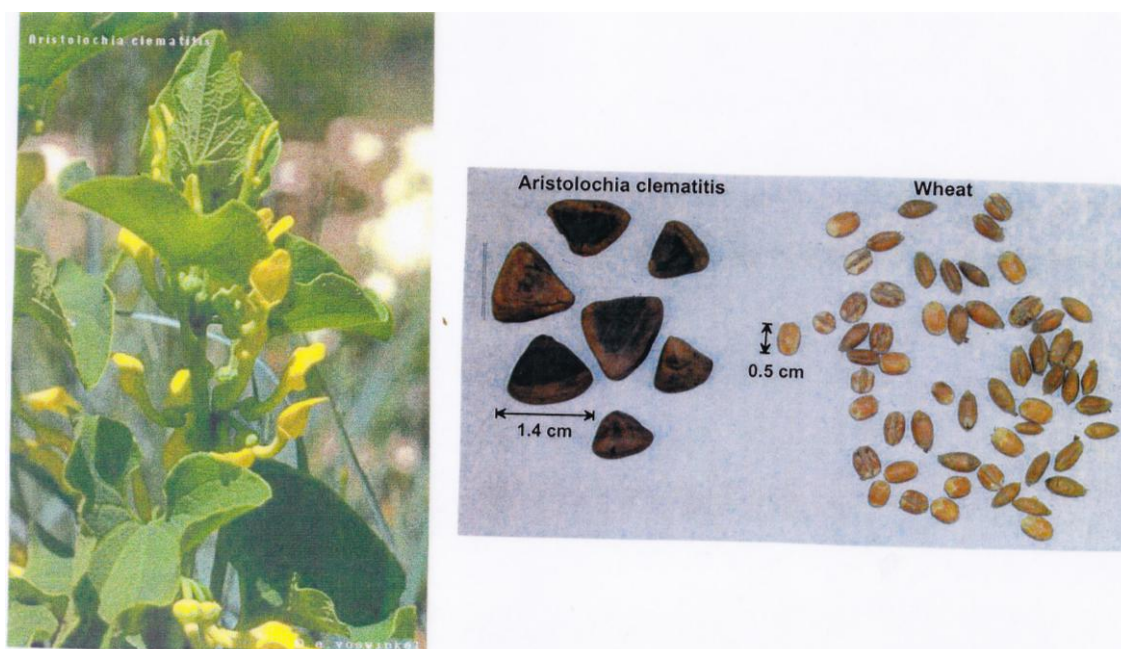
Kako bi se ispitale tehnološke promjene i promjene u načinu života koje su mogle dovesti do smanjivanja izloženosti aristolohičnoj kiselini, analiziralo se imaju li stanovnici sela u istoj mjeri polja i siju li žito, promjena upotrebe herbicida, kombajna, viđanja korova na poljima i promjena u nabavci brašna i kruha sada u odnosu na

period prije 20-30 godina. Također se analiziralo postoji li razlika u viđanju *Aristolochia clematitis* (vučja stopa) i njenih sjemenki među sjemenkama namjenjenim za brašno u endemskim selima sada u odnosu na period prije 20-30 godina (Slika 4. i Slika 5.).

Pitanja iz upitnika čine logički slijed dokaza o potencijalnoj, nekadašnjoj izloženosti aristolohičnoj kiselini, a značajni povijesni događaji života seljaka (vodovod, mlin, komesacija, nasip) su korišteni kao vremenska okosnica tijekom ispitivanja o periodu prije 20-30 godina. Izloženost aristolohičnoj kiselini je definirana potvrdnim odgovorom na pitanje o viđanju *Aristolochiae clematitis* na poljima i viđanju sjemenki *Aristolochiae clematitis* među sjemenkama namjenjenim za brašno. S ciljem povećanja osjetljivosti i specifičnosti prisjećanja *Aristolochiae clematitis* (vučje stope), kao i nepristranosti u odgovorima, dizajnirano je pet fotografija u boji veličine A4 (20 x 25 cm) sa slikama korova i njihovih sjemenki koje je ispitanik prvo imenovao, a potom birao je li, koje i gdje od njih viđao. Osim *Aristolochia clematitis* (vučja stopa), ostali slikovno prikazani korovi su bili: *Ambrosia artemisiifolia* (ambrozija), *Agropyron repens* (pirika), *Echinochloa crus-galli* (koštan) i *Galium aparine* (sapiinjač).



Slika 4. *Aristolochia clematitis* (vučja stopa) među žitom



Slika 5. *Aristolochia clematitis* (vučja stopa) te prikaz i usporedba sjemenki *Aristolochia clematitis* (vučja stopa) i pšenice.

3.3.3. Laboratorijska analiza

U istraživanju su određeni laboratorijski pokazatelji potrebni za klasifikaciju stanovništva endemskih sela. Iz uzoraka krvi određen je hemoglobin i serumski kreatinin, a iz uzoraka jutarnjeg urina α 1mg, albumin i kreatinin.

Svakom ispitaniku je izvađeno 20 ml krvi natašte, od čega 10 ml u epruvetu s EDTA za određivanje crvene krvne slike, a 10 ml u epruvetu sa smolom za biokemiju.

Crvena krvna slika je analizirana metodom laserske tehnologije na uređajima Cell Dyn Sapphire i Sysmex XE 5000.

Serumski kreatinin je određen nakon razdvajanja plazme (centrifuga na 3500 okretaja kroz 10 minuta) kinetičkom Jaffe metodom s kontinuiranim mjerenjem koristeći uređaj Olympus AU 2700, reagens Beckman-Coulter. Vrijednost kreatinina u serumu je kalibrirana prema standardnom referentnom materijalu (Standard Reference Material – SRM), 909b, razina 2, Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (National Institute of Standards and Technology – NIST).

Iz jutarnjeg uzorka urina je lateks-imunonefelometrijski određen α 1mg i albumin na uređaju Behring Nephelometer Analyzer II, te kreatinin u urinu kinetičkom Jaffe metodom s alkalnim pikratom koristeći Beckman-Coulter reagens i uređaj Olympus AU 2700 i u skladu je s metodom Isotope Dilution Mass Spectroscopy.

Svi uzorci su analizirani u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

3.4. Statističke metode

Podaci su analizirani statističkim postupcima ispitivanja razlika i povezanosti pomoću statističkog paketa STATISTICA 12 (StatSoft. Inc. 2013). Kolmogorov Smirnovljev test je korišten za procjenu distribucije uzorka. Budući da kontinuirane varijable nisu imale normalnu raspodjelu, korišteni su neparametrijski testovi. Srednje vrijednosti kontinuiranih varijabli izražene su medijanom (C) i rasponom (25.-75. P.). Nominalne i ordinalne, odnosno kategorijske varijable prikazane su raspodjelom učestalosti po skupinama i postotkom za svaku pojedinu skupinu. Za utvrđivanje razlika u kontinuiranim varijablama između dva nezavisna uzorka upotrebljen je Mann-Whitneyjev U-test, a između više od dva nezavisna uzorka korišten je Kruskal-Wallis test za neparametrijsku raščlambu sa post hoc Mann-Whitneyev U-testom uz

korekciju za višestruko testiranje. Za utvrđivanje razlika u kategorijskim varijablama među proporcijama između dva nezavisna uzorka rađen je χ^2 -test uz χ^2 za post hoc raščlambu, te omjer šansi (OR, *engl. odds ratio*) s pripadnim 95% intervalom pouzdanosti (95%CI, *engl. 95% confidence interval*).

Analizom parova je ispitano postoje li promjene u agrikulturnoj praksi i promjene u domaćinstvima starosjedioca endemskih sela u usporedbi s onima prije 20-30 godina, za kontinuirane varijable korišten je t-test za parne uzorke; za ordinalne kategorijske varijable Stuart-Maxvellov test, a za nominalne varijable McNemarov test. Logistička regresija je korištena u procjeni prediktora oštećenja proksimalnog tubula. Kao nezavisne varijable su uključene prijašnja i sadašnja izloženosti aristolohičnoj kiselini, boravak u endemskom selu, pozitivna anamneza za EN u domaćinstvu, imigrantski status. U univarijatnu i multivarijatnu binarnu logističku regresiju prediktorskih varijabli za oštećenje proksimalnog tubula, kao zavisnu varijablu, uključeni su svi autohtoni ispitanici, te svi imigranti (N=2347). U multivarijatnom modelu učinjena je prilagodba za dob, spol, ITM, postojanje arterijske hipertenzije i dijabetesa, odnosno čimbenike koji bi mogli utjecati na postojanje oštećenja proksimalnog tubula. Značajnost prediktornih varijabli prikazana je OR i pripadajućim 95% CI za svaku nezavisnu varijablu i blobogramom. Usporedba različitih kriterija u klasificiranju stanovništva endemskih sela učinjena je računanjem koeficijenta podudaranja formulom (*engl. intraclass correlation coefficient*). Analiza trenda promjene broja incidentnih slučajeva i promjene u dobi bolesnika u NBF i operiranih od UUC od 1995. do 2012. godine je učinjena i grafički prikaza pomoću "Jointpoint" regresijskog programa, statističkog Windows programskog paketa. Statistička značajnost prihvaćena je uz $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Distribucija ispitanika prema klasifikaciji za EN

Distribucija svih ispitanika u endemskim i kontrolnim selima ovisno o statusu imigranta iz bosanskih ne–endemskih sela ili starosjedioca, a prema Brač konsenzus klasifikaciji za EN je prikazana u Tablici 8.

Iz distribucije ispitanika prema klasifikaciji za EN u kojoj su posebno gledani autohtoni stanovnici, a posebno imigranti endemskih i kontrolnih sela je vidljivo da bolesni u 93 % slučajeva proizlaze iz skupine autohtonih stanovnika EN sela, a u preostalih 7% se radi o imigrantima kojima je medijan boravka u EN selu bio 58,5 godina. Štoviše, nema ni jednog bolesnog među imigrantima koji su se doseljeli unatrag najviše 30 godina ili među stanovnicima kontrolnih sela, kako starosjedioca tako i imigranata.

Tablica 8. Distribucija ispitanika prema Brač kriterijima za klasificiranje stanovništva endemskih sela

Selo	Stanovnici	Duljina boravka u selu	Bolesni		Sumnjivi		Rizični		Ostali – nezahvaćeni		Ukupno (N)
EN	Autohtoni		N	%	N	%	N	%	N	%	
			30	1,8	119	7,1	553	32,8	985	58,4	1687
	Imigranti iz Bosne	<=15 godina	0	0	0	0	2	3,4	56	96,6	58
		>15<30 godina	0	0	1	1	2	2	99	97,1	102
		>30 godina	2	2,3	3	3,4	3	3,4	80	90,9	88
Kontrolna, ne-EN	Autohtoni		0	0	0	0	4	1,7	368	98,9	372
	Imigranti iz Bosne		0	0	0	0	1	2,5	39	97,5	40

Vrijednosti su prikazane kao N (%).

4.2. Demografski podaci i kliničke karakteristike ispitanika

Demografski podaci i kliničke karakteristike, distribucija u stadije KBB, te socijalni status ispitanika raspodjeljenih u skupine starosjedioci, odnosno autohtoni stanovnici EN sela, imigranti iz ne – endemskih sela Bosne koji su naseljeli endemska sela unatrag 15 do 30 godina i ispitanici kontrolnih, ne – endemskih sela su navedeni u Tablici 9, Tablici 10 i 13, a nakon raspodijele autohtonog stanovništva prema klasifikaciji za EN u Tablici 11, Tablici 12 i Tablici 14.

Nije bilo razlike u starosti između starosjedioca i imigranata (medijan 50, min-max 18-91 vs. medijan 52 min-max 20-86; $p>0,05$), dok su ispitanici kontrolnih sela bili stariji od starosjedioca endemskih sela (medijan 53 min-max 18-90 vs. medijan 50, min-max 18-91; $z=7,441$; $p=0,024$). Kada se autohtono staništvo endemskih sela podijelilo prema klasifikaciji za EN tada se uočava da su bolesni i sumnjivi stariji od svih drugih skupina ($z=151,524$; $p<0,001$), pa tako i dulje borave u endemskim selima ($z=262,325$; $p<0,001$), dok su ispitanici kontrolnih sela kraće živjeli u svom selu od ostalih iz endemskih sela. S obzirom na status doseljenika, odnosno činjenicu da nisu rođeni u endemskom selu imigranti su kraće boravili u sadašnjem mjestu prebivališta nego autohtoni ispitanici endemskih sela ili ispitanici kontrolnih sela ($p<0,001$) (**Tablica 9.**), i nakon podijele autohtonog stanovništva u podskupine ($p<0,001$) (**Tablica 11.**). Između starosjedioca s jedne strane, te imigranata endemskih sela i ispitanika kontrolnih sela s druge nije bilo značajne razlike u raspodjeli muškaraca i žena ($\chi^2=0,450$; $p=0,798$) (**Tablica 9.**). U podskupini sumnjivih je bilo više muškaraca u usporedbi s ostalim podskupinama ($\chi^2=20,669$; $p=0,001$), dok se ostale podskupine, uključujući i bolesne, nisu međusobno razlikovale u distribuciji muškaraca i žena (sve $p>0,05$) (**Tablica 11.**). Pozitivna obiteljska anamneza, tj. anamneza domaćinstva za EN je bila češća u autohtonog stanovništva endemskih sela nego u imigranata endemskih sela i ispitanika kontrolnih sela ($\chi^2=231,417$; $p<0,001$), pri čemu je 83 % bolesnih od EN i 100 % sumnjivih da boluju imalo pozitivnu obiteljsku anamnezu za EN, a ista je bila pozitivna u 4 ispitanika kontrolnih sela i 2 imigranta endemskih sela (**Tablica 11.**). Skupine imigranata, starosjedioca EN sela, te kontrolnih ispitanika se nisu razlikovale u tjelesnoj visini, tjelesnoj masi, ITM, visini sistoličkog ni dijastoličkog AT (sve $p>0,05$), kao ni u udjelu ispitanika s arterijskom hipertenzijom ($\chi^2=1,484$; $p=0,476$) i šećernom bolešću ($\chi^2=4,883$; $p=0,087$) (**Tablica 9.**). Unutar podskupina starosjedioca bolesni i sumnjivi su imali viši sistolički AT od ostalih i rizičnih iz endemskih sela i ispitanika kontrolnih sela ($p<0,001$), ali ne i od imigranata ($p>0,05$).

Ispitanici kontrolnih sela su imali viši sistolički AT od ostalih iz endemskih sela ($p < 0,05$) (**Tablica 11.**).

Stadiji KBB od 3a na više su češći u autohtonog stanovništva endemskih sela u odnosu na stanovnike ne – endemskih sela i imigrante endemskih sela (16,6% vs. 9,1% vs. 6,9%; $p < 0,014$) (**Tablica 10.**), a nije bilo razlike između stanovnika ne – endemskih sela i imigranata endemskih sela ($p = 0,994$). Bolesni su u najvećem postotku u 4. ili 5. om stadiju KBB, sumnjivi u 3a ili 3b stadiju KBB, dok se ispitanici skupina pod rizikom, ostali, kontrolni i imigranti jednako raspodjeljuju u stadije KBB kao i opća populacija, stanovništvo kontrolnih, ne – endemskih sela (**Tablica 12.**).

Nadalje, ispitanici su većinom bili niže stručne spreme s niskim do srednjim primanjima, dok su imigranti češće bili bez edukacije u odnosu na ispitanike endemskih i kontrolnih sela ($\chi^2 = 51,043$; $p < 0,001$), a najveći udio ispitanika kontrolnih sela su imali niske prihode ($\chi^2 = 31,277$; $p < 0,001$) (**Tablica 13.**). Budući da su i starijih dobni skupina, bolesni i sumnjivi su češće bili niže stručne spreme i niskih prihoda u odnosu na druge podskupine prema klasifikaciji za EN (sve $< 0,001$) (**Tablica 14.**).

Ispitanici kontrolnih sela su rjeđe bili pušači od imigranata i autohtonih ispitanika endemskih sela ($\chi^2 = 7,096$; $0,029$) (**Tablica 13.**). Kada se autohtono stanovništvo raspodijelilo prema klasifikaciju za EN nije bilo razlike u statusu pušača između svih skupina ($\chi^2 = 10,477$; $p = 0,063$) (**Tablica 14.**).

Tablica 9. Demografska i klinička obilježja starosjedioca endemskih i ne–endemskih sela, te imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

	Starosjedioci EN sela		Starosjedioci ne–EN sela		Imigranti EN sela unatrag 15 – 30 god		p
	N		N		N		
Dob (godine)	1687	50 (18-91)	372	53 (18-90) ^a	102	52 (20-86)	0,024
Spol (M)	687	40,5	152	40,6	91	37	0,798
Boravak u selu (godine)	1684	41 (24-55)	370	45 (26-60)	102	18 (15-21) ^{a,b}	<0,001
Pozitivna obiteljska anamneza za EN	697	41,3	4	1,1 ^a	2	2,0 ^a	<0,001
Tjelesna visina (cm)	1600	168 (161-175)	352	167 (160-175)	96	167 (160-174)	0,403
Tjelesna masa (kg)	1616	76 (66-88)	355	79 (68-89)	98	74 (64-87)	0,093
ITM (kg/m ²)	1598	26,87 (23,71-30,73)	351	27,66 (24,30-31,25)	96	26,59 (23,82-29,86)	0,073
Sistolički AT (mmHg)	1547	135,5 (120-154)	337	138 (123,5-159,5)	94	137 (126-155)	0,069
Dijastolički AT (mmHg)	1545	81,5 (75-90)	337	81 (75-92)	94	82,8 (76-90)	0,770
Arterijska hipertenzija	649	41,2	154	44,6	42	43,8	0,476
Šećerna bolest	102	6,1	34	9,2	8	7,9	0,087
KBB	280	16,6	34	9,2 ^a	7	6,9 ^a	0,014
UUC	8	0,47	0	0,0	0	0,0	

Vrijednosti prikazane kao N (%) za kategorijske varijable, te C (25.-75.P) za kontinuirane varijable, osim dob C (min - maks);

^a značajna razlika (p<0,05) sa skupinom starosjedioca EN sela, ^b značajna razlika (p<0,05) sa skupinom starosjedioca kontrolnih, ne–EN sela

ITM – indeks tjelesne mase; AT – arterijski tlak; KBB – kronična bubrežna bolest (stadij KBB>3a); UUC – karcinom gornjeg urotela

Tablica 10. Distribucija stadija kronične bubrežne bolesti između starosjedioca endemskih i ne–endemskih sela, te imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

		Starosjedioci EN sela	Starosjedioci kontrolnih, ne–EN sela	Imigranti iz Bosne 15-30 godina u EN selu
Stadiji KBB	1	22 (1,3)	7 (1,9)	1 (1,0)
	2	71 (4,3)	22 (6,0)	5 (5,0)
	3a	159 (9,5)	28 (7,6)	5 (5,0)
	3b	78 (4,7)	5 (1,4)	1 (1,0)
	4	23 (1,4)	0 (0,0)	1 (1,0)
	5	20 (1,2)	1 (0,3)	0 (0,0)
	Ukupno	373 (22,4)	63 (17,2)	13 (13)

Vrijednosti prikazane kao N (%); značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina napisane u tekstu rezultata

Tablica 11. Demografska i klinička obilježja starosjedioca endemskih sela podjeljenih u podskupine prema klasifikaciji EN, te ispitanika ne-endemskih sela i imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

	Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali	Kontrolna sela	Imigranti EN sela	p
Dob (godine)	30 73 (60-83)	119 70 (21-88)	553 49 (19-90)	985 48 (18-91)	372 53 (18-90)	102 52 (20-86)	<0,001
Spol (M)	13 (43,3)	71 (59,7)	220 (39,8)	378 (38,4)	152 (40,6)	38 (37,3)	0,001
Boravak u selu (godine)	30 72,5 (59-79)	119 60 (46-74)	553 41 (26-53)	982 39 (21-54)	370 45 (26-60)	102 18 (15-21)	<0,001
Pozitivna obiteljska anamneza za EN	25 (83,3)	119 (100)	553 (100)	0 (0)	4 (1,1)	2 (2)	<0,001
Tjelesna visina (cm)	26 164 (155-172)	112 166 (160-177)	537 168 (162-176)	925 168 (161-175)	352 167 (160-175)	96 167 (160-174)	0,065
Tjelesna masa (kg)	27 72 (60-80)	112 75 (64-85)	542 78 (68-90)	935 76 (65-88)	355 79 (68-89)	98 74 (64-87)	0,030
ITM (kg/m ²)	26 26,44 (23,37-31,23)	112 26,38 (23,61-29,40)	537 26,93 (23,83-30,96)	923 26,88 (23,68-30,67)	351 27,66 (24,30-31,25)	96 26,59 (23,82-29,86)	0,172
Sistolički AT (mmHg)	29 155 (142-180)	117 150 (135-165,5)	520 135 (120-154,8)	881 132,5 (120-150)	337 138 (123,5-159,5)	94 137 (126-155)	<0,001
Dijastolički AT (mmHg)	29 80 (70-90)	117 82,5 (76,5-91,5)	519 83 (75-91)	880 80,5 (74,5-90)	337 81 (75-92)	94 82,8 (76-90)	0,221
Arterijska hipertenzija	22 (73,3)	69 (59)	212 (40,3)	346 (38,4)	154 (44,6)	42 (43,8)	<0,001
Šećerna bolest	2 (6,7)	9 (7,6)	25 (4,5)	66 (6,8)	34 (9,2)	8 (7,9)	0,148
KBB	29 (96,7)	70 (59,8)	55 (9,9)	126 (12,8)	34 (9,2)	7 (6,9)	<0,001

N (%) za kategorijske varijable, C (25.-75.P) za kontinuirane varijable, osim dob C (min - maks);

značajne razlike (p<0,05) između skupina napisane u tekstu rezultata

ITM – indeks tjelesne mase; AT – arterijski tlak; KBB – kronična bubrežna bolest

Tablica 12. Distribucija stadija kronične bubrežne bolesti između starosjedioca endemskih sela podjeljenih u podskupine prema klasifikaciji EN, te ispitanika ne–endemskih sela i imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

		Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali	Kontrolna sela	Imigranti EN sela 15-30 godina
Stadiji KBB	1	0 (0)	0 (0)	5 (0,90)	17 (1,73)	7 (1,88)	1 (0,98)
	2	0 (0)	1 (0,84)	32 (5,79)	38 (3,56)	22 (5,91)	5 (4,90)
	3a	4 (13,33)	26 (21,85)	42 (7,59)	87 (8,83)	28 (7,53)	5 (4,90)
	3b	4 (13,33)	25 (21,01)	13 (2,35)	36 (3,65)	5 (1,34)	1 (0,98)
	4	5 (16,67)	15 (12,61)	0 (0)	3 (0,30)	0 (0)	1 (0,98)
	5	16 (53,33)	4 (3,36)	0 (0)	0 (0)	1 (0,27)	0 (0)
	Ukupno	29 (96,66)	71 (59,67)	92 (16,63)	181 (18,07)	63 (16,93)	13 (12,74)

Vrijednosti prikazane kao N (%); značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina napisane u tekstu rezultata.

Tablica 13. Socijalni status, edukacija i navike starosjedioca endemskih i ne–endemskih sela, te imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

		Starosjedioci EN sela	Starosjedioci ne–EN sela	Imigranti EN sela unatrag 15 – 30 god	p
Edukacija	bez edukacije	17 (1,2)	7 (2,5)	10 (12,2) ^{a,b}	<0,001
	NSS	826 (60,7)	162 (58,7)	39 (47,6)	
	SSS	455 (33,4)	90 (32,6)	28 (34,1)	
	VSS	63 (4,6)	17 (6,2)	5 (6,1)	
Socijalni status – primanja	<1500 kn	526 (45) ^b	140 (59,3)	34 (49,3) ^b	<0,001
	1500 - 3000 kn	613 (52,5)	81 (34,3)	32 (46,4)	
	>5000 kn	29 (2,5)	15 (6,4)	3 (4,3)	
Pušenje	da	358 (25,8) ^b	52 (18,4)	22 (26,8) ^b	0,026

Vrijednosti prikazane kao N (%); ^a značajna razlika ($p < 0,05$) sa skupinom starosjedioca EN sela, ^b značajna razlika ($p < 0,05$) sa skupinom starosjedioca kontrolnih, ne–EN sela

Tablica 14. Socijalni status, edukacija i navike starosjedioca endemskih sela raspodjeljenih u podskupine prema klasifikaciji EN, te ispitanika ne-endemskih sela i imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

		Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali	Kontrolna sela	Imigranti EN sela 15-30 g	p
Edukacija	bez edukacije	1 (4,3)	1 (0,9)	3 (0,7)	12 (1,6)	7 (2,5)	10 (12,2)	<0,001
	NSS	21 (91,3)	87 (80,6)	263 (57,4)	455 (58,9)	162 (58,7)	39 (47,6)	
	SSS	0 (0)	19 (17,6)	164 (35,8)	272 (35,2)	90 (32,6)	28 (34,1)	
	VSS	1 (4,3)	1 (0,9)	28 (6,1)	33 (4,3)	17 (6,2)	5 (6,1)	
Socijalni status - primanja	<1500 kn	16 (72,7)	63 (63)	162 (41,5)	285 (43,4)	140 (59,3)	34 (49,3)	<0,001
	1500 - 3000 kn	6 (27,3)	33 (33)	218 (55,9)	356 (54,3)	81 (34,3)	32 (46,4)	
	>5000 kn	0 (0)	4 (4)	10 (2,6)	15 (2,3)	15 (6,4)	3 (4,3)	
Pušenje	Da	3 (12,5)	24 (22)	122 (26,5)	209 (26,4)	52 (18,4)	22 (26,8)	0,063

Vrijednosti prikazane kao N (%); značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina napisane u tekstu rezultata

4.3. Laboratorijski parametri bubrežne funkcije i ultrazvučni nalaz starosjedioca endemskog, ne–endemskog stanovništva i imigranata

Obilježja bubrežne funkcije, laboratorijski parametri te ultrazvučno određena duljina bubrega prikazani su u Tablici 15 i prema podskupinama u Tablici 17, a učestalost oštećenja bubrežne funkcije u Tablici 16 i prema podskupinama za klasifikaciju stanovništva endemskih sela u Tablici 18.

Imigranti koji su naselili endemska sela unatrag 15 do 30 godina se nisu razlikovali u vrijednostima markera oštećenja proksimalnog tubula ($\alpha 1\text{mg}$ i $\alpha 1\text{mCR}$) od autohtonih ispitanika ili ispitanika kontrolnih sela (sve $p > 0,05$), pri čemu su ispitanici kontrolnih sela imali više vrijednosti $\alpha 1\text{mg}$ i $\alpha 1\text{mCR}$ od ispitanika endemskih sela ($p = 0,005$ i $p < 0,001$) (**Tablica 15., Slika 6.**). Nakon klasifikacije endemskog autohtonog stanovništva sukladno klasifikaciji i zahvaćenosti bolešću, bolesni i sumnjivi su imali više vrijednosti biljega oštećenja proksimalnog tubula od svih promatranih skupina ($p < 0,001$). Međutim, imigranti se nisu razlikovali u vrijednostima $\alpha 1\text{mg}$ od rizičnih, ostalih i ispitanika ne–endemskih sela (sve $p > 0,05$), kao ni u vrijednostima $\alpha 1\text{mCR}$ od ostalih i ispitanika kontrolnih sela (sve $p > 0,05$) (**Tablica 17., Slika 9.**). Nadalje, oštećenje proksimalnog tubula iznad granične vrijednosti za EN je bilo češće u starosjedioca endemskih sela nego u imigranata i ispitanika kontrolnih, ne–endemskih sela ($\chi^2 = 9,934$; $p = 0,007$), pri čemu imigranti, iako žive dugi niz godina u endemskim selima, imaju jednako očuvanu funkciju proksimalnog tubula kao i opća populacija, tj. ispitanici kontrolnih, ne–endemskih sela (2% vs. 2,7%, $\chi^2 = 0,172$; $p = 0,953$) (**Tablica 16.**). Štoviše, učestalost oštećenja proksimalnog tubula u imigranata endemskih sela se ne razlikuje od one u podskupini rizičnih ($\chi^2 = 2,287$; $p = 0,372$) i ostalih ($\chi^2 = 0,115$; $p = 0,734$), tj. bolešću nezahvaćenih stanovnika endemskih sela (**Tablica 18.**).

Starosjedioci endemskih sela su imali višu albuminuriju od imigranata ($p = 0,013$), što je anulirano korekcijom prema kreatininu u urinu, te nije bilo razlike u ACR između starosjedioca endemskih, ne–endemskih sela te imigranata endemskih sela ($p = 0,101$) (**Tablica 15., Slika 7.**). Većoj albuminuriji su pridonjeli rezultati bolesnih i sumnjivih ($p < 0,001$) (**Tablica 17., Slika 10.**). U skladu s navedenim, cijela skupina starosjedioca se nije razlikovala u prevalenciji albuminurije ($\text{ACR} > 30 \text{ mg/g}$) od imigranata endemskih sela i ispitanika kontrolnih sela ($\chi^2 = 2,836$; $p = 0,242$) (**Tablica 16.**), dok su u podskupinama, bolesni i sumnjivi imali značajno češće albuminuriju ($\text{ACR} > 30 \text{ mg/g}$) od rizičnih (bolesni $\chi^2 = 75,946$; $p < 0,001$, sumnjivi $\chi^2 = 28,897$;

$p < 0,001$), ostalih (bolesni $\chi^2 = 82,227$; $p < 0,001$, sumnjivi $\chi^2 = 32,685$; $p < 0,001$), ispitanika kontrolnih sela (bolesni $\chi^2 = 50,836$; $p < 0,001$, sumnjivi $\chi^2 = 14,390$; $p < 0,001$) i imigranata (bolesni $\chi^2 = 46,737$; $p < 0,001$, sumnjivi $\chi^2 = 16,135$; $p < 0,001$), a između njih (rizičnih, ostalih, ispitanika kontrolnih sela i imigranata) nije bilo razlike u prevalenciji albuminurije (sve $p > 0,05$) (**Tablica 18.**).

Imigranti su imali niže vrijednosti kreatinina u serumu ($p < 0,001$), te višu eGFR ($p = 0,003$) od starosjedioca endemskih i ne- endemskih sela (Slika 8.), između potonjih su starosjedioci endemskih sela imali više vrijednosti kreatinina u odnosu na starosjedioce ne – endemskih sela. Snižena glomerularna filtracija ($eGFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) je bila češća u starosjedioca endemskih sela nego u imigranata i starosjedioca ne – endemskih sela ($\chi^2 = 11,178$; $p = 0,001$), između kojih nije bilo razlike ($\chi^2 = 0,947$; $p = 0,331$) (**Tablica 15.**). Imigranti su imali najmanje vrijednosti kreatinina i najvišu eGFR i nakon klasificiranja stanovništva u podskupine. U skupini starosjedioca bolesni i sumnjivi su imali značajno veće vrijednosti kreatinina i nižu eGFR od svih ostalih podskupina (Slika 11.), te je kod njih češće prisutna snižena glomerularna filtracija u odnosu na ostale ispitanike endemskih i ne–endemskih sela, te imigrante ($\chi^2 = 369,594$; $p < 0,001$). Važno je istaknuti da nema razlike u učestalosti snižene glomerularne filtracije između imigranata s jedne strane i nezahvaćenog stanovništva endemskih sela: rizičnih ($\chi^2 = 0,999$; $p = 0,319$) i ostalih ($\chi^2 = 3,490$; $p = 0,062$) i ispitanika kontrolnih sela ($\chi^2 = 0,947$; $p = 0,331$) s druge strane (**Tablica 17.**).

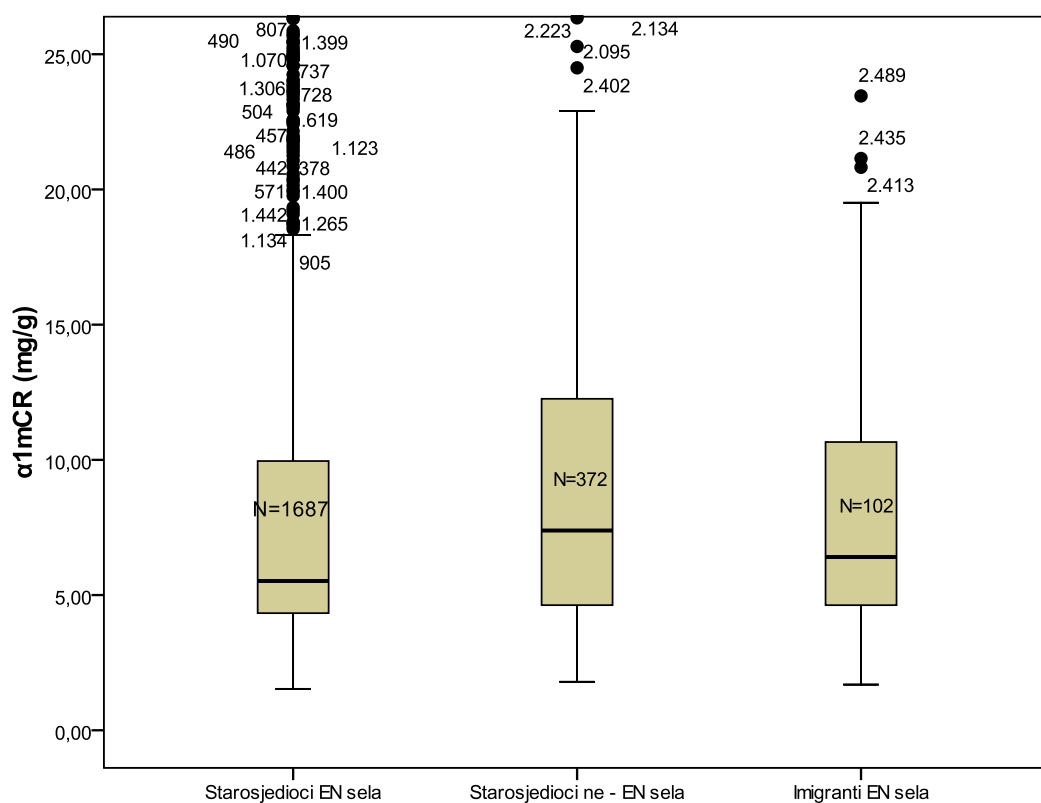
Starosjedioci endemskih sela su imali kraću duljinu bubrega od ispitanika kontrolnih sela ($p < 0,001$). Nije bilo razlike u duljini bubrega između imigranata endemskih sela i ispitanika kontrolnih sela (**Tablica 15.**). Bolesni i sumnjivi iz skupine starosjedioca su imali kraće bubrege od svih ostalih podskupina, dok se ispitanici kontrolnih sela nisu razlikovali od imigranata ($p > 0,05$), a imali su dulje bubrege od rizičnih i ostalih ispitanika endemskih sela (sve $p < 0,001$) (**Tablica 17.**).

Nadalje, nije bilo razlike između starosjedioca endemskih i ne – endemskih sela, te imigranta u specifičnoj težini urina ($p = 0,219$) ili koncentraciji hemoglobina ($p = 0,128$) (**Tablica 15.**). Po učinjenoj klasifikaciji endemskog stanovništva, dolazi do izražaja činjenica da bolesni i sumnjivi imaju nižu specifičnu težinu urina od svih ostalih podskupina ($p < 0,001$), te da bolesni imaju niže vrijednosti hemoglobina od svih ostalih podskupina ($p < 0,001$), dok sumnjivi da boluju nisu anemični (**Tablica 17.**). Ispitanici kontrolnih, ne – endemskih sela su imali više vrijednosti glukoze u serumu ($p = 0,001$) (**Tablica 15.**), iako bez kliničke značajnosti jer su one bile u referentnim vrijednostima, što potvrđuje činjenica da nije bilo razlike između skupina u učestalosti šećerne bolesti ($\chi^2 = 4,883$; $p = 0,087$) (**Tablica 9.**).

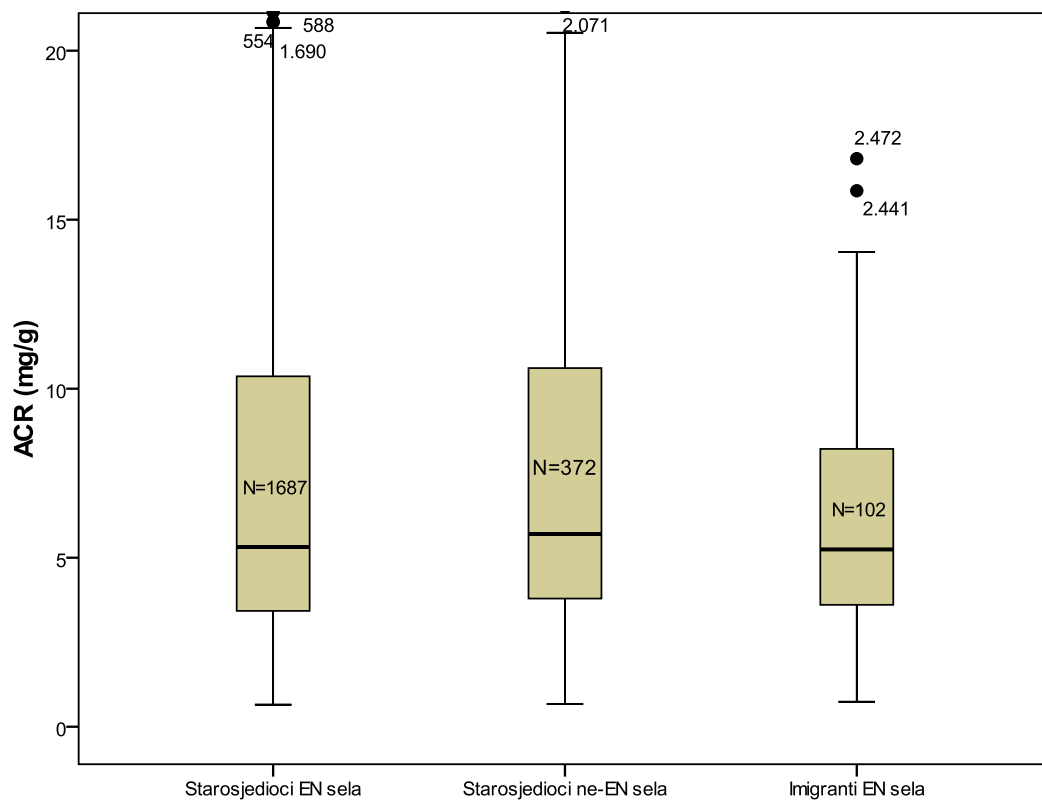
Tablica 15. Laboratorijski parametri bubrežne funkcije I ultrazvučni nalaz endemskih i ne–endemskih sela, te imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

Parametri	Starosjedioci EN sela		Starosjedioci ne–EN sela		Imigranti EN sela unatrag 15 – 30 god		p
	N		N		N		
α 1mg (mg/L)	1671	5,33 (5,18-9,54)	367	5,96 (5,18-11,00) ^a	102	5,69 (5,18-8,60)	0,005
α 1mCR (mg/g)	1671	5,52 (4,33-9,96)	367	7,39 (4,63-12,29) ^a	102	6,42 (4,60-10,72)	<0,001
Albumin (mg/L)	1667	6,40 (3,81-12,1)	362	6,04 (3,57-11,40)	102	5,20 (2,56-8,99) ^a	0,013
ACR (mg/g)	1667	5,31 (3,44-10,39)	362	5,70 (3,77-10,62)	102	5,22 (3,59-8,29)	0,101
Kreatinin serum (μ mol/L)	1682	83 (74-95)	370	80 (72-92) ^a	102	75 (68,8-85,3) ^{a,b}	<0,001
eGFR – CKD epi (ml/min/1,73m ²)	1682	80 (67-94)	370	81 (70-92)	102	88 (73-100) ^{a,b}	0,003
Glukoza (mmol/L)	1125	5,2 (4,8-5,7)	324	5,3 (4,8-5,9)	64	5,2 (4,7-6)	0,039
Hemoglobin (g/L)	1670	137 (129-147)	369	140 (130-148)	102	138 (130-147)	0,128
Specifična težina urina	1123	1,015 (1,010-1,021)	332	1,015 (1,010-1,020)	66	1,016 (1,011-1,022)	0,219
Duljina lijevog bubrega (mm)	1053	109 (100-117)	267	113 (108-119) ^a	68	112 (103-120)	<0,001
Duljina desnog bubrega (mm)	1050	109 (101-117)	263	114 (106-120) ^a	68	114 (102-118)	<0,001

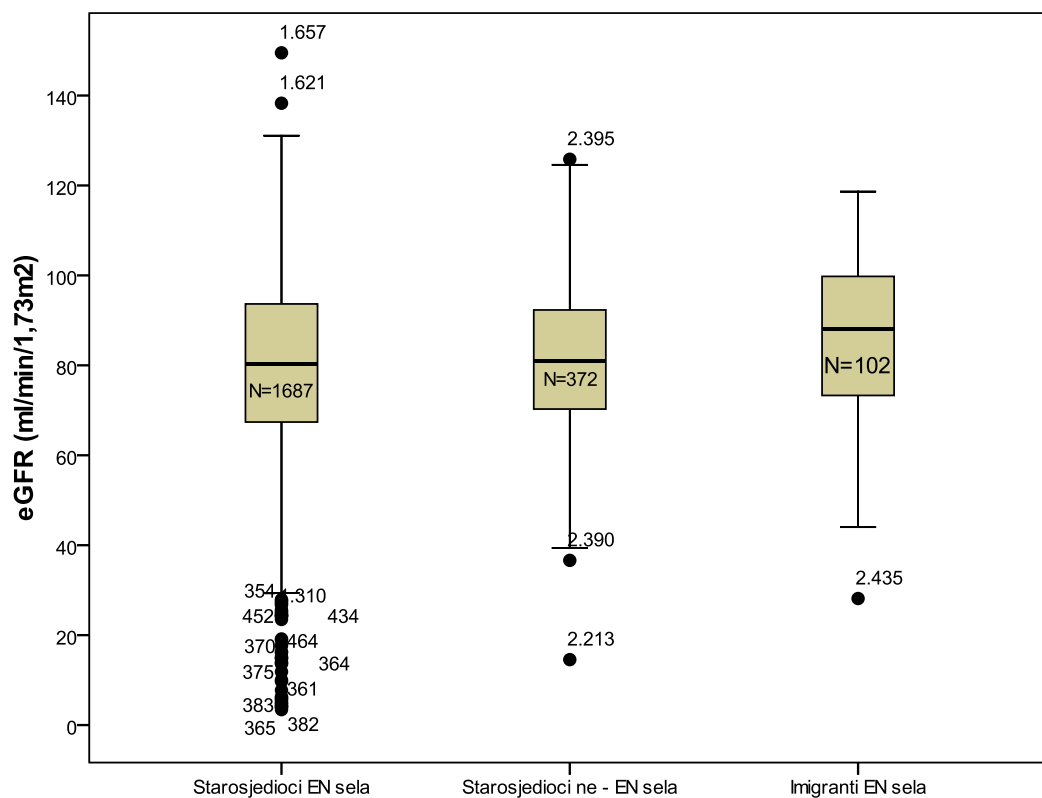
Vrijednosti prikazane kao C (25.-75.P); ^a značajna razlika (p<0,05) sa skupinom starosjedioca EN sela, ^b značajna razlika (p<0,05) sa skupinom starosjedioca kontrolnih, ne–EN sela
 α 1mg – alfa1mikroglobulin u mokraći; α 1mCR – omjer alfa1mikroglobulina po gramu kreatinina u mokraći; ACR - omjer albumina po gramu kreatinina u mokraci; eGFR - procijenjena glomerularna filtracija; CKD – EPI - *engl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*



Slika 6. $\alpha 1\text{mCR}$ starosjedioca endemskih i ne–endemskih sela, te promatrane skupine imigranata endemskih sela



Slika 7. ACR starosjedioca endemskih i ne-endemskih sela, te promatrane skupine imigranata endemskih sela



Slika 8. eGFR starosjedioca endemskih i ne-endemskih sela, te promatrane skupine imigranata endemskih sela

Tablica 16. Učestalost oštećenja bubrežne funkcije u starosjedioca endemskih i ne–endemskih sela, te imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

	Starosjedioci EN sela	Starosjedioci ne–EN sela	Imigranti EN sela unatrag 15 – 30 god	p
$\alpha 1\text{mCR} > 31,5\text{mg/g}$	105 (6,2)	10 (2,7) ^a	2 (2,0) ^a	0,007
ACR > 30mg/g	202 (12,0)	48 (12,9)	7 (6,9)	0,242
eGFR < 60ml/min/1,73m ²	280 (16,9)	34 (9,2) ^a	6 (6,9) ^a	<0,001

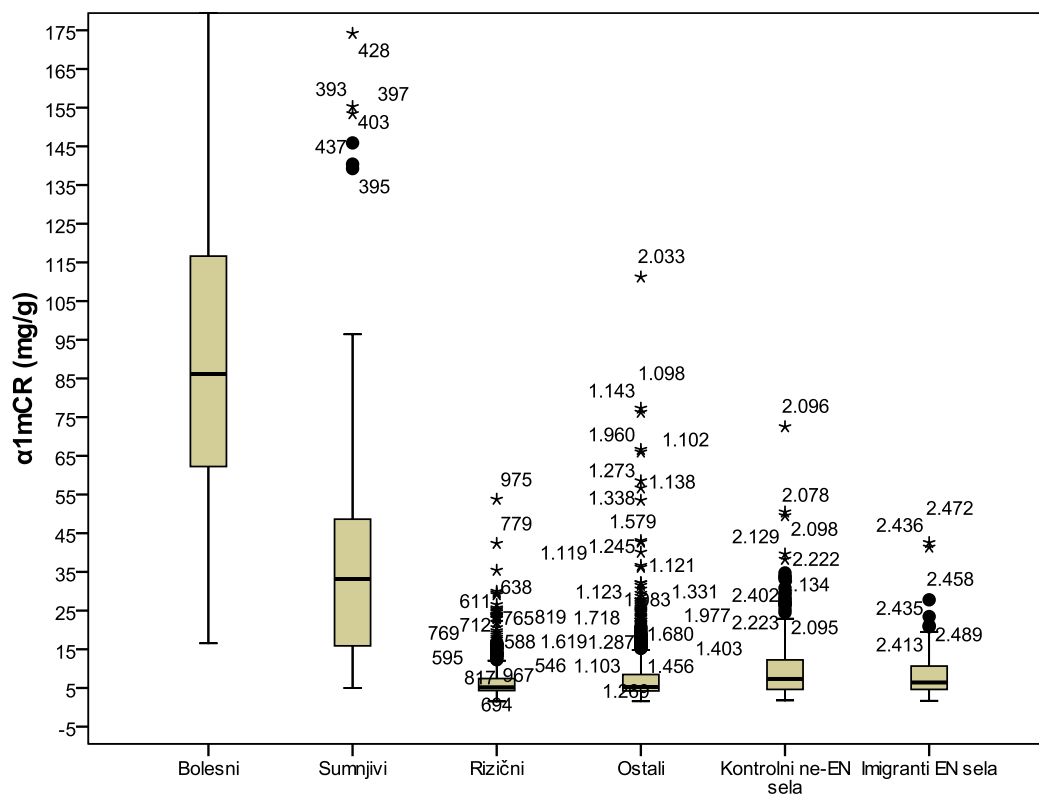
Vrijednosti prikazane kao N (%); ^a značajna razlika ($p < 0,05$) sa skupinom starosjedioca EN sela, ^b

značajna razlika ($p < 0,05$) sa skupinom starosjedioca kontrolnih, ne–EN sela

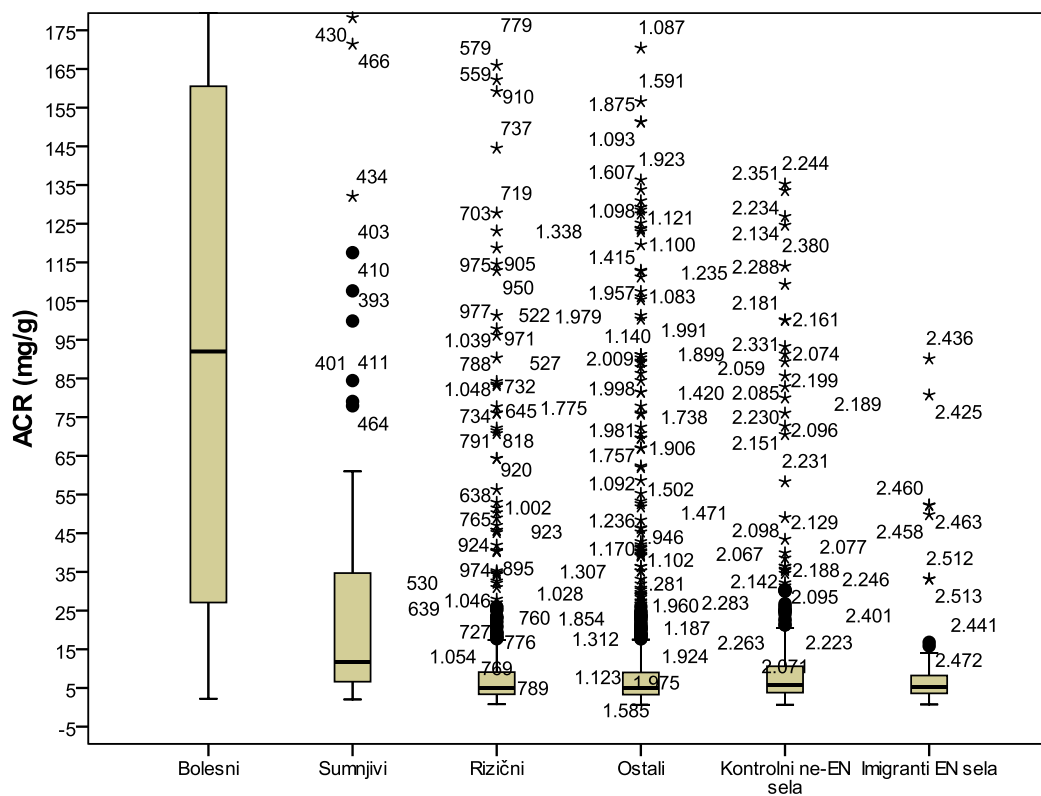
Tablica 17. Laboratorijski parametri bubrežne funkcije i ultrazvučni nalaz starosjedioca endemskih sela raspodjeljenih u podskupine prema klasifikaciji EN, te ispitanika ne-endemskih sela i imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

Parametri	Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali	Kontrolna sela	Imigranti EN sela 15 - 30 god
	N C (25-75P)	N C (25-75P)	N C (25-75P)	N C (25-75P)	N C (25-75P)	N C (25-75P)
α1mg (mg/L)	29 55,40 (34,6-105,0)	118 29,05 (18,50-44,10)	549 5,18 (5,18-7,49)	975 5,18 (5,18-8,00)	367 5,96 (5,18-11,00)	102 5,69 (5,18-8,57)
α1mCR (mg/g)	29 86,21 (55,24-141,40)	116 32,62 (15,82-48,68)	547 5,15 (4,33-7,44)	971 5,20 (4,22-8,48)	360 7,39 (4,68-12,2)	102 6,42 (4,60-10,72)
Albumin (mg/L)	29 41,90 (20,2-105,0)	117 11,80 (6,85-29,90)	547 6,03 (3,91-10,80)	974 6,01 (3,47-10,9)	362 6,04 (3,57-11,40)	102 5,20 (2,62-8,97)
ACR (mg/g)	29 91,97 (25,67-170,6)	116 11,46 (6,62-34,44)	547 4,99 (3,37-9,10)	971 4,94 (3,28-8,99)	360 5,67 (3,75-10,60)	102 5,24 (3,59-8,29)
Kreatinin serum (μmol/L)	30 272 (135-730)	117 108 (88-141)	553 82 (74-92)	982 82 (73-94)	370 80 (72-92)	102 75 (69-85)
eGFR – CKD epi(ml/min/1,73m ²)	30 14 (6-34)	117 55 (36-77)	553 81 (70-94)	982 82 (70-95)	370 81 (70-92)	102 88 (73-100)
Glukoza (mmol/L)	19 5,5 (5,1-6,1)	53 5,4 (4,9-5,8)	360 5,1 (4,7-5,5)	693 5,2 (4,8-5,7)	324 5,3 (4,8-5,9)	64 5,2 (4,8-6,0)
Hemoglobin (g/L)	30 102 (85-110)	119 136 (120-150)	549 137 (130-146)	972 138 (129-148)	369 140 (130-148)	102 138 (130-147)
Specifična težina urina	20 1,005 (1,004-1,007)	55 1,009 (1,006-1,013)	358 1,016 (1,011-1,022)	690 1,015 (1,010-1,022)	332 1,015 (1,010-1,020)	66 1,016 (1,011-1,022)
Duljina lijevog bubrega (mm)	14 85 (78-98)	57 101 (91-108)	361 109 (102-117)	621 110 (101-118)	267 113 (108-119)	68 112 (103-119)
Duljina desnog bubrega (mm)	13 84 (69-105)	58 100 (93-107)	358 110 (102-117)	621 109 (102-117)	263 114 (106-120)	68 114 (102-118)

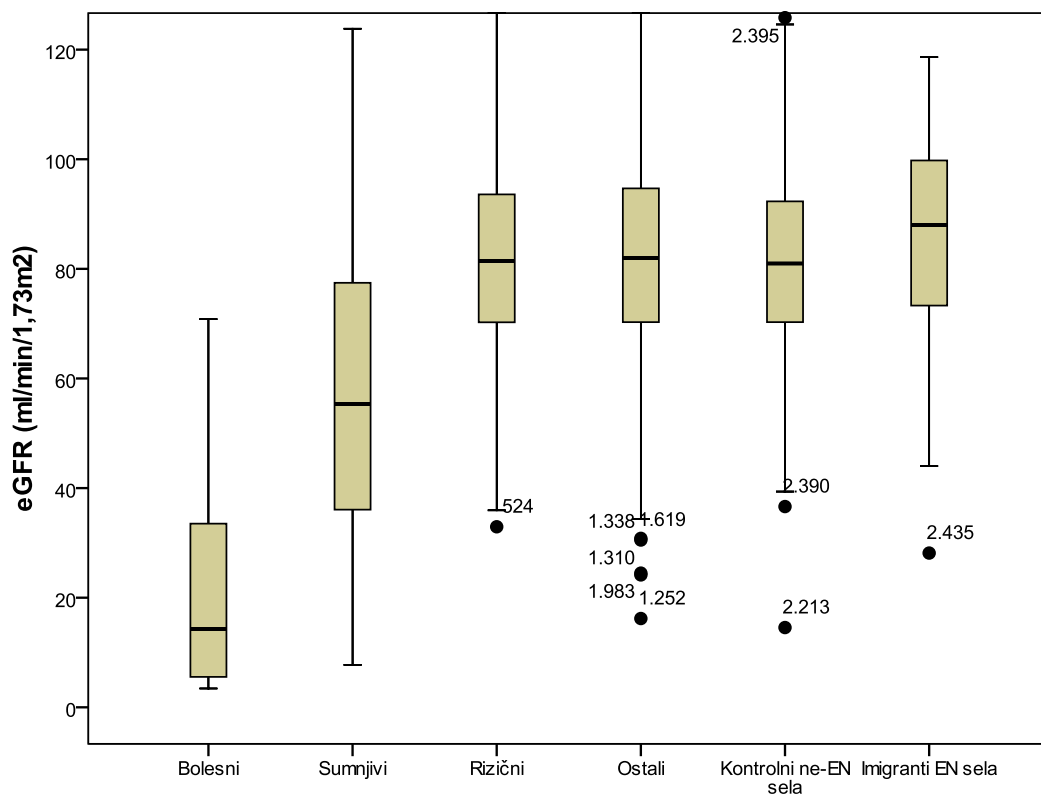
Vrijednosti prikazane kao N (%); Značajne razlike (p<0,05) između skupina napisane u tekstu rezultata
α1mg – alfa1mikroglobulin u mokraći; α1mCR – omjer alfa1mikroglobulina po gramu kreatinina u mokraći; ACR - omjer albumina po gramu kreatinina u mokraci; eGFR - procijenjena glomerularna filtracija; CKD – EPI - *engl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*



Slika 9. $\alpha 1\text{mCR}$ starosjedioca endemskih sela razvrstanih u podskupine prema Brač kriterijima za klasifikaciju EN, imigranata endemskih sela i starosjedioca kontrolnih, ne-endemskih sela



Slika 10. ACR starosjedioca endemskih sela razvrstanih u podskupine prema Brač kriterijima za klasifikaciju EN, imigranata endemskih sela i starosjedioca kontrolnih, ne-endemskih sela



Slika 11. eGFR starosjedioca endemskih sela razvrstanih u podskupine prema Brač kriterijima za klasifikaciju EN, imigranata endemskih sela i starosjedioca kontrolnih, ne-endemskih sela

Tablica 18. Učestalost oštećenja bubrežne funkcije u starosjedioca endemskih sela raspodjeljenih u podskupine prema klasifikaciji EN, te ispitanika ne-endemskih i imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

	Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali	Kontrolna sela	Imigranti EN sela 15-30 g
$\alpha 1\text{mCR} > 31,5\text{mg/g}$	26 (86,7)	61 (51,3)	3 (0,5)	15 (1,5)	10 (2,7)	2 (2,0)
ACR > 30mg/g	19 (63,39)	33 (27,7)	53 (9,6)	97 (9,8)	48 (12,9)	7 (6,9)
eGFR < 60 ml/min/1,73m ²	29 (96,7)	70 (59,8)	55 (9,9)	126 (12,8)	34 (9,2)	7 (6,9)

Vrijednosti prikazane kao N (%); značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina napisane u tekstu rezultata
 $\alpha 1\text{mCR}$ – omjer alfa1mikroglobulina po gramu kreatinina u mokraći; ACR - omjer albumina po gramu kreatinina u mokraci; eGFR - procijenjena glomerularna filtracija

4.4. Usporedba demografskih, kliničkih i laboratorijskih pokazatelja bubrežne funkcije između promatrane skupine imigranata endemskih sela i imigranata ne–endemskih sela

Evaluacija izloženosti vanjskom etiološkom čimbeniku je dodatno učinjena tako što je uspoređena skupina imigranata koja je unatrag 15–30 godina naseljeli endemska sela sa skupinom imigranata koja su naseljeli kontrolna, ne–endemska sela.

Demografske i kliničke osobine su prikazane u Tablici 19, socijalni status i navike u Tablici 20. Laboratorijski parametri bubrežne funkcije u prikazani u Tablici 21, te udio onih s oštećenjem bubrežne funkcije u Tablici 22.

Nije bilo razlike u dobi ($p=0,549$), ni u duljini boravka u novom mjestu prebivališta ($p=0,958$) između onih koji su naseljeli endemska sela unatrag 30 do 15 godina i imigranata ne – endemska sela. S obzirom na mali broj ispitanika s pozitivnim odgovorom za varijable pozitivne obiteljske, to jest, anamneze domaćinstva za EN, te za udio imigranata s AH i DM statistička analiza nije rađena, ali je značajno da je bio usporediv broj imigranata s pozitivnom obiteljskom, tj. anamnezom domaćinstva za EN u endemskim i ne – endemskim selima, kao i onih s AH i DM. Skupina imigranata endemskih sela se nije razlikovala u tjelesnoj visini, tjelesnoj masi, ITM, visini sistoličkog AT (sve $p>0,05$) od skupine imigranata kontrolnih, ne – endemskih sela. Imigranti kontrolnih, ne – endemskih sela su imali niži dijastolički AT ($p=0,015$). Imigranti endemskih i ne–endemskih sela se nisu razlikovali u prevalenciji KBB (6,9% vs. 7,5%) (**Tablica 19.**).

Nadalje, nije bilo razlike u stupnju edukacije ($\chi^2=0,993$; $p=0,803$), razini prihoda ($\chi^2=0,158$; $p=0,924$) ili statusu pušenja ($\chi^2=0,499$; $p=0,480$) između imigranata endemskih i kontrolnih sela (**Tablica 20.**).

Imigranti endemskih sela su imali veću koncentraciju $\alpha 1\text{mg}$ ($p=0,036$), ali po učinjenoj korekciji prema kreatininu u urinu nije bilo razlike u $\alpha 1\text{mCR}$ između skupina ($p=0,740$) što ponovno ukazuje na važnost korekcije proteinurije bilo koje vrste prema kreatininu. Imigranti endemskih sela se nisu razlikovali od imigranata kontrolnih sela u vrijednostima albumina u urinu ($p=0,623$), ACR ($p=0,484$), te vrijednosti kreatinina u serumu ($p=0,847$) i eGFR ($p=0,765$). Imigranti kontrolnih sela su imali nižu specifičnu težinu urina ($p=0,018$). Nije bilo razlike u duljini bubrega između imigranata endemskih i ne – endemskih sela (**Tablica 21.**).

Zaključno, imigranti endemskih sela imaju jednako očuvanu bubrežnu funkciju, uključujući i očuvanu funkciju proksimalnog tubula, kao i imigranti kontrolnih, ne – endemskih sela, gdje nema EN. Također, bila je usporediva učestalost tubularne

proteinurije, albuminurije i snižene eGFR između imigranata endemskih i kontrolnih sela (**Tablica 22.**).

Tablica 19. Demografska i klinička obilježja između imigranata endemskih sela unatrag 30 do 15 godina i imigranata ne–endemskih sela

Parametri	Imigranti EN sela 15-30 godina		Imigranti kontrolna, ne - EN sela		p
	N		N		
Dob (godine)	102	52 (20-86)	40	56 (20-93)	0,549
Spol (M)	38	37,30	11	27,5	0,271
Boravak u selu (godine)	102	18 (15-21)	40	17 (12-38)	0,958
Pozitivna obiteljska anamneza za EN	2	2,0	1	2,5	/
Tjelesna visina (cm)	96	167 (160-174)	38	166 (163-172)	0,757
Tjelesna masa (kg)	98	74 (64-87)	37	78 (65-88)	0,564
ITM (kg/m ²)	96	26,59 (23,81-29,91)	37	27,64 (23,88-30,48)	0,628
Sistolički AT (mmHg)	94	137 (126-156)	39	138 (118-157)	0,448
Dijastolički AT (mmHg)	94	82,8 (76-90)	39	78 (72-85)	0,015
Arterijska hipertenzija (N %)	42	43,8	15	38,5	0,573
Šećerna bolest GUK>7 (N %)	8	7,9	5	12,5	/
KBB	7	6,9	3	7,5	/

Vrijednosti prikazane kao N (%) za kategorijske varijable, te C (25.-75.P) za kontinuirane varijable, osim dob C (min - maks). / mali broj ispitanika s pozitivnim odgovorom – nepodobno za statističku analizu
ITM – indeks tjelesne mase; AT – arterijski tlak; KBB – kronična bubrežna bolest

Tablica 20. Socijalni status, edukacija i navike između imigranata endemskih sela unatrag 30 do 15 godina i imigranata ne-endemskih sela

		Imigranti EN sela 15-30 godina	Imigranti kontrolna, ne-EN sela
Edukacija	Bez edukacije	10 (12,2)	6 (17,6)
	NSS	39 (47,6)	17 (50,0)
	SSS	28 (34,1)	9 (26,5)
	VSS	5 (6,1)	2 (5,9)
Socijalni status (primanja)	<1500 kn	34 (49,3)	14 (53,8)
	1500 – 3000 kn	32 (46,4)	11 (42,3)
	>5000 kn	3 (4,3)	1 (3,8)
Pušenje	Da	22 (26,8)	7 (20,6)

Vrijednosti prikazane kao N (%).

Tablica 21. Laboratorijski i ultrazvučni parametri bubrežne funkcije između imigranata endemskih sela unatrag 30 do 15 godina i imigranata ne–endemskih sela

Parametri	Imigranti EN sela 15-30 godina		Imigranti kontrolna, ne-EN sela		p
	N		N		
α1mg (mg/L)	102	5,69 (5,18-8,60)	40	5,18 (5,18-5,67)	0,036
α1mCR (mg/g)	78	7,04 (4,65-11,17)	37	7,63 (4,56-12,48)	0,740
Albumin (mg/L)	102	5,20 (2,56-8,99)	38	4,54 (3,07-11,83)	0,623
ACR (mg/g)	78	5,58 (3,95-9,64)	37	5,53 (4,09-13,57)	0,484
Kreatinin serum (μmol/L)	102	75 (69-85)	40	77 (65-87)	0,847
eGFR prema CKD epi (ml/min/1,73m ²)	102	88 (73-100)	40	83 (72-101)	0,765
Glukoza (mmol/L)	64	5,2 (4,7-6)	37	5,2 (4,9-6,0)	0,465
Hemoglobin (g/L)	102	138 (130-147)	40	136 (128-144)	0,483
Specifična težina urina	66	1,016 (1,011-1,022)	37	1,012 (1,009-1,017)	0,018
Duljina lijevog bubrega (mm)	68	112 (103-120)	28	110 (104-118)	0,834
Duljina desnog bubrega (mm)	68	114 (102-118)	28	112 (105-122)	0,473

Vrijednosti su prikazane kao C (25.-75.P); značajne razlike (p<0,05) između skupina napisane u tekstu rezultata

α1mg – alfa1mikroglobulin u mokraći; α1mCR – omjer alfa1mikroglobulina po gramu kreatinina u mokraći; ACR - omjer albumina po gramu kreatinina u mokraci; eGFR - procijenjena glomerularna filtracija; CKD – EPI - *engl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

Tablica 22. Učestalost oštećenja bubrežne funkcije u imigranata endemskih sela unatrag 30 do 15 godina i imigranata ne-endemskih sela

	Imigranti EN sela 15-30 godina	Imigranti kontrolna, ne-EN sela
$\alpha 1\text{mCR} > 31,5 \text{ mg/g}$	2 (2,0)	2 (5,4)
$\text{ACR} > 30 \text{ mg/g}$	7 (9)	4 (10,8)
$\text{eGFR} < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$	7 (6,9)	3 (7,5)

Vrijednosti su prikazane kao N (%).

4.5. Analiza izloženosti aristolohičnoj kiselini prema odgovorima iz upitnika za period vremena od prije 20 i 30 godina i sada

Agrikulturne navike, izloženost aristolohičnoj kiselini, te podaci o obradi žita, te konzumaciji kruha u prošlosti i danas između skupina starosjedioca endemskih i ne-endemskih sela, te imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina su prikazana u Tablici 23. i Tablici 24.

U prošlosti su imigranti endemskih sela rjeđe imali polja i sijali žito u odnosu na starosjedioce ($\chi^2=21,690$; $p < 0,001$) i ispitanike kontrolnih sela ($\chi^2= 9,597$; $p=0,002$) između kojih nije bilo razlike u posjedovanju i uzgoju na poljima ($\chi^2=1,168$; $p=0,280$). Također, u prošlosti nije bilo razlike u stanju polja starosjedioca i ispitanika kontrolnih sela, dok su kod imigranata polja bila rjeđe poplavljena u odnosu na ostale dvije skupine ($\chi^2= 9,936$; $p=0,007$). Imigranti i ispitanici kontrolnih sela u prošlosti su rjeđe viđali biljku *Aristolochiae clematidis* ($\chi^2=26,611$; $p < 0,001$) i njene sjemenke među sjemenkama žita ($\chi^2=39,737$; $p < 0,001$) od starosjedioca. Nije bilo razlike u odgovorima o sveukupnom zagađenju žita sa sjemenkama korova između promatranih skupina ($\chi^2=0,211$; $p=0,900$), kao ni u upotrebi kombajna ($\chi^2=0,269$; $p=0,874$), pesticida ($\chi^2=4,475$; $p=0,107$) i herbicida ($\chi^2=4,807$; $p=0,090$). Unatrag 20 do 30 godina, starosjedioci i ispitanici kontrolnih sela su češće pekli kruh od imigranata ($\chi^2=31,794$; $p=0,001$), a imigranti su češće kupovali kruh ($\chi^2=33,457$; $p < 0,001$). Starosjedioci, ispitanici kontrolnih sela i imigranti koji su pekli kruh su većinom žito mljeli u mlinu, te dobivali brašno od mlinara, s tim da oko trećine ispitanika ne zna od čijeg žita su dobivali brašno, a ističe se da su imigranti češće kupovali brašno u prodavaonici. Statistička analiza s izricanjem p vrijednosti nije učinjena za potonja dva pitanja zbog multiplih raščlambi i malog uzorka, te time i moguće nepouzdanosti rezultata (**Tablica 23.**).

Danas više nema razlike u posjedovanju polja ($\chi^2=2,285$; $p=0,319$), dok još uvijek starosjedioci endemskih i ne – endemskih sela češće siju žito u odnosu na imigrante ($\chi^2=20,401$; $p < 0,001$). Značajno je da danas starosjedioci endemskih i ne-endemskih sela, te imigranti endemskih sela rjeđe i bez razlike između skupinama viđaju biljku *Aristolochiae clematidis* ($\chi^2=0,465$; $p=0,793$) i njene sjemenke među sjemenkama namjenjenim za brašno ($\chi^2= 1,601$; $p=0,449$). Starosjedioci kontrolnih, ne – endemskih, sela prijavljuju najmanje sveukupno zagađenje žita namjenjenog za brašno ($\chi^2=7,615$; $p=0,022$), te da su im polja češće poplavljena nego ona od

starosjedioca endemskih sela ($\chi^2= 6,205$; $p=0,045$). Starosjedioci endemskih i ne–endemskih sela sada češće koriste kombajn pri obradi polja ($\chi^2= 9,425$; $p=0,009$), dok nema razlike između skupina u korištenju herbicida ($\chi^2= 1,788$; $p=0,409$) i pesticida ($\chi^2= 4,393$; $p=0,111$). Danas starosjedioci endemskih i ne–endemskih sela rjeđe peku ($\chi^2=6,413$; $p=0,041$) i češće kupuju kruh od imigranata ($\chi^2= 8,006$; $p=0,018$). Brašno se melje u mlinu i sada većina ispitanika navodi da ne dobivaju brašno od njihovog žita.

Starosjedioci endemskih i ne – endemskih sela, te imigranti endemskih sela prijavljuju usporedivu količinu konzumiranog kruha prije i danas ($\chi^2=4,843$; $p=0,304$) (**Tablica 24.**).

Tablica 23. Upitnik o agrikulturnim navikama, izloženosti aristolohičnoj kiselini i konzumaciji kruha u prošlosti između skupina starosjedioca endemskih i ne-endemskih sela, te imigranata endemskih sela u razdoblju unatrag 30 do 15 godina

		Starosjedioci EN sela	Starosjedioci ne-EN sela	Imigranti EN sela unatrag 15 – 30 god	p
		N(%)	N(%)	N(%)	
Jeste li imali polja?	Da	886 (91,2)	190 (88,8)	46 (73) ^{a,b}	<0,001
Ako da, jeste li sijali žito na Vašim poljima?	Da	838 (95,1)	180 (94,7)	36 (76,6) ^{a,b}	<0,001
Jeste li viđali sjemenke korova u sjemenkama žita namjenjenim za brašno?	Da	462 (79,4)	108 (79,4)	22 (75,9)	0,9
Jeste li viđali AA na poljima?	Da	581 (67,8)	98 (51,9) ^a	18 (41,9) ^a	<0,001
Jeste li viđali sjemenke AA u sjemenkama žita namjenjenim za brašno?	Da	285 (35,6)	25 (14,5) ^a	2 (6,1) ^a	<0,001
Ako ste sijali žito, jeste li ga obrađivali kombajnom prije 20-30 godina?	Da	203 (24)	4 (22,2)	10 (24,4)	0,874
Jeste li upotrebljavali herbicide na vašim poljima?	Da	260 (31,1)	43 (23)	13 (31)	0,09
Jeste li upotrebljavali pesticide na vašim poljima?	Da	260 (30,4)	43 (22,8)	12 (27,9)	0,107
Jesu li polja bila poplavljena?	Da	388 (45,4)	97 (51,3)	10 (24,4) ^{a,b}	0,007
Od kuda se vaše kućanstvo prije 20-30 godina snabdijevalo s pitkom vodom?	Bunar	856 (84,5)	210 (95,5)	44 (62,9)	<0,001
	Bunar i vodovod	51 (5)	3 (1,4)	7 (10)	
	Vodovod i flaširana voda	106 (10,5)	7 (3,2)	19 (27,1)	
Jeste li pekli kruh prije 20-30 godina?	Da	916 (92,6)	206 (95,4)	50 (74,6) ^{a,b}	0,001
Ako ste pekli kruh, odakle ste dobivali brašno?	Od našeg žita	114 (12,4)	16 (7,8)	9 (18)	/
	Mlinar	770 (84,1)	176 (86,3)	28 (56)	
	Kupili	32 (3,5)	12 (5,9)	13 (26)	
Ako ste ga vozili u mlin, jeste li dobivali brašno od vašeg žita?	Uvijek	50 (6,5)	8 (4,5)	2 (7,1)	/
	Ponekad	107 (13,8)	25 (14)	8 (21,4)	
	Nikad	386 (49,9)	69 (38,8)	14 (50)	
	Ne znam	231 (29,8)	76 (42,7)	6 (21,4)	
Jeste li ikada kupovali kruh (radije nego ispekli sami) ?	Da	147 (14,8)	20 (9,3)	25 (38,5) ^{a,b}	<0,001

Vrijednosti prikazane kao N (%); ^a značajna razlika (p<0,05) sa skupinom starosjedioca EN sela, ^b značajna razlika (p<0,05) sa skupinom starosjedioca kontrolnih, ne-EN sela
AA – aristolohična kiselina

Tablica 24. Upitnik o sadašnjim agrikulturnim navikama, izloženosti AA i konzumaciji kruha danas između skupina starosjedioca endemskih i ne–endemskih sela, te imigranata endemskih sela.

		Starosjedioci EN sela	Starosjedioci ne–EN sela	Imigranti EN sela unatrag 15 – 30 god	p
		N(%)	N(%)	N(%)	
Imate li polja?	Da	1119 (81,1)	214 (77,3)	63 (78,8)	0,319
Sijete li žito?	Da	789 (71)	156 (73,6)	29 (45,3) ^{a,b}	<0,001
Viđate li sjemenke korova u sjemenkama žita namjenjenim za brašno?	Da	469 (64,2) ^b	78 (53,4)	20 (74,1) ^b	0,022
Viđate li AA na poljima?	Da	418 (40)	78 (37,9)	26 (41,9)	0,793
Viđate li sjemenke AA u sjemenkama žita namjenjenim za brašno?	Da	68 (8,3)	10 (6)	2 (4,7)	0,449
Obrađujete li kombajnom žito?	Da	466 (98,1)	100 (99)	14 (87,5) ^{a,b}	0,009
Upotrebljavate li pesticide na vašim poljima?	Da	835 (86,8)	183 (89,7)	41 (78,8)	0,111
Upotrebljavate li herbicide na vašim poljima?	Da	921 (95,4)	196 (97,5)	49 (96,1)	0,409
Jesu li polja poplavljena?	Da	277 (27,5)	74 (35,6) ^a	19 (34,5)	0,045
Od kuda se vaše kućanstvo snabdijeva pitkom vodom?	Bunar	125 (9)	201 (72,3)	12 (14,6)	<0,001
	Bunar i vodovod	92 (6,6)	18 (6,5)	6 (7,3)	
	Vodovod i flaširana voda	1167 (84,3)	59 (21,2)	64 (78)	
Pečete li kruh?	Da	553 (42,5)	105 (39)	43 (55,1) ^{a,b}	0,041
Ako pečete kruh, odakle dobivate brašno?	Od našeg žita	14 (2,6)	2 (2)	2 (4,8)	/
	Mlinar	410 (77,4)	63 (62,4)	23 (54,8)	
	Kupili	106 (20)	36 (35,6)	17 (40,5)	
Ako vozite žito u mlin, dobivate li brašno od vašeg žita?	Uvijek	4 (1)	2 (2,9)	2 (11,1)	/
	Ponekad	15 (3,9)	2 (2,9)	2 (11,1)	
	Nikad	289 (75,3)	40 (58,8)	11 (61,1)	
	Ne znam	76 (19,8)	24 (35,3)	3 (16,7)	
Kupujete li kruh?	Da	1191 (86,2)	231 (83,1)	62 (75,6) ^{a,b}	0,018
Jeste li Vi jeli više ili manje kruha prije 20-30 godina?	Više nego sada	628 (64,3)	140 (65,1)	36 (57,1)	0,304
	Manje nego sada	79 (8,1)	19 (8,8)	10 (5,9)	
	Približno jednako	269 (27,6)	56 (26)	17 (27)	

Vrijednosti prikazane kao N (%); ^a značajna razlika ($p < 0,05$) sa skupinom starosjedioca EN sela, ^b

značajna razlika ($p < 0,05$) sa skupinom starosjedioca kontrolnih, ne–EN sela

AA – aristolohična kiselina

4.6. Analiza izloženosti autohtonog stanovništva aristolohičnoj kiselini u prošlosti i sada

Starosjedioci endemskih sela u odnosu na prije 20-30 godina sada rjeđe imaju polja ($\chi^2=61,172$; $p < 0,001$), siju žito ($\chi^2=167,13$; $p < 0,001$), te se značajno smanjilo zagađenje žita sjemenkama korova ($\chi^2=25,536$; $p=0,022$) (Tablica 25.).

Danas starosjedioci rjeđe viđaju biljku *Aristolochiae clematidis* na poljima ($\chi^2=132,052$; $p < 0,001$) i češće koriste herbicide ($\chi^2=388,847$; $p < 0,001$), pesticide ($\chi^2= 335,173$; $p < 0,001$) i kombajn u obradi polja ($\chi^2= 187,005$; $p < 0,001$) koja su rjeđe poplavljena ($\chi^2=89,338$; $p < 0,001$). Za naglasiti je smanjenje učestalosti viđanja sjemenki *Aristolochiae clematidis* među sjemenkama žita namjenjenim za brašno ($\chi^2=139,68$; $p < 0,001$). Tijekom proteklih 20-tak godina starosjedioci endemskih sela rjeđe peku ($\chi^2=466,578$; $p = 0,048$), i češće kupuju kruh ($\chi^2=702,307$; $p < 0,018$) (Tablica 25.).

Tablica 25. Promjene u agrikulturnim navikama, izloženosti aristolohičnoj kiselini i konzumaciji kruha kod starosjedioca endemskih sela danas u odnosu na prošlost

		Starosjedioci EN sela - prije	Starosjedioci EN sela - sada	p
Jeste li imali polja?	Da	886 (91,2)	1119 (81,1)	<0,001
Ako da, jeste li sijali žito na Vašim poljima?	Da	838 (95,1)	789 (71)	<0,001
Jeste li viđali sjemenke korova u sjemenkama žita namjenjenim za brašno?	Da	462 (79,4)	469 (64,2)	0,022
Jeste li viđali AA na poljima?	Da	581 (67,8)	418 (40)	<0,001
Jeste li viđali sjemenke AA u sjemenkama žita namjenjenim za brašno?	Da	285 (35,6)	68 (8,3)	<0,001
Ako ste sijali žito, jeste li ga obrađivali kombajnom prije 20-30 godina?	Da	203 (24)	466 (98,1)	0,009
Jeste li upotrebljavali herbicide na vašim poljima?	Da	260 (31,1)	835 (86,8)	<0,001
Jeste li upotrebljavali pesticide na vašim poljima?	Da	260 (30,4)	921 (95,4)	<0,001
Jesu li polja bila plavljena?	Da	388 (45,4)	277 (27,5)	<0,001
Od kuda se vaše kućanstvo prije 20-30 godina snabdijevalo s pitkom vodom?	Bunar	856 (84,5)	125 (9)	/
	Bunar i vodovod	51 (5)	92 (6,6)	
	Vodovod i flaširana voda	106 (10,5)	1167 (84,3)	
Pečete li kruh?	Da	916 (92,6)	553 (42,5)	0,041
Ako ste pekli kruh, odakle ste dobivali brašno?	Od našeg žita	114 (12,4)	14 (2,6)	/
	Mlinar	770 (84,1)	410 (77,4)	
	Kupili	32 (3,5)	106 (20)	
Ako ste ga vozili u mlin, jeste li dobivali brašno od vašeg žita?	Uvijek	50 (6,5)	4 (1)	/
	Ponekad	107 (13,8)	15 (3,9)	
	Nikad	386 (49,9)	289 (75,3)	
	Ne znam	231 (29,8)	76 (19,8)	
Kupujete li kruh?	Da	147 (14,8)	1191 (86,2)	0,018

Vrijednosti prikazane kao N (%).

AA – aristolohična kiselina

4.7. Analiza prediktivnih čimbenika za oštećenje proksimalnog tubula

Oštećenje proksimalnog tubula, definirano graničnom vrijednošću $\alpha 1\text{mCR}$ za postavljanje dijagnoze EN, je analizirano binarnom logističkom regresijom (**Tablica 26., Slika 12.**). Nakon univarijatne analize, učinjena je multivarijatna za statistički značajne prediktore oštećenja proksimalnog tubula (PTD) uz prilagodbu za dob, spol, indeks tjelesne mase, dijagnozu AH i DM. Epidemiološka izloženost aristolohičnoj kiselini u prošlosti je povezana sa današnjim postojanjem PTD (OR 1,64, 95%CI 1,05 – 2,58; $p=0,031$). Značajno je za naglasiti da današnja izloženost aristolohičnoj kiselini i razdoblje izloženosti u posljednjih 30 do 15 godina nisu povezani s postojanjem PTD (OR 1,50, 95%CI 0,93 – 2,41; $p=0,098$ i OR 1,59, 95%CI 0,46 – 5,42; $p=0,462$). Štoviše, status imigranta je protektivni čimbenik PTD (OR 0,40; 95%CI 0,19 do 0,87; $p=0,02$). Boravak u EN selu, kao i obiteljska anamneza to jest anamneza domaćinstva za EN su pozitivni prediktori PTD, te osoba koja živi u endemskom selu ima omjer izgleda od 3,97 za PTD, a uz pozitivnu anamnezu domaćinstva za EN za 2,74 puta veću vjerojatnost PTD.

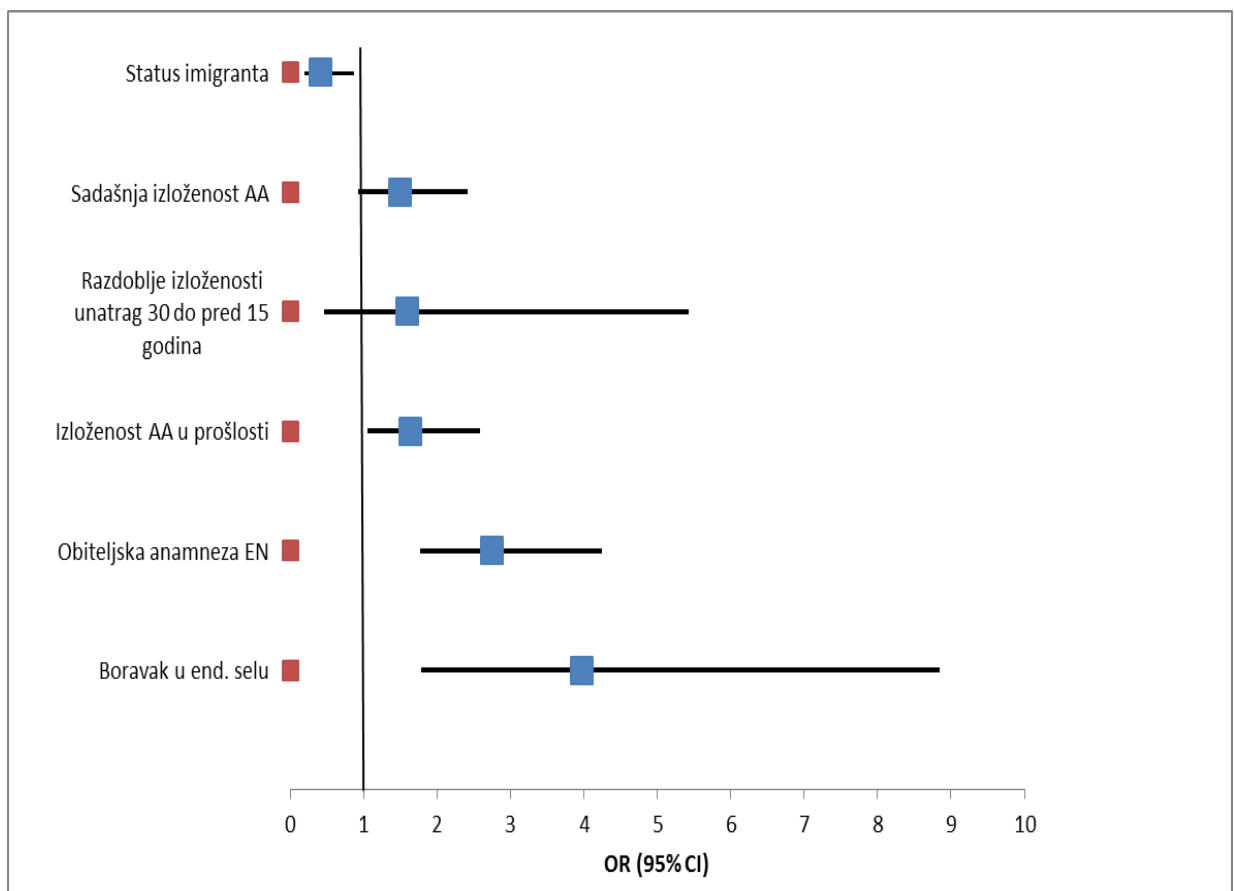
Tablica 26. Multivarijatna logistička regresijska analiza prediktora za oštećenje proksimalnog tubula

	PTD		p	Multivarijatna**	p
	Da*	Ne*		OR (95% CI)	
Boravak u endemskom selu (da)	112 (90,3)	1823 (82,0)	0,018	3,97 (1,78 – 8,85)	0,001
Obiteljska/anamneza domaćinstva na EN (da)	50 (40,3)	591 (26,6)	0,001	2,74 (1,77 – 4,24)	<0,001
Izloženost AA u prošlosti (da)	63 (60,0)	716 (36,4)	<0,001	1,64 (1,05 – 2,58)	0,031
Razdoblje izloženosti unatrag 30 do pred 15 godina (da)	8 (6,5)	548 (24,7)	<0,001	1,59 (0,46 – 5,42)	0,462
Sadašnja izloženost AA (da)	23 (29,5)	55 (70,5)	0,939	1,50 (0,93 – 2,41)	0,098
Status imigranta (da)	9 (7,3)	298 (13,4)	0,048	0,41 (0,19 – 0,87)	0,020

*N (%), **kovarijante u multiplom logističkom modelu uključuju prilagodbu za dob, spol, indeks tjelesne mase, dijagnozu arterijske hipertenzije i dijabetesa; značajne razlike ($p < 0,05$) između skupina napisane u tekstu rezultata

Oštećenje proksimalnog tubula definirano kao $\alpha 1\text{mCR} > 31,5 \text{ mg/g}$

PTD – oštećenje proksimalnog tubula; $\alpha 1\text{mCR}$ – omjer alfa1mikroglobulina po gramu kreatinina u mokraći; AA – aristolohična kiselina



Slika 12. Grafikon raspona pouzdanosti (*engl. Forest plot*) – Multivarijatna logistička analiza prediktora oštećenja proksimalnog tubula (PTD)

4.8. Usporedba različitih kriterija u klasificiranju stanovništva endemskih sela i prevalencija EN u hrvatskom žarištu

U Tablici 27, Tablici 28 i Tablici 29 je prikazana distribucija stanovništva endemskih i kontrolnih sela prema tri najčešće korištena kriterija za klasifikaciju EN: redom Brački, konsenzus kriteriji, modificirani kriteriji WHO i Danilovićevi kriteriji, dok je u Tablici 30, Tablici 31, Tablici 32 prikazana usporedba podudarnosti navedenih kriterija u klasificiranju stanovništva u skupine bolesnih od EN, sumnjivih, pod rizikom i ostalih. Prevalencija bolesnih, sumnjivih da boluju i pod rizikom od EN se povijesno izračunava dijeljenjem s cijelokupnim stanovništvom pojedinog endemskog sela, te je zbog usporedbe s prethodnim istraživanjima upotrebljen isti obrazac. Budući da bolest nije opisana u maloljetnika, te je potrebna dugotrajna izloženost, uputnije bi bilo prevalenciju izračunavati prema broju punoljetnih osoba pojedinog endemskog sela. Nadalje, dodatno ograničenje tumačenja rezultata je nestandardizirana populacija. U prošlosti su se za dijagnosticiranje EN i klasificiranje stanovništva EN sela najčešće koristili modificirani kriteriji WHO i Danilovićevi kriteriji. Analizom korelacije modificiranih WHO i Danilovićevih kriterija utvrđeno je odlično podudaranje od 87% identičnog klasificiranja stanovništva EN sela (koeficijentim korelacije 0,87) (**Tablica 32.**). Temeljem konsenzusa stručnjaka na polju EN dogovoreni su novi, Brački kriteriji koji bi se trebali koristiti u dijagnosticiranju EN i klasificiranju stanovništva EN sela u svim žarištima EN. Između Bračkih i modificiranih WHO kriterija, kao i između Bračkih i Danilovićevih kriterija postoji samo dobro podudaranje u klasificiranju stanovništva u pojedine skupine, pa tako između Bračkih i modificiranih WHO postoji korelacija od 79% (**Tablica 30.**), a između Bračkih i Danilovićevih kriterija od 77% u klasificiranju stanovništva u skupine bolesnih, sumnjivih, pod rizikom i ostalih (**Tablica 31.**). Kao što je za očekivati na temelju rezultata podudarnosti različitih kriterija prevalencija oboljelih od EN u 9 EN sela je bila najviša prema WHO kriterijima i iznosila je 1%, dok je prema Danilovićevim kriterijima bila 0,8%. Prosječna prevalencija EN u 9 endemskih sela prema Brač klasifikaciji je bila najniža i iznosila je 0,7% sveukupnog stanovništva obuhvaćenih sela, a kretala se u rasponu od 0% do 1,94%. Za istaknuti je da u endemskom selu Dubočac nije detektiran niti jedan ispitanik bolestan od EN i to pomoću svih triju kriterija za klasifikaciju EN. U endemskom selu Pričac u usporedbi s ostalim selima zabilježen je najviši postotak bolesnih od EN koji je pomoću modificiranih WHO kriterija iznosio 2,94%, a Danilovićevih i Bračkih 1,94%. Drugo selo po učestalosti EN, prema WHO i Danilović kriterijima, je bilo najnaseljenije endemsko selo

Slavonski Kobaš s najvećim apsolutnim brojem oboljelih od EN, a prema konsenzus Brač kriterijima endemsko selo Bebrina. Prevalencija sumnjivih da boluju od EN je najviša uz klasificiranje pomoću WHO kriterija i kreće se između 0,7 posto populacije Zbijega do 6,5% populacije Slavonskog Kobaša, s prosjekom od 3,6 % populacije svih 9 endemskih sela. Pomoću Bračkih - konsenzus kriterija prevalencija sumnjivih da boluju je iznosila 0,47% populacije Zbijega do 5,06% populacije Bebrine, s prosjekom od 2,77% populacije svih ispitivanih endemskih sela. Pod rizikom od oboljevanja od EN, s obzirom na pozitivnu anamnezu domaćinstva pa tako i izloženosti je, prema različitim kriterijima, u prosjeku 10,36% do 12,62% populacije ispitivanih endemskih sela.

Tablica 27. Distribucija stanovništva endemskih i kontrolnih sela prema konsenzus, Brač kriterijima

Konsenzus, Brač kriteriji					
	Populacija sela*	Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali
Selo	N				
Dubočac	202	0 (0)	2 (0,99)	20 (9,90)	83 (41,09)
Zbijeg	427	1 (0,23)	2 (0,47)	23 (5,39)	144 (33,72)
Šumeće	580	1 (0,17)	5 (0,86)	56 (9,66)	192 (33,10)
Pričac	103	2 (1,94)	4 (3,88)	18 (17,48)	26 (25,24)
Živike	236	1 (0,42)	2 (0,85)	25 (10,59)	79 (33,47)
Slavonski Kobaš	1230	17 (1,38)	42 (3,41)	229 (18,62)	333 (27,07)
Kaniža	808	1 (0,12)	24 (2,97)	80 (9,90)	184 (22,77)
Banovci	357	2 (0,56)	17 (4,76)	49 (13,73)	76 (21,29)
Bebrina	494	7 (1,42)	25 (5,06)	60 (12,15)	103 (20,85)
Ukupno EN sela	4437	32 (0,7)	123 (2,77)	560 (12,62)	1220 (27,49)
Klakar**	272	0 (0)	0 (0)	1 (0,37)	163 (59,93)
Donja Bebrina**	425	0 (0)	0 (0)	1 (0,24)	141 (33,18)
Rastušje**	295	0 (0)	0 (0)	3 (1,02)	103 (34,92)
Ukupno ne-EN sela	992	0 (0)	0 (0)	5 (0,50)	407 (41,02)

Vrijednosti su izražene kao N (%), **kontrolna, ne-endemska sela

* Prema popisu stanovništva iz 2011. godine

Tablica 28. Distribucija stanovništva endemskih i kontrolnih sela prema modificiranim kriterijima WHO

Modificirani WHO kriteriji					
	Populacija sela*	Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali
Selo	N				
Dubočac	202	0 (0)	7 (3,47)	14 (6,93)	84 (41,58)
Zbijeg	427	2 (0,47)	3 (0,70)	20 (4,68)	145 (33,96)
Šumeće	580	3 (0,52)	9 (1,55)	49 (8,45)	193 (33,28)
Pričac	103	3 (2,91)	4 (3,88)	15 (14,56)	28 (27,18)
Živike	236	1 (0,42)	9 (3,81)	23 (9,75)	74 (31,36)
Slavonski Kobaš	1230	25 (2,03)	80 (6,50)	175 (14,23)	341 (27,72)
Kaniža	808	1 (0,12)	11 (1,36)	72 (8,91)	205 (25,37)
Banovci	357	2 (0,56)	14 (3,92)	41 (11,48)	87 (24,37)
Bebrina	494	8 (1,62)	23 (4,66)	51 (10,32)	113 (22,87)
Ukupno EN sela	4437	45 (1,01)	160 (3,60)	460 (10,36)	1270 (28,62)
Klakar**	272	0 (0)	3 (1,10)	1 (0,37)	160 (58,82)
Donja Bebrina**	425	1 (0,24)	1 (0,24)	1 (0,24)	139 (32,71)
Rastušje**	295	0 (0)	1 (0,34)	2 (0,68)	103 (34,92)
Ukupno ne-EN sela	992	1 (0,10)	5 (0,50)	4 (0,40)	402 (40,52)

Vrijednosti su izražene kao N (%), **kontrolna, ne-endemska sela

* Prema popisu stanovništva iz 2011. godine

Tablica 29. Distribucija stanovništva endemskih i kontrolnih sela prema Danilovićevim kriterijima

Danilović kriteriji					
	Populacija sela*	Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali
Selo	N				
Dubočac	202	0 (0)	5 (2,48)	15 (7,43)	85 (42,08)
Zbijeg	427	1 (0,23)	0 (0)	23 (5,39)	146 (34,19)
Šumeće	580	2 (0,34)	10 (1,72)	47 (8,10)	195 (33,62)
Pričac	103	2 (1,94)	2 (1,94)	17 (16,50)	29 (28,16)
Živike	236	1 (0,42)	5 (2,12)	21 (8,90)	80 (33,90)
Slavonski Kobaš	1230	24 (1,95)	51 (4,15)	195 (15,85)	351 (28,54)
Kaniža	808	0 (0)	13 (1,61)	70 (8,66)	206 (25,49)
Banovci	357	2 (0,56)	11 (3,08)	44 (12,32)	87 (24,37)
Bebrina	494	4 (0,81)	21 (4,25)	53 (10,73)	117 (23,68)
Ukupno EN sela	4437	36 (0,8)	118 (2,65)	485 (10,93)	1296 (29,21)
Klakar**	272	0 (0)	0 (0)	1 (0,37)	163 (59,93)
Donja Bebrina**	425	0 (0)	0 (0)	1 (0,24)	141 (33,18)
Rastušje**	295	0 (0)	0 (0)	3 (1,02)	103 (34,92)
Ukupno ne-EN sela	992	0 (0)	0 (0)	5 (0,50)	407 (39,21)

Vrijednosti su izražene kao N (%), **kontrolna, ne-endemska sela

* Prema popisu stanovništva iz 2011. godine

Tablica 30. Usporedba podudarnosti Brač konsenzus i modificiranih WHO kriterija

BRAČ	WHO				
	Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali	koeficijent korelacije
Bolesni	26	5	0	1	0,790
Sumnjivi	16	43	4	60	
Rizični	2	103	460	0	
Ostali	2	14	0	1611	

Tablica 31. Usporedba podudarnosti Brač konsenzus i Danilovićevih kriterija

BRAČ	DANILOVIĆ				
	Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali	koeficijent korelacije
Bolesni	24	5	0	3	0,779
Sumnjivi	6	38	5	74	
Rizični	6	74	485	0	
Ostali	0	1	0	1626	

Tablica 32. Usporedba podudarnosti modificiranih WHO i Danilovićevih kriterija

WHO	DANILOVIĆ				
	Bolesni	Sumnjivi	Rizični	Ostali	koeficijent korelacije
Bolesni	26	5	1	14	0,870
Sumnjivi	9	89	50	17	
Rizični	1	24	439	0	
Ostali	0	0	0	1672	

4.9. Prikaz prevalencije EN i dobi ispitanika u prijašnjim istraživanjima i sada pomoću modificiranih WHO kriterija

Posljednja epidemiološka istraživanja prije ovog su u istraživanih 9 sela bila između 1983. i 1996.godine. U svakom selu se odvijalo jednokratno istraživanje i prevalencija bolesnih je određena pomoću modificiranih WHO kriterija dijeljenjem broja oboljelih s ukupnim brojem stanovnika endemskog sela. Toj prevalenciji je za usporedbu stavljena sadašnja prevalencija prema istim, u prošlosti korištenim modificiranim WHO kriterijima (**Tablica 33**), a ograničenje pristupa je nestandardizacija populacije. U 6 endemskih sela (Dubočac, Zbijeg, Šumeće, Kaniža, Banovci, Bebrina) se bilježi niži postotak prevalencije, a u dva endemska sela (Pričac, Slavonski Kobaš) porast, dok je u endemskom selu Živike prevalencija EN stabilna. Udio imigranata koji su se doselili unatrag 30 do 15 godina u cjelokupnoj populaciji pojedinog endemskog sela se kretao od 0,0% u endemskom selu Živike do 3,58% u Slavonskom Kobašu. Najviše imigranata je naselilo Slavonski Kobaš (N=44), potom Kanižu (N=18), Bebrinu (N=12), Zbjeg (N=10), Dubočac (N=7), Banovce i Šumeće (N=4 za oba sela), Pričac (N=3). Broj imigranata koji su se doseljeli unatrag manje od 15 godina je bio najviši u endemskom selu Slavonski Kobaš (N=9), potom u endemskom selu Kaniža (N=16), Dubočac (N=9), Bebrina (N=7), Banovci (N=3), Šumeće (N=3), Zbjeg (N=2), Pričac (N=1).

Iako se ne doima značajan pad srednje prevalencije EN u ispitivanih 9 EN sela od 1980-tih do 2010-tih godina, ipak postoji trend sniženja s prijašnjih 1,3% na sadašnjih 1%, a značajno je za istaknuti pomak oboljelih prema starijoj životnoj dobi s prijašnjim medijanom pojavnosti bolesti u 60–oj godini na današnjih 77 godina.

Tablica 33. Prevalencija bolesnih od EN po endemskim selima u prošlosti i sada pomoću modificiranih WHO kriterija

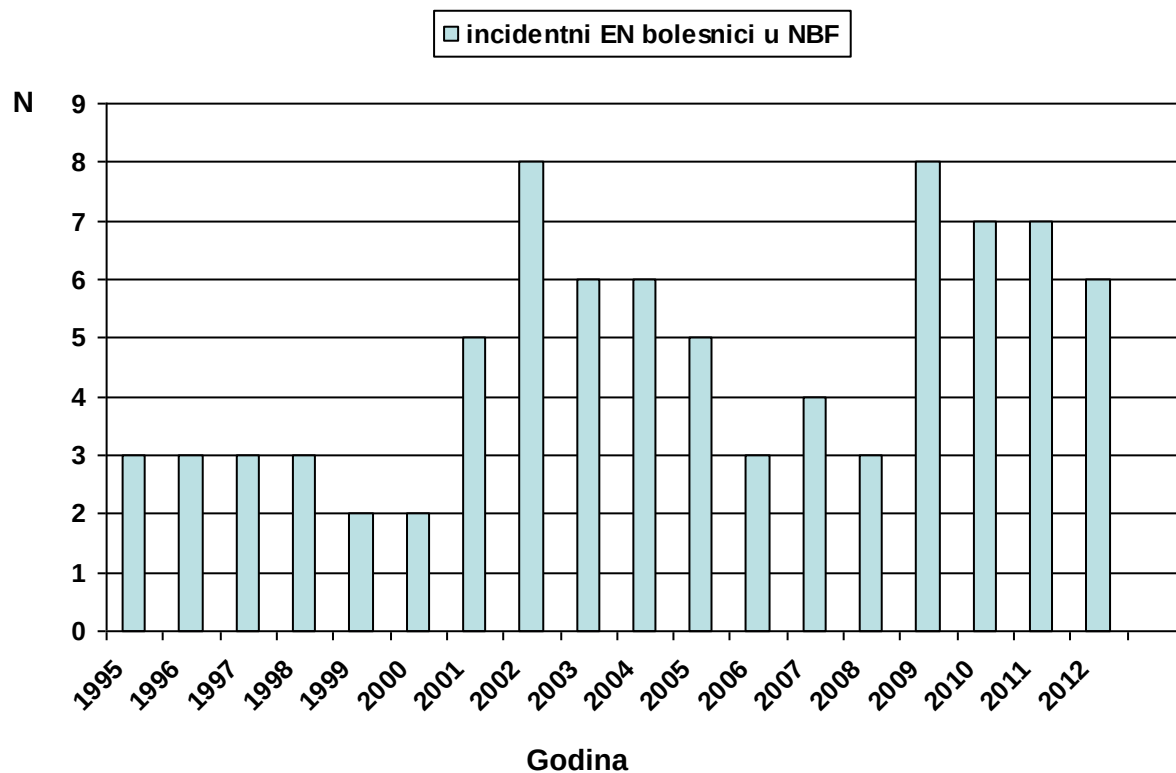
Endemska sela	Prevalencija bolesnih 1983 – 1996 – prošlost	Prevalencija bolesnih 2005 – 2010 – sada
	%	%
Dubočac	2	0
Zbijeg	0,8	0,5
Šumeće	0,7	0,5
Pričac	2,2	2,9
Živike	0,4	0,4
Slavonski Kobaš	1,3	2,0
Kaniža	1,7	0,1
Banovci	2,3	0,6
Bebrina	2,0	1,6
Ukupno	1,3	1

4.10. Prevalencija i incidencija bolesnika s endemskom nefropatijom u nadomještanju bubrežne funkcije u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu od 1995. do 2012. godine

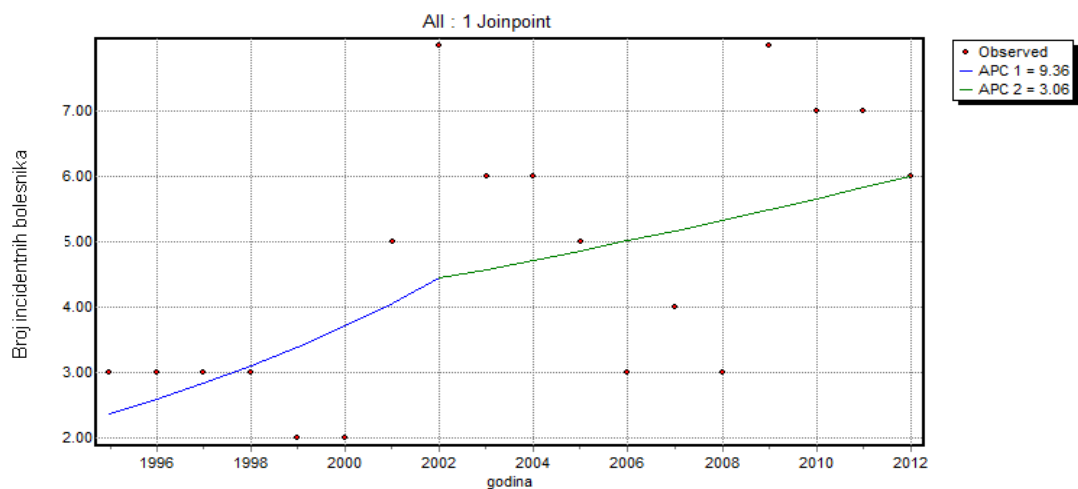
Osamdeset i četiri bolesnika je započelo s NBF zbog EN iz hrvatskog endemskog žarišta u periodu od 1995. do 2012. godine u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu (**Slika 13.**) od kojih je 52 (61,9%) bilo muškog spola. Medijan dobi pri započinjanju NBF je iznosio 67 godina (min – max; 49 – 83) i u odnosu na prvo devetogodišnje razdoblje (1995-2003) se povisio sa 61 godinu na 72 godine života u drugom devetogodišnjem razdoblju (2004-2012). Analizirano joint point metodom, značajan je porast incidencije novih bolesnika u NBF od 5,4% godišnje (CI 1,7-9,3), iako je taj trend manjeg intenziteta od 2002 godine (**Slika 14.**). Također, postoji značajan trend porasta dobi započinjana HD, od 2,2% godišnje (CI 1,7-2,8), s tim da se, iako još uvijek raste dob pri započinjanju NBF zbog EN, od 1998. godine usporava trend porasta dobi pri započinjanju NBF (**Slika 15.**). Osamdeset i tri bolesnika su bili u postupcima NBF hemodijalizom, a 1 bolesnik u NBF peritonejskom dijalizom. Od njih je 17 (21,3%) imalo anamnezu UUC, češće žene (M:Ž 7:10) i to u 60% slučajeva u prosjeku 6 godina prije započinjanja NBF. Tijekom vremena je kod 12 (14,3%) bolesnika učinjena kadaverična transplantacija bubrega, s razvojem UUC kod 1 bolesnika u postransplantacijskom periodu (8,3%). Među bolesnicima s EN u terminalnom stadiju bubrežne funkcije 75,0% je imalo AH, a 8,1% DM. Njih 69 (88,5%) je imalo pozitivnu obiteljsku anamnezu na EN. Broj prevalentnih bolesnika na HD zbog EN je u posljednjem desetljeću stabilan, od 31 bolesnika 2003. godine, do 41 bolesnika 2011. godine (**Slika 16.**). Bolesnici s EN predstavljaju oko trećinu cjelokupne hemodijalizirane populacije u općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ i taj udio bolesnika s EN je stabilan tijekom godina među cjelokupnom hemodijaliziranom populacijom. Nije bilo razlike u dobi bolesnika s EN u započinjanju postupaka hemodijalize između spolova (žene 68 min-maks 49-83) vs. muškarci 67; min-maks 51-80; $p=0,883$).

Od 84 incidentna bolesnika iz cijelog endemskog žarišta (14 endemskih sela), 56 je rođeno u 9 ispitivanih endemskih sela, od kojih se tijekom života 10 (17,86%) preselilo u ne – endemsko područje, a 9 (16,1%) u endemska sela koja nisu obuhvaćena ovim terenskim istraživanjem. S prebivalištem u 9 ispitivanih endemskih sela od 1995. do 2012. godine 37 bolesnika je započelo s postupcima hemodijalize, od kojih je preminulo dvadeset i troje (62,2%) (**Tablica 34.**). Zaključno s 2012.

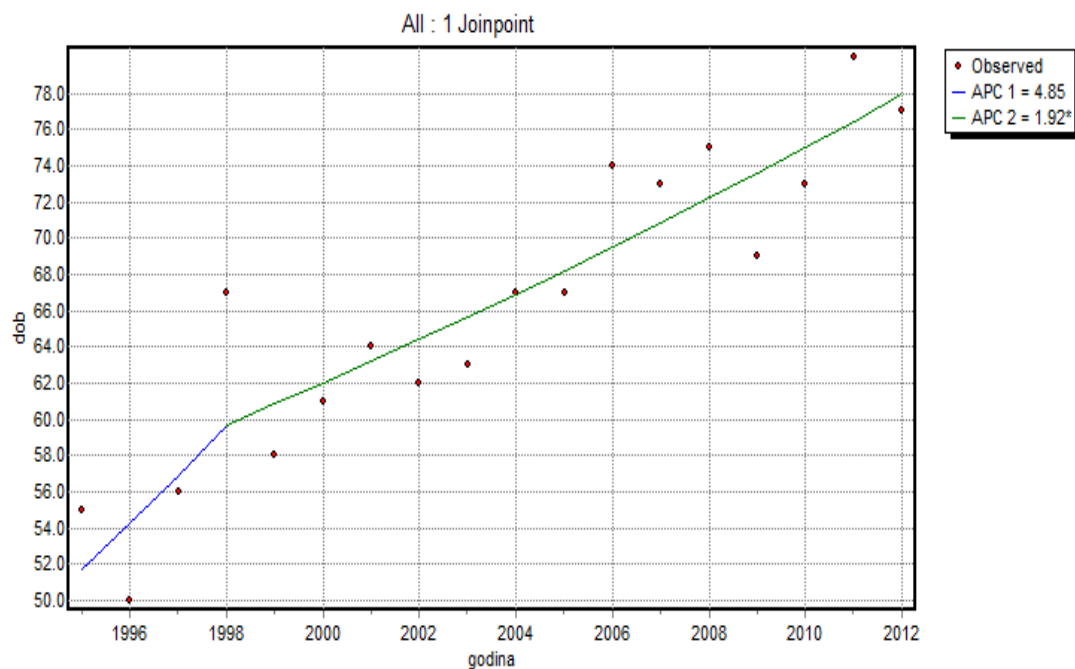
godinom je sveukupno preostalo 14 bolesnika na programu hemodijalize iz 9 ispitivanih endemskih sela, s tim da iz 4 endemska sela (Dubočac, Pričac, Šumeće, Živike) nije bilo bolesnika u NBF. Iz cijelog hrvatskog endemskog žarišta od 1995. do 2012. godine je preminulo šezdeset dvoje (63,3%) bolesnika s EN u NBF medijana dobi 69 godine (min – maks 57 – 83) (**Slika 17.**). Medijan godina od započinjanja NBF do smrti je iznosio 5,5 godina (kvartile 3-10 godina), a najčešći uzroci mortaliteta bolesnika s EN u NBF su bile sepsa i nagla smrt uslijed kardiovaskularnih incidenata (**Tablica 35.**).



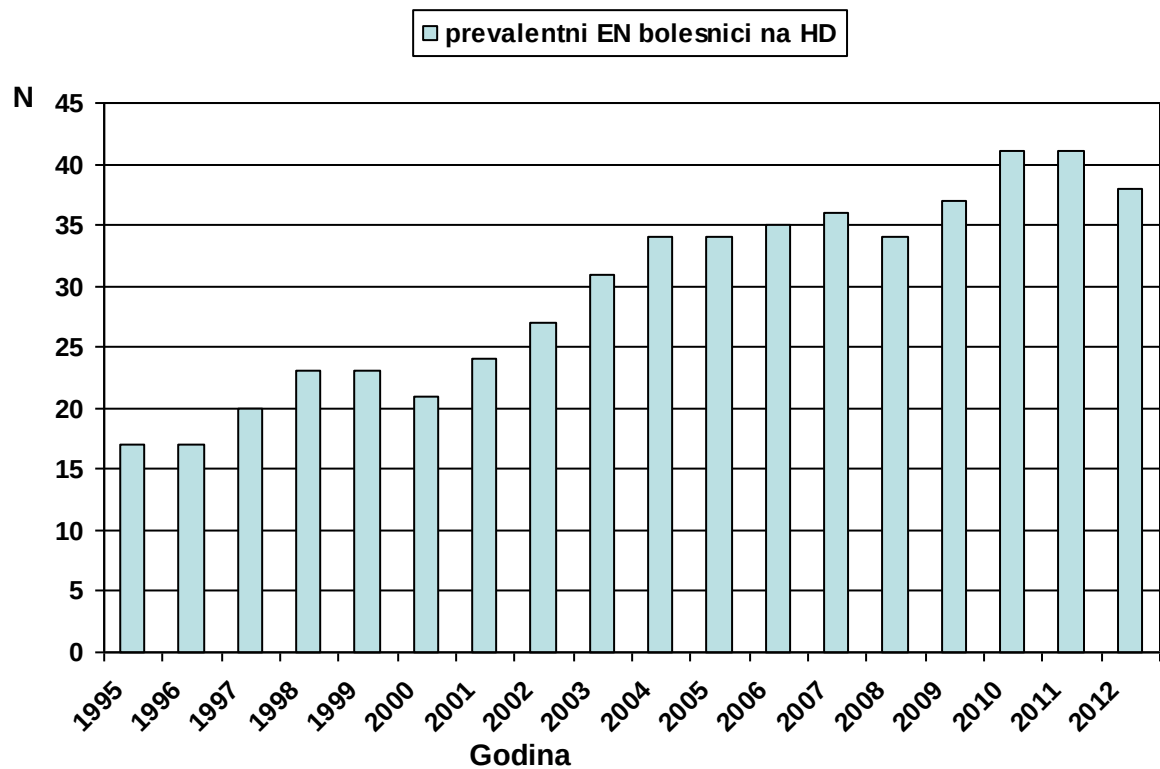
Slika 13. Broj incidentnih bolesnika u NBF zbog EN prema godinama od 1995 do 2012 godine



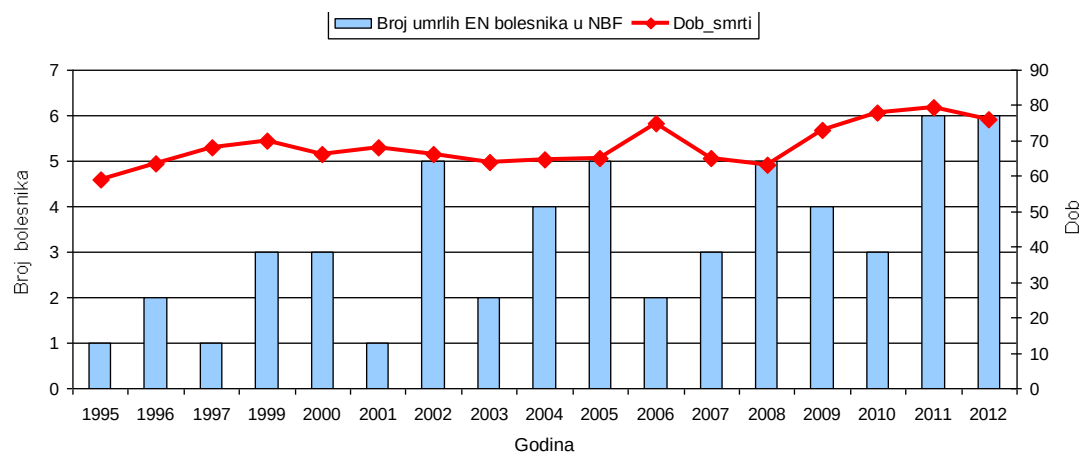
Slika 14. Analiza promjene broja incidentnih bolesnika u NBF od 1995. do 2012 godine uz jednu joint point točku



Slika 15. Analiza trenda promjene dobi pri započinjanju NBF od 1995. do 2012 godine uz jednu joint point točku



Slika 16. Broj prevalentnih bolesnika u programu HD zbog EN po godinama od 1995. do 2012. godine



Slika 17. Broj i dob preminulih bolesnika s EN u NBF po godinama od 1995. do 2012. godine

Tablica 34. Broj bolesnika u programu hemodijalize i broj umrlih bolesnika od 1995. do 2012. godine, te broj preostalih bolesnika u 2012. godini iz 9 ispitivanih endemskih sela

Endemsko selo	Broj bolesnika na HD 1995 – 2012	Broj bolesnika na HD 2012.	Broj preminulih 1995 – 2012
Banovci	6	2	4
Bebrina	7	3	4
Dubočac	0	0	0
Kaniža	5	2	3
Pričac	2	0	2
Slavonski Kobaš	11	5	6
Šumeće	3	2	1
Zbjeg	3	0	3
Živike	0	0	0
Ukupno	37	14	23

HD – hemodijaliza

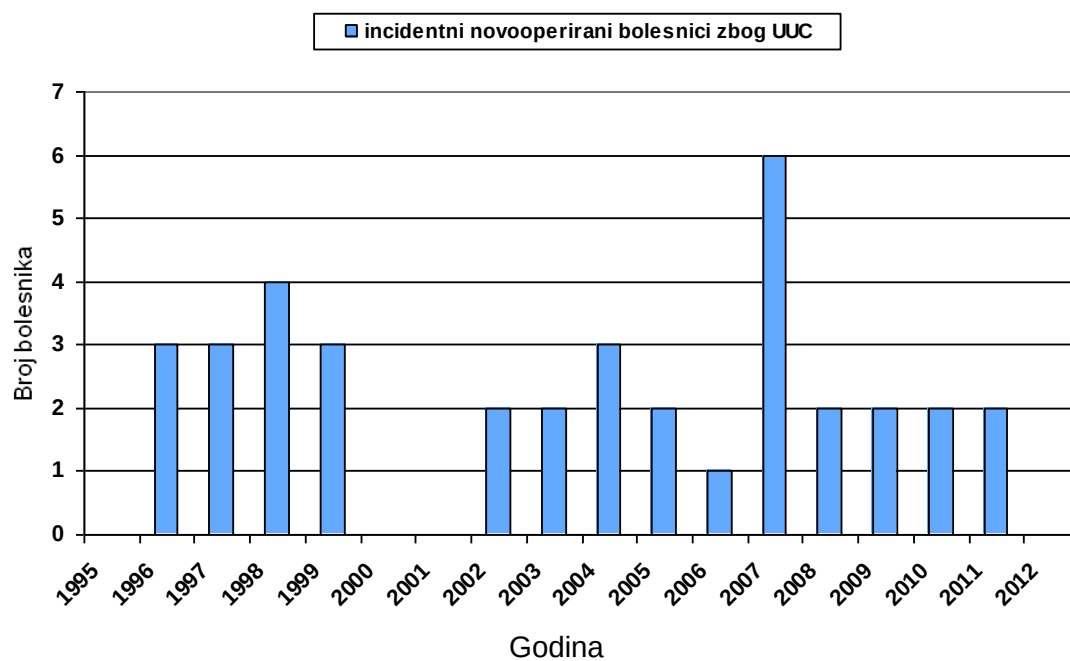
Tablica 35. Uzroci smrti bolesnika s EN u NBF od 1995. do 2012. godine

Vaskularni	Infarkt miokarda	4 (6.5)
	Zatajenje srca	2 (3.2)
	Nagla smrt/kardialni arest	10 (16.1)
	Cerebrovaskularni inzult	2 (3.2)
	Gastrointestinalno krvarenje	3 (4.8)
	Mesenterijska tromboza	1 (1.6)
Infekcije	Sepsa	14 (22.6)
	Pneumonija, bakterijska	2 (3.2)
	Drugo sjelo infekcije	3 (4.8)
	Gljivični peritonitis	1 (1.6)
Maligne bolesti	Solidni karcinomi	7 (11.3)
Bolesnik odbio daljnje NBF		2 (3.2)
Nepoznato		11 (17.7)

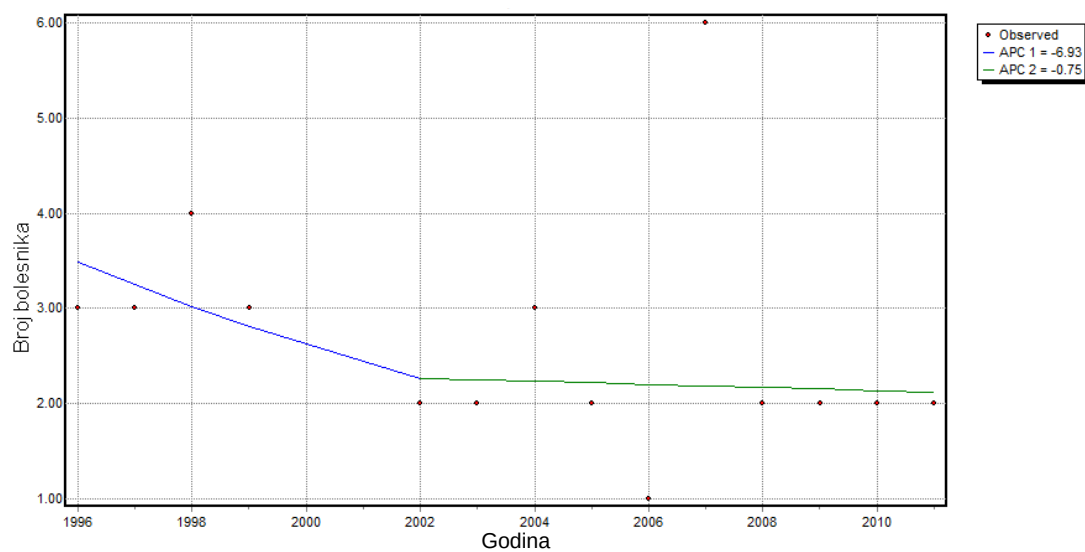
Vrijednosti prikazane kao N (%).

4.11. Broj i dob operiranih bolesnika zbog UUC iz ispitivanih 9 endemskih sela u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavanskom Brodu od 1995. do 2012. godine

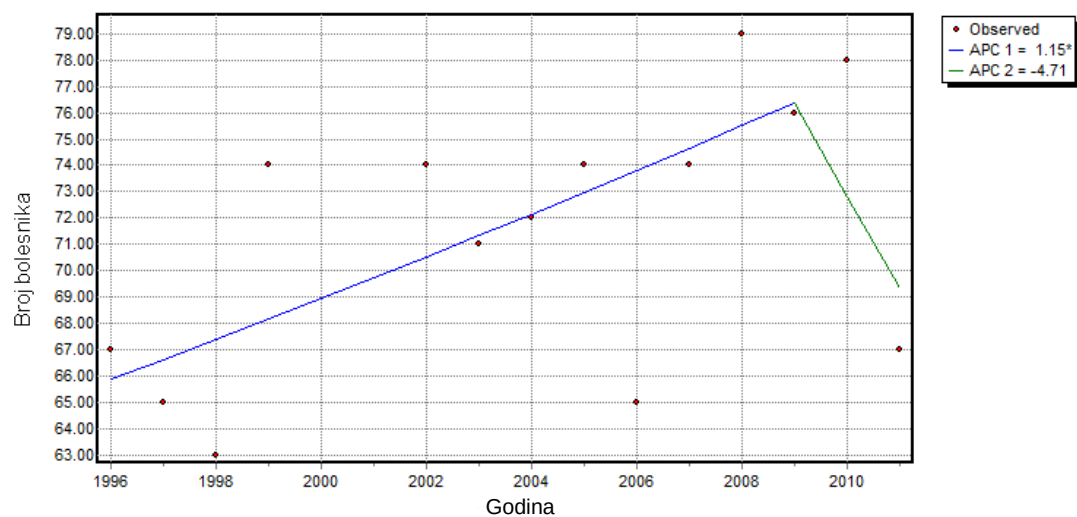
Od 1995. godine do 2012. godine je zbog UUC operirano 37 bolesnika iz 9 ispitivanih endemskih sela (**Slika 18.**), medijana dobi 72 godine (min–maks 50–80) s predominacijom ženskog spola (N=26, 70,3%). Trend novodijagnosticiranih i operiranih po godinama od 1996. do 2011. godine je analiziran joint point metodom i prikazan na **Slici 19.** Kada se analizira promjena broja incidentnih slučajeva UUC prema nepodešujućim programskim razdobljima, tada se uočava da, iako bez statističke značajnosti, postoje 2 trenda incidentnih slučajeva sa spojnom točkom u 2002. godini. Oba trenda su silazna, u prvom razdoblju broj incidentnih bolesnika s UUC se godišnje smanjuje za 6,93%, a u drugome za 0,75%, bez statističke značajnosti (prvo razdoblje 95%CI -41-46,9, drugo razdoblje 95%CI -13-13,2) (**Slika 19.**). Dob pri dijagnozi UUC pokazuje trend porasta u razdoblju od 1996. do 2011. godine, za 0,76% godišnje, iako bez statističke značajnosti (CI -0-1,6). Analiza promjene dobi pri dijagnozi, to jest, operaciji UUC prema nepodešujućim programskim razdobljima otkriva 2 trenda suprotnog smjera, sa spojnom točkom u 2009. godini (**Slika 20.**). Do te se godine bilježi statistički značajan porast dobi novooperiranih za 1,15% godišnje (CI 0,1-2,2), nakon čega slijedi statistički neznačajno sniženje dobi za 4,71% godišnje u prosjeku (CI -21,4-15,6). Između ova dva trenda nije bilo statistički značajne razlike ($Z=-0,7$, $p=0,5$). Najveći broj operiranih bolesnika u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ na Odjelu urologije zbog UUC s prebivalištem u ispitivanih 9 endemskih sela je zabilježen 2007. godine, a u prosjeku je godišnje iz promatranih sela operirano 2 bolesnika zbog UUC. U promatranom razdoblju je najviše bolesnika s UUC bilo iz Slavanskog Kobaša (N=16), potom Bebrine (N=7) i Kaniže (N=5), a nijedan bolesnik s UUC nije bio iz Banovaca (Tablica 37.). Pijelon je bio sijelo karcinoma kod 21 bolesnika (56,8%), ureter kod 11 (29,7%), a zajednička pojava karcinoma pijelona i uretera u 5 bolesnika (13,5%) endemskih sela. U postoperativnom periodu je 8 bolesnika (21,6%) razvilo terminalni stadij bubrežnog zatajenja i započelo s NBF hemodijalizom, i to troje (37,5%) paralelno s nefroureterektomijom, a petero (62,5%) postoperativno nakon medijana od 6 godina (raspon 2 – 13) (**Tablica 36.**).



Slika 18. Broj incidentnih bolesnika operiranih zbog UUC prema godinama u razdoblju od 1995 do 2012. godine iz ispitivanih 9 endemskih sela



Slika 19. Trend promjene broja novooperiranih bolesnika s UUC iz 9 ispitivanih endemskih sela uz jednu spojnu točku



Slika 20. Trend promjene dobi pri operaciji bolesnika s UUC iz 9 ispitivanih endemskih sela uz jednu spojnu točku

Tablica 36. Broj bolesnika operiranih zbog UUC prema selima od 1995. do 2012. godine

Endemsko selo	Broj bolesnika operiranih zbog UUC 1995 – 2012	Broj bolesnika u terminalnom stadiju nakon operacije UUC
Banovci	0	0
Bebrina	7	2
Dubočac	2	0
Kaniža	5	0
Pričac	1	1
Slavonski Kobaš	16	4
Šumeće	1	0
Zbjeg	3	1
Živike	2	0
Ukupno	37	8

UUC – karcinom gornjeg dijela urotela

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje je prvo istraživanje prevalencije kronične bubrežne bolesti u Hrvatskoj, a ujedno je i najveće epidemiološko istraživanje koje evaluira rano bubrežno oštećenje specifično za EN. Rezultati potvrđuju da je kronična, dugotrajna izloženost AA uzročnik endemske nefropatije i pridruženih karcinoma gornjeg dijela urotela. Rezultati su u skladu s hipotezom kako smanjenje izloženosti stanovništva AA smanjuje rizik razvoja EN. Izloženost AA u prošlosti i sadašnjosti je ispitana pomoću upitnika. Već je ranije dokazano da je stanovništvo endemskih sela nenamjerno unosilo AA ingestijom kontaminiranog kruha (107, 108, 119), a put unosa čajevima ili biljnim preparatima s AA je odbačen (63, 114).

U ovom istraživanju je ustanovljeno da je stanovništvo endemskih sela u prošlosti bilo izloženo AA. Biljka *Aristolochiae clematidis* češće raste na poplavljenim poljima, a polja stanovništva endemskih sela su češće bila poplavljena od onih u ne – endemskim selima. Također, starosjedioci endemskih sela su rjeđe koristili herbicide i pesticide nego starosjedioci ne – endemskih sela i češće su viđali biljku *Aristolochiae clematidis* na svojim poljima, te njene sjemenke među sjemenkama žita namjenjenih za brašno nego stanovništvo ne – endemskih sela. Žito su odnosili u mlin, a starosjedioci endemskih sela su češće dobivali brašno od svog žita, kao što su češće pekli kruh nego ga nabavljali u prodavaonicama. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima Hranjec i sur. koji su utvrdili da su bolesnici na hemodijalizi zbog EN češće bili izloženi AA od bolesnika na HD zbog drugih uzroka KBB (108). Nadalje, isto je potvrđeno u studiji Jelakovića i sur. u kojoj su bolesnici s UUC iz endemskih sela tri različita žarišta EN u Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj i Srbiji u prošlosti bili izloženi AA (119).

Uslijed tehnoloških promjena obrade, žetve, mljevenja žita, nabavke brašna i kruha koje su postupno nastupile unatrag par desetljeća, izloženost AA putem prehrane je svedena na minimum i vjerojatno potpuno eliminirana. Danas, u odnosu na prošlost, starosjedioci endemskih sela imaju manje polja i rjeđe siju žito što upućuje na promjenu zanimanja i običaja u ruralnim krajevima gdje je sve manje zemljoradnje. Uvjeti su unaprijeđeni, a zbog provedene melioracije sve je manje polja poplavljeno, u obradi polja se češće koriste kombajn, herbicidi i pesticidi. Sve navedeno doprinosi rjeđem viđanju *Aristolochiae clematidis* na poljima, a sve da i postoji biljka na poljima moderni načini obrade svode na minimum mogućnost zagađenja brašna što podupiru naši rezultati o manjem zagađenju žita sjemenkama korova i sjemenkama *Aristolochiae clematidis*. Uz to, izloženost je smanjena i time što se danas češće kupuje brašno i kruh iz prodavaonica. S ciljem provjere smanjenja izloženosti endemskog stanovništva AA, analizirali smo imigrante koji su se doselili iz ne–

endemskih sela Bosne (gdje izloženost ne bi trebala postojati jer ni nema slučajeva EN/UUC) upravo u tom periodu nakon agrikulturnih promjena, dakle prije 15 do 30 godina. Imigranti endemskih sela unatrag 15 do 30 godina se nisu razlikovali u izloženosti AA od stanovništva ne–endemskih, kontrolnih sela koja nisu zahvaćena bolešću. Danas i starosjedioci endemskih sela i imigranti endemskih sela, kao i starosjedioci ne–endemskih sela rjeđe viđaju *Aristolochiae clematitis* i njene sjemenke među sjemenkama namjenjenim za pripremu brašna. Budući da među imigrantima endemskih sela i starosjediocima kontrolnih, ne–endemskih sela nema bolesnih s EN, ovi rezultati u kojima danas nema razlike između stanovništva endemskih i ne–endemskih sela u izloženosti AA upućuju na pretpostavku da će EN postupno tijekom narednog desetljeća iščeznuti zbog izostanka izloženosti etiološkom agensu.

Kriteriji za klasificiranje stanovništva endemskih sela stratificiraju ispitivanu populaciju na oboljele od EN, sumnjive da boluju i nezahvaćenu populaciju koju čine rizični od oboljevanja i ostali (224, 235). U prošlosti su se za postavljanje dijagnoze EN i klasificiranje stanovništva endemskih sela upotrebljavali modificirani kriteriji WHO i Danilovićevi kriteriji (185, 235). Dijagnoza EN se postavlja kombinacijom epidemiološko–laboratorijskih pokazatelja, a ključna obilježje EN je rano oštećenje proksimalnog tubula i postojanje tubularne proteinurije koje je definirano povišenim vrijednostima $\alpha 1\text{mCR}$, $\beta 2\text{mg}$ i drugim biljezima (166–168, 188). U procjeni bubrežne funkcije se ranije koristio serumski kreatinin. Budući da serumski kreatinin može biti u referentnim vrijednostima unatoč značajno reduciranoj bubrežnoj funkciji u novim, tzv. Bračkim, konsenzus kriterijima se bubrežna funkcija određuje procijenom glomerularne filtracije i vrijednosti eGFR manje od $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ se smatraju patološkim (224). Dosljedno tome, i u ovom radu bolesni i sumnjivi su imali niže vrijednosti eGFR od nezahvaćene populacije endemskih sela i ispitanika kontrolnih, ne–endemskih sela. Između nezahvaćenih ispitanika endemskih i ispitanika ne–endemskih sela nije bilo razlike u vrijednostima kreatinina i eGFR.

U EN tubularna proteinurija je rani znak bolesti. Iako ne postoji patognomoničan, neinvazivni marker EN, u brojnim istraživanjima $\alpha 1\text{MG}$ je dokazan kao pouzdan biljeg u dijagnosticiranju EN i klasificiranju stanovništva endemskih sela (166, 167, 188, 224) i zbog toga je prihvaćen od ekspertne skupine i uvršten u nove, Bračke kriterije (224). Prema istraživanjima Đukanovic i sur. $\alpha 1\text{mCR}$ ima sposobnost diskriminacije između oboljelih od EN, zdravih kontrola, te bolesnika s drugim bubrežnim bolestima (237, 240). U našoj skupini bolesni i sumnjivi su imali više vrijednosti $\alpha 1\text{mCR}$ od nezahvaćene populacije endemskih sela, kao i od ispitanika

kontrolnih, ne–endemskih sela. U modificiranim WHO kriterijima i Danilovićevim kriterijima su se koristile približno slične granične vrijednosti $\alpha 1\text{mCR}$ od 14 mg/g i 13,2 mg/g (44, 166, 237, 240). Međutim, s ciljem preciznijeg klasificiranja stanovništva u novim, koncensuz kriterijima je prema istraživanju Dika i sur. prihvaćena granična vrijednost $\alpha 1\text{mCR}$ od 31,5 mg/g koja s osjetljivošću od 96,3% i specifičnošću od 94,05% klasificira stanovništvo endemskih sela (223). U našem istraživanju vrijednosti poviše graničnih vrijednosti $\alpha 1\text{mCR}$ od 31,5 mg/g je imalo 86,7% bolesnih, 51,3% sumnjivih, te od 0,5% do 2,7% nezahvaćene populacije endemskih i ne–endemskih sela. Budući da je u drugom istraživanju graničnu vrijednost $\alpha 1\text{mCR}$ od 15 mg/g imalo 90% bolesnih, 41,6% sumnjivih, 7,1% rizičnih i 8,9% nezahvaćenih ispitanika endemskih sela vidi se da nova granična vrijednost $\alpha 1\text{mCR}$ omogućuje bolje razlikovanje zahvaćenih i nezahvaćenih ispitanika (166). U ovom istraživanju prediktori oštećenja proksimalnog tubula ($\alpha 1\text{mCR} > 31,5$ mg/g) su bili boravak u endemskom selu, pozitivna anamneza domaćinstva za EN, te izloženost AA u prošlosti. Sadašnja izloženost AA nije bila povezana s oštećenjem proksimalnog tubula što je u skladu s manjom prisutnosti *Aristolochiae clematitis* i s manjom vjerojatnosti kontakta s okolišnim toksinom.

Drugi cilj ovog istraživanja bio je vidjeti kolika je podudarnost kriterija koji su bili korišteni u raznim EN žarištima što do sada nije istraženo. Ovim istraživanjem je ustanovljena odlična podudarnost modificiranih WHO i Danilovićevih kriterija (koeficijent korelacije 0,870) što omogućuje ekstrapolaciju i usporedbu rezultata istraživanja iz različitih endemskih područja gdje su se koristili različiti kriteriji. Činjenica da između modificiranih WHO i Danilovićevih kriterija s jedne strane i novih, Bračkih konsenzus kriterija s druge postoji tek dobra podudarnost (koeficijent korelacije 0,779 i 0,790) ukazuje kako je korištenjem ranijih kriterija bilo više lažno pozitivnih rezultata.

Jedna od prvih potvrda da su vanjski uzročnik i način života ključni za razvoj bolesti su rezultati istraživanja na Ukrajinskim imigrantima koji su se 1920–tih doselili u hrvatsko endemsko žarište. Dok u Ukrajini nije opisana EN/UUC, imigranti koji su se doselili u endemska sela tijekom vremena su stekli jednak rizik razvoja EN kao i autohtono stanovništvo endemskih sela (10,5% vs. 12,5%, $p > 0,05$) (14). Naprotiv, oni koji su naselili ne–endemska sela nisu imali rizik razvoja EN. Ovaj „prvi biološki pokus“ je etablirao značaj dugotrajne izloženosti vanjskom etiološkom uzročniku u razvoju bolesti (14). Emigracija stanovništva iz ne–endemskih sela Bosne i Hercegovine uslijed političko–socijalne situacije krajem 1980–tih i početkom 1990–tih godina omogućila je „drugi biološki pokus“ kao dodatnu provjeru hipoteze o

smanjenju izloženosti AA. Naime, imigranti su se doselili iz ne–endemskih sela Bosne i Hercegovine što ima za pretpostavku da nisu bili izloženi AA. Skupine starosjedioca endemskih i ne–endemskih sela, te imigranata endemskih sela su bile usporedive u demografskim i kliničkim karakteristikama. Za razliku od autohtonih stanovnika sela koji su najčešće proveli većinu života u mjestu rođenja, a s obzirom na činjenicu da su se imigranti doselili, oni su kraće živjeli u endemskim selima. Imigranti endemskih sela se nisu razlikovali u vrijednosti $\alpha 1\text{mCR}$ i ACR od starosjedioca endemskih i kontrolnih, ne–endemskih sela. Starosjedioci endemskih sela su imali više vrijednosti kreatinina i nižu eGFR od starosjedioca ne–endemskih sela i imigranata endemskih sela. Uočene razlike između skupina u eGFR u kojima starosjedioci endemskih sela imaju sniženu eGFR, dok su u isto vrijeme usporedive vrijednosti tubularne proteinurije ($\alpha 1\text{mCR}$), kao ranog biljega EN, upućuju na zaključak da je snižena eGFR odraz kroničnih promjena uslijed moguće ranije izloženosti AA, dok nema više akutnih, ranih oštećenja bubrežne funkcije sukladnih s EN. U skladu s tim je i rezultat ovog istraživanja u kojem među imigrantima koji su naselili endemska sela unatrag 30 do 15 godina i taj dugi niz godina boravili u njima, nije ustanovljen ni jedan imigrant s dijagnozom EN. U postavljanju dijagnoze ili sumnje na EN ključno je postojanje oštećenja proksimalnog tubula i smanjenje eGFR uz pozitivnu anamnezu domaćinstva za EN/UUC. Učestalost KBB i oštećenja proksimalnog tubula je bila manja u ovih imigranata nego u starosjedioca endemskih sela. Dapače, učestalost KBB i oštećenja proksimalnog tubula je bila usporediva s prevalencijom kod stanovništva kontrolnih, ne–endemskih sela, gdje nema EN, kao i s prevalencijom KBB i oštećenja proksimalnog tubula u nezahvaćenog stanovništva endemskih sela. Sukladno tome, imigrantski status je protektivan čimbenik oštećenja proksimalnog tubula, ranog znaka EN. Štoviše, bubrežna funkcija definirana vrijednostima eGFR i $\alpha 1\text{mCR}$ u imigranata endemskih sela je bila očuvana i nije se razlikovala od bubrežne funkcije imigranata ne–endemskih sela. Navedeno potvrđuje smanjenu izloženost AA endemskog stanovništva. I za razliku od ranije nepostojanje rizika za razvoj bolesti kod imigranata usprkos dugotrajnom boravku u endemskom selu (15 do 30 godina). Udio sumnjivih da boluju od EN kod starosjedioca endemskog stanovništva iznosio je 7,1% (N=119). Ekstrapolacijom na ispitivane imigrante, među imigrantima koji su se doseljeli unatrag 15 do 30 godina broj sumnjivih bi trebao biti najmanje 7 što je značajno veći broj nego što je ustanovljeno ovim istraživanjem gdje je jedan imigrant proglašen sumnjivim da boluje. Od ukupno 102 imigranta koji su se dosljeli nakon provedenih agrikulturalnih promjena, niti jedan imigrant nije proglašen bolesnim od EN, jedan je boravio u domaćinstvu s pozitivnom anamnezom EN i imao tubularnu proteinuriju uz očuvanu glomerularnu filtraciju, a još

dvoje je živjelo u domaćinstvu s pozitivnom anamnezom EN bez poremećaja bubrežne funkcije, dok su ostali bili usporedivi s nezahvaćenom populacijom sela. Objašnjenje postojanja oštećenja proksimalnog tubula u jednog imigranta, što ga uz pozitivnu anamnezu domaćinstva, čini sumnjivim da boluje od EN jest vjerojatno dugotrajna arterijska hipertenzija. S obzirom na značajno manji broj sumnjivih da boluju od EN od očekivanog, nepostojanje bolesnih i usporedivu bubrežnu funkciju s onom u općoj populaciji kontrolnih sela, nameće se zaključak da imigrati koji su se doselili nakon agrikulturnih promjena unatrag 15 do 30 godina nemaju rizik oboljevanja od EN/UUC. Štoviše, rezultati u skupini imigranata koji su se doselili prije agrikulturnih promjena potvrđuju prijašnju izloženost AA jer je među tim imigrantima ustanovljeno dvoje oboljelih od EN. U toj skupini je udio bolesnih od EN iznosio 2,4%, što je usporedivo s udjelom bolesnih starosjedioca u endemskom selu (1,8%). Također je troje proglašeno sumnjivima da boluju od EN. To je u skladu s rezultatima Čeočića na Ukrajinskim imigrantima koji su također imali jednaki rizik oboljevanja od EN kao autohtono stanovništvo (14). Budući da su i Ukrajinski imigranti i ti raniji imigranti iz Bosne boravili u endemskim selima istog hrvatskog žarišta, ove dvije studije su usporedive. Prisutnost *Aristolochiae clematidis* u okolišu i tadašnji agrikulturni običaji su u prošlosti pridonosili jednakom riziku oboljevanja imigranata kao i autohtonog stanovništva, dok je danas taj rizik eliminiran zbog smanjenja izloženosti AA.

Ovo je prvo istraživanje o ukupnoj prevalenciji KBB u hrvatskom endemskom žarištu, te uopće o prevalenciji KBB u ne–endemskoj, kontrolnoj ruralnoj populaciji. Velika prevalencija KBB od 16,6% u endemskom žarištu se može objasniti izloženosti AA u prošlosti. U Tajvanu i Kini je opisana najveća prevalencija KBB od 9,9% i 10,8% što je povezano s većom upotrebom preparata koji sadrže AA (255-257). Prevalencija KBB u endemskom žarištu značajno je veća nego u većini europskih zemalja gdje iznosi između 4,7% i 8,1% (258-262). Prevalencija KBB u imigranata, tj. nezahvaćenog stanovništva endemskih sela (6,9%) i stanovništva ne–endemskih, kontrolnih sela (9,1%) je usporediva s prevalencijom u drugim državama. U Italiji je prevalencija KBB 6,4%, u Norveškoj 4,7%, Švicarskoj 8,1%, Islandu 7,2%, Španjolskoj 6,8% i Turskoj 5,2% (258-262). Navedeno, osim što podupire hipotezu da je povećana prevalencija KBB u endemskim selima miraz prijašnje izloženosti AA, pokazuje da je prevalencija KBB na razini Hrvatske u skladu s europskim rezultatima. Također se poklapaju rezultati u kojima se vidi naglo smanjenje prevalencije KBB iz stadija 3 u stadije 4 i 5. Prevalencija KBB u SAD–u sa 4,3% u stadiju 3 i u Europi sa 5,3% pada na 0,2% u SAD i 0,1% u Europi u stadiju 4, te 0,1% i 0,0 u stadiju 5 KBB

(210). U ruralnoj ne–endemskoj populaciji Hrvatske prevalencija KBB sa 8,8% u stadiju 3a i 3b pada na 0,0% u stadiju 4, tj. 0,3% u stadiju 5. To je smanjenje prevalencija od 30 puta; sa 8,8% na 0,3%. Nagli pad u prevalenciji stadija 4 KBB u odnosu na stadij 3a i 3b se najvećim dijelom objašnjava povećanom kardiovaskularnom smrtnošću ovih bolesnika. Naime, Go i sur. su pokazali da rizik kardiovaskularnih incidenata i smrtnosti raste s padom eGFR i to već od 3 stadija KBB (263). Dapače, rizik smrti u stadiju 3 KBB je 16 puta viši nego rizik razvijanja terminalnog stadija KBB (263). To podupiru i rezultati Keith i sur. koji su pratili 28 000 bolesnika u stadiju 2 i 3 KBB tijekom 5 godina i ustanovili da je 19% bolesnika iz 2 stadija umrlo, kao i 24% iz 3 stadija KBB i to najčešće od kardiovaskularnih bolesti (264).

Zanimljiv je povećan postotak bolesnika u stadiju 4 i 5 iz endemskih sela (2,6%), ne samo kao dokaz još uvijek prisutne EN, već i u odnosu na postotak stadija 3a, 3b (14,2%). Za razliku od ne–endemskih sela gdje je to smanjenje trideseterostruko, u endemskim selima je samo peterostruko tj. više bolesnika doživi NBF što može govoriti u prilog bolje preventivne skrbi ugroženog stanovništva, ali i mogućeg manjeg kardiovaskularnog mortaliteta bolesnika u ranim fazama EN. Nema istraživanja o prevalenciji kardiovaskularnih incidenata u bolesnika s EN u odnosu na bolesnike s drugim uzrocima KBB. Bolje preživljenje u ranim stadijima KBB zbog EN u odnosu na druge uzroke KBB moglo bi se objasniti kasnijom pojavom arterijske hipertenzije kao posljedicom tubulointersticijskog obrasca „*salt wasting*“ nefropatije i moguće zbog oštećenja jukstamedularnog aparata i smanjene sinteze renina. Međutim, kako danas više nema izloženosti AA ne očekuje se da će biti početnih stadija EN, tako da će se prevalencija KBB u endemskim selima približiti prevalenciji u ne–endemskim selima. To potvrđuju i naši rezultati na bosanskim imigrantima kod kojih nismo uočili znakove oštećenja proksimalnog tubula što se smatra biljekom ranog oštećenja u EN.

Prevalencija bolesnih i sumnjivih od EN u endemskim selima je manja, ali broj bolesnika u NBF je stabilan jer bolesnici dožive NBF. Čala navodi da bolesnici u NBF zbog EN dulje žive od ostalih (31). U skladu s tim, Čukuranović i sur. su ustanovili da bolesnici na HD zbog EN imaju bolje preživljenje od bolesnika na HD zbog drugih uzroka bubrežnih bolesti (4,83 godine vs. 3,1 godine) (148). To je sukladno ovom istraživanju u kojem je medijan godina od započinjanja NBF do smrti bio 5,5 godina.

Prevalencija EN u hrvatskom endemskom žarištu ima tendenciju smanjivanja (26), što je u skladu s našom hipotezom i rezultatima, ali budući da je EN rijetka, sporoprogresivna bolest, još je uvijek potreban oprez i praćenje populacije

endemskih sela. Prevalencija EN se povijesno računala dijeljenjem broja bolesnih s cjelokupnom populacijom endemskog sela prema važećem popisu stanovništva bez standardiziranih stopa. Budući da EN nije opisana kod maloljetnog stanovništva, isto se i ne uključuje u terenska istraživanja, te bi stoga bilo točnije prevalenciju računati prema broju odraslog stanovništva sela uz standardizaciju. No, radi ujednačavanja s podacima iz prošlosti se zadržao gornji obrazac. Sedamdesetih godina prošlog stoljeća prevalencija EN se kretala oko 4,4% s rasponom od 0,6% u selu Šumeće do 8,3% u selu Pričac. Postotak sumnjivih da boluju od EN bio je do 20% stanovnika endemskih sela (12, 25). U ovom istraživanju je srednja prevalencija EN bila 1% s rasponom od 0,0% i 2,9% u različitim endemskim selima. Ipak, niz faktora utječe na prevalenciju, kao na primjer dulje trajanje bolesti, bolje dijagnostičke i terapijske mogućnosti, manja smrtnost, useljavanje ugrožene, a iseljavanje nezahvaćene populacije povisuje prevalenciju i obrnuto. U našem istraživanju je dob oboljelih značajno pomaknuta prema starijim dobnim skupinama s 50 godina prije tri desetljeća na današnjih 77 godina. U prošlosti su oboljeli bili stari onoliko koliko su danas stari rizični i ostali stanovnici endemskih sela (medijan 48 i 49 godina). Kasnija pojava bolesti u životu, osim što govori u prilog smanjenoj izloženosti uzročniku, upućuje i na bolju medicinsku skrb. Medijan dobi umrlih bolesnika u NBF zbog EN od 2004. do 2012. godine je iznosio 72 godine i ne razlikuje se značajnije od očekivanog trajanja života opće populacije Hrvatske u tom razdoblju. Sukladno tome, uz bolje dijagnostičke i terapijske mogućnosti, a time i dulje trajanje života zahvaćenog stanovništva, prevalencija bi u odnosu na prošlost trebala biti veća uz isti broj incidentnih slučajeva. Prema istraživanju Miletić – Medved i sur. (6) i prema popisu stanovništva svih endemskih sela iz 2001. godine 785 osoba je uselilo u odnosu na 1991. godinu od kojih je većina doseljenih naselila endemska sela male prevalencije EN (Brodski Varoš, Slobodnica) pa prema tome migracija stanovništva ne bi trebala utjecati na smanjenje prevalencije u ispitivanih 9 endemskih sela. To je u skladu s našim istraživanjem gdje je najviše imigranata u posljednjih 30 godina naselilo upravo Slavonski Kobaš (N=61) u kojem je prevalencija EN štoviše veća nego ranije. Većina preostalih imigranata su naselili redom po učestalosti Kanižu, Bebrinu i Zbjeg. Prevalencija je u Kaniži sa 1,5 % pala na 0,1 %, Bebrini sa 2,1% na 1,6%, a u Zbjegu je bila bez promjene. Budući da su pregledani imigranti u ovom istraživanju činili oko 3,5% cjelokupne populacije sela nije izgledno da bi imigracija neizloženog stanovništva bila uzrok smanjenja prevalencije. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je od 59 bolesnika s EN u NBF od 1995. do 2012. godine s mjestom rođenja u 9 ispitivanih endemskih sela njih 10 tijekom života emigriralo u ne-endemska područja. Budući da nemamo podatak kada su se navedeni bolesnici

iselili iz endemskih sela i je li to bilo prije prethodnih perlustracija, ne može se u usporedbi prevalencija procijeniti je li ovo iseljenje pridonjelo smanjenju današnje prevalencije. Važno je uočiti heterogenost između različitih endemskih sela kako u prevalenciji bolesti tako i u kliničkoj prezentaciji. Slavonski Kobaš se izdvaja kao najzahvaćenije endemsko sela s najvećim brojem bolesnih od EN detektiranih u terenskom istraživanju (N=25), bolesnika u NBF (N=11) i operiranih zbog UUC (N=16) u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ od 1995. do 2012. godine. Međutim, u prilog tvrdnji da je izloženost etiološkom agensu i u tom selu smanjena govori činjenica da je najveći broj (43 %) ispitivanih imigranata naselilo Slavonski Kobaš, a oni nemaju znakova oštećenja bubrežne funkcije. U kontekstu smanjenja prevalencije, a i različitih kliničkih prezentacija ove bolesti, bitno je naglasiti da u endemskom selu Dubočac nije detektiran niti jedan oboljeli od EN u terenskom istraživanju, te da niti jedan bolesnik u periodu od 1995. do 2012. godine nije započeo s NBF zbog EN, dok su 2 bolesnika operirana od UUC. U endemskom selu Živike je zabilježena niska prevalencija EN (0,4%). U navedenom periodu ni u selu Živike niti jedan bolesnik nije započeo s NBF zbog EN, a dvoje je operirano zbog UUC. Situacija u endemskom selu Banovci, koji također bilježi smanjenje prevalencije s 1,7% na 0,6%, je u smislu kliničke prezentacije bolesti obrnuta situacija. Naime, iz endemskog sela Banovci od 1995. do 2012. godine nije operiran ni jedan bolesnik zbog UUC, dok je šestero započelo s NBF zbog EN.

U prošlosti je selo proglašeno endemskim ukoliko je dijagnoza postavljena u najmanje tri autohtona stanovnika sela. Ne postoje kriteriji prema kojima bi se redefinirao status sela. U Srbiji se koriste nazivi hiperendemsko, endemsko i hipoendemsko selo ovisno o prevalenciji (10). U povijesti terenskih istraživanja hrvatskog endemskog žarišta po prvi puta u jednom endemskom selu nije detektiran niti jedan oboljeli od EN (26). Miletić – Medved navodi da se specifični mortalitet od EN u endemskim selima smanjio 3 puta s 2,06 na 0,65 na tisuću stanovnika endemskih sela od 1991. do 2002. godine što je osim bolje prognoze sukladno i smanjenju morbiditeta od EN (6).

U ovom istraživanju je potvrđena tendencija smanjivanja prevalencije bolesnih od EN u endemskim selima uz održanu prevalenciju EN bolesnika u NBF, ali i pomak oboljelih prema starijim dobnim skupinama.

Smanjenje prevalencije EN u endemskim selima je zabilježeno i u Srbiji i Bugarskoj (52, 53, 63). Čukuranović i sur. nalaze smanjenje prevalencije u slivu rijeke Morave u Srbiji (Mezgraja sa 3,8% na 0,52% i Donja Trnava sa 2,7 na 1,4%), kao i smanjenje prevalencije bolesnika s EN s 10% na 3,1% među cjelokupnom hemodijaliziranom populacijom (54). U skladu s tim su podaci iz Bugarske gdje se stopa incidencije EN

u 20 endemskih sela u dva desetogodišnja razdoblja od 1965 do 1987. godine smanjila s 0,7 na 0,3 na tisuću stanovnika godišnje (63). Istraživači endemskog žarišta u slivu rijeke Kolubare u Srbiji navode da je EN još uvijek prisutna, ali se u njihovim radovima također bilježi pad prevalencije u dva od tri proučavana endemska sela (43-45). Navedeni pad prevalencije bolesnih i sumnjivih bio je s 10,2% u prošlosti na 5,7% cijele populacije sela Petka, te pad prevalencije bolesnih s 3,47% na 1,9% cijele populacije sela Šopić u posljednjem istraživanju. Međutim, združena prevalencija bolesnih i sumnjivih stanovnika sela Šopić bilježila je porast s 5,0% na 6,5% u odnosu na cijelu populaciju sela. U skladu s tim, bitno je uočiti da je prevalencija održana prvenstveno zbog udjela sumnjivih u ukupnom stanovništvu sela, a ne bolesnih. Iako u prilog aktivnosti žarišta govori podatak o postojanju većeg postotka sumnjivih, važno je uočiti da je dob sumnjivih u starijoj dobnoj skupini (medijan 60 godina), a budući da je EN sporoprogresivna bolest i da nakon 14 godina 50 % ispitanika nije imalo značajnije smanjenje klirensa kreatinina, postavlja se pitanje hoće li prema očekivanom trajanju života sumnjivi ikada razviti manifestni stadij EN (265). S obzirom da endemska žarišta u Bosni i Rumunjskoj nisu proučavana na populacijskoj razini endemskih sela, ne može se niti procijeniti promjena aktivnost žarišta. Ipak, iz rumunjskog i bosanskog endemskog žarišta postoje epidemiološki podaci o bolesnicima s EN u NBF. U Bosni se bilježi smanjivanje udjela bolesnika s EN u cijelokupnoj hemodijaliziranoj populaciji s 16,8% u 2001. godini na 14,7% u 2006. godini, s naglaskom da je EN još uvijek vodeći uzrok NBF u ugroženom dijelu države (39). Rumunjsko endemsko žarište je jedino u kojem se nalazi trajni porast udjela bolesnika u NBF zbog EN. U svim državama s EN se bilježi pomak oboljelih prema starijim dobnim skupinama kako oboljelih u selima tako i bolesnika s EN u NBF. Neki autori smatraju da se prema prevalenciji na HD ne može suditi o smanjenju prevalencije EN u endemskim žarištima pozivajući se na činjenicu da time velik dio bolesnika ostane nedijagnosticiran ili premine prije ESRD (265). Međutim, u našem istraživanju postoji veći udio osoba u stadiju 4 i 5 KBB u odnosu na ne-endemska područja što može upućivati da bolesnici ipak dožive NBF i da ustanovljeno smanjenje prevalencije bolesnika s EN u postupcima NBF u Bosni i Srbiji može govoriti u prilog općem smanjenju pojavnosti bolesti. Uostalom, u zdravstvenom sustavu je bitno dovodi li neka bolest do potrebe za reorganizacijom zdravstvene skrbi pa je stoga podatak o smanjivanju prevalencije bolesnika s EN u postupcima NBF itekako značajan.

Zaključno, sadašnji podaci ukazuju na smanjenje aktivnosti endemskog žarišta u većini država s EN, preciznije u Bosni, Bugarskoj, Hrvatskoj i Srbiji.

Danilovićeve kriteriji koji su se koristili u Srbiji i modificirani WHO kriteriji koji su se u posljednjem istraživanju koristili u Hrvatskom endemskom žarištu se odlično podudaraju u klasificiranju stanovništva endemskih sela što omogućuje usporedbu dva žarišta endemske nefropatije (185, 235). Đukanović i sur. izvještavaju kako je prevalencija EN u slivu Kolubare nepromijenjena (43-45). U tim istraživanjima, kao i u našem korišten je $\alpha 1mCR$ kao marker tubularne proteinurije. Odaziv stanovnika sela tijekom istraživanja u oba endemska žarišta je iznosio od 70 – 85% odrasle populacije sela. Srpska endemska sela Šopić i Petka sa združenom prevalencijom bolesnih i sumnjivih od 6,5 % i 5,7% odgovaraju najzahvaćenijim hrvatskim endemskim selima (Slavonski Kobaš, Pričac, Bebrina, Banovci). Prevalencija bolesnih i sumnjivih stanovnika sela Vreoci (1,77%), iako je stabilna svrstava ga u endemska sela male prevalencije kao što je to slučaj s većinom naših endemskih sela (Zbjeg, Šumeće, Kaniža). Dob oboljelih i sumnjivih u srpskom žarištu je pomaknuta prema starijim dobnim skupinama baš kao i u hrvatskom endemskom žarištu. Hrvatsko i srpsko endemsko žarište promatrano prema združenoj prevalenciji bolesnih i sumnjivih da boluju od EN se doimaju sličnima uz uočavanje ipak nešto viših prevalencija u srpskom žarištu, te je moguće da je srpsko endemsko žarište bilo dulje izloženo etiološkom agensu ili većoj dozi istog tijekom povijesti. U prilog smanjenju izloženosti AA i endemskog stanovništva srpskog žarišta je značajan pomak u dobi oboljelih prema starijim dobnim skupinama. Zanimljivo bi bilo na populacijskoj razini analizirati aktivnost rumunjskog endemskog žarišta koje se prema podacima o bolesnicima s EN u NBF i operiranim zbog UUC izdvaja kao najaktivnije. Kako bi se moglo definitivno odgovoriti postoje li razlike između žarišta EN potrebno je nastaviti s terenskim istraživanjima koristeći ujednačene Bračke konsenzus kriterije.

Iako je na razini države prevalencija bolesnika u NBF zbog EN među svim bolesnicima u NBF u padu (31), u ovom istraživanju je ustanovljeno da je ona ipak održana na razini hemodijaliznog centra koji skrbi o populaciji hrvatskog endemskog žarišta. Bolesnici s EN predstavljaju oko trećine cjelokupne hemodijalizirane populacije u Općoj bolnici "Dr. Josip Benčević" u Slavonskom Brodu. To je u skladu i sa endemskim žarištem u Bosni gdje se vidi smanjenje bolesnika u NBF zbog EN na razini države, ali uz održan udio bolesnika u NBF zbog EN u ugroženom dijelu države (39). U Srbiji je evidentirano smanjenje prevalencije hemodijalizirane populacije zbog EN, dok je u Rumunskoj udio dijaliziranih zbog EN u trajnom porastu (54, 59). Za održanu prevalenciju EN bolesnika u NBF može dijelom biti odgovorno dulje preživljenje u odnosu na ostalu hemodijaliziranu populaciju (31, 148).

U prošlosti se navodila veća učestalost bolesti u žena (3), dok je sada distribucija spolova podjednaka. U posljednjem desetljeću dob započinjanja NBF zbog EN u hrvatskom endemskom žarištu iznosi 72 godine, baš kao i u Srbiji (26, 54) i Bosni (38, 39) i ne razlikuje se od dobi drugih bubrežnih bolesnika (31).

Od 84 bolesnika koji su započeli s NBF od 1995. do 2012. godine, 17 (21,3%) je imalo UUC. Usporediv postotak bolesnika je zabilježen u Srbiji (29,8%) i Rumunjskoj (20%), dok je Bosni taj postotak niži (11,5%) (4, 39, 59). UUC su u prosjeku 6 godina prethodili zatajenju bubrežne funkcije, što je u skladu s istraživanjem Bukvić i sur u srpskom endemskom području (4). Kod malog broja EN bolesnika učinjena je transplantacija bubrega (14,3%). Uzrok tome može biti starija dob ovih bolesnika, kao i strah od razvoja UUC. Od 12 transplantiranih bolesnika, jedan je razvio UUC što podupire rezultate Bašić–Jukić i sur. da bolesnici s EN imaju značajno veći rizik razvoja UUC od ostale transplantirane populacije (251), a sukladno je i s rezultatima transplantiranih bolesnika iz Belgije s ijetrogenim oblikom nefropatije aristolohične kiseline (94).

Od 1995. do 2012. godine nije bilo značajnije promjene u mortalitetu, a bolesnici su u NBF živjeli prosječno 5,5 godina. Duljina života u NBF je usporediva s radom Čukuranovića i sur. u kojem je iznosila 4,8 godina (148). Kardiovaskularne bolesti i karcinomi, kao najčešći uzroci smrti, se podudaraju s uzrocima smrti kod bolesnika s drugim uzrocima zatajenja bubrežne funkcije i općom populacijom. Važno je ponoviti da u 2012. godini nije bilo niti jednog EN bolesnika u NBF iz endemskih sela Dubočac, Živike, Zbjeg i Pričac.

UUC nije čest karcinom, te stoga treba biti oprezan u donošenju zaključaka o promjenama incidencije. Analiza broja operiranih zbog UUC iz devet endemskih sela hrvatskog žarišta od 1995. do 2012. godine upućuje da su UUC u endemskom žarištu vrlo učestali. Iako se *joint point* analizom uočava da dolazi do smanjenja godišnjeg broja operiranih zbog UUC, potreban je dulji period praćenja populacije endemskih sela prije donošenja definitivnih zaključaka. Specifični morbiditet od UUC je još uvijek značajan i veći od onog na razini Hrvatske i Brodsko–posavske županije što potvrđuje istraživanje Cvitkovića i sur. koji navode da je specifični morbiditet od UUC u endemskim selima od 2003. do 2009. godine bio 13,9 puta veći nego u Hrvatskoj i 3,69 puta veći nego u Brodsko–posavskoj županiji (7). No, ovakvi podaci o specifičnom morbiditetu iz prošlosti ne postoje što onemogućava analizu promjena pojavnosti bolesti u endemskim selima. Jedini podaci su rezultati Belicze i sur. koji su analizirali isključivo bolesnika s UUC operirane u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“, te su uočili smanjujući trend pojavnosti između 1990–tih i 2000–tih godina (79,4% na

65,8%) (30). Uspoređujući periode od 1995. do 2002., te 2003. do 2009. godine, podaci o specifičnom mortalitetu od UUC u endemskim selima u odnosu na cijelu Hrvatsku govore o smanjenju specifičnog mortaliteta od UUC s 55 puta većeg na 26,3 puta većeg. Uz ograničenje što UUC nisu česti karcinomi i radi se o kratkim vremenskim intervalima, ovo smanjenje UUC specifičnog mortaliteta u endemskim selima bi, osim što govori o boljoj liječničkoj skrbi, moglo upućivati i na smanjenje morbiditeta od UUC u endemskim selima (6, 7). Trend smanjivanja incidencije UUC u endemskim selima je zabilježen i u Srbiji (5, 48, 55, 56) i Bugarskoj (63), dok je u porastu u Rumunjskoj (59). U literaturi ne postoje podaci o epidemiologiji UUC u Bosni. U endemskom žarištu Srbije je pojavnost UUC u dva desetogodišnja intervala pala s 57 puta na 11 puta veću učestalost u endemskim selima (55). U našem istraživanju, baš kao i u Srbiji (4), potvrđena je kasnija pojavnost UUC endemskog područja s medijanom dobi od 72 godine bez razlike u dobi bolesnika s UUC iz ne – endemskog područja. U Srbiji se dob pri dijagnozi UUC povisila s 56,6 godina kolika je bila u periodu od 1952.–1978. godine na 62 godine u razdoblju od 1979. do 1998. godine. Iako ne postoje podaci novijeg datuma iz srpskog endemskog područja moguće da je navedena ranija dob pojavnosti UUC odraz jače izloženosti stanovništva etiološkom agensu.

Zaključno, ovo je najveće epidemiološko istraživanje koje je evaluiralo rano bubrežno oštećenje specifično za EN, kao i prvo istraživanje prevalencije KBB u hrvatskom endemskom žarištu. Svi dobiveni podaci, a pogotovo rezultati s imigrantima iz bosanskih ne–endernih krajeva, potvrđuju hipotezu da je izloženost AA značajno manja, ukoliko je uopće prisutna, nego što je bila ranije.

Ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja. Prvo je u skladu s dizajnom opservacijskih presječnih istraživanja. Zatim, $\alpha 1\text{mCR}$ je određen iz jednokratnog uzorka urina, no primjerena reproducibilnost između dva mjerenja i kompatibilnost s 24–satnim vrijednostima govori u prilog legitimnosti ovakvog pristupa u epidemiološkim istraživanjima (173, 211). Jednokratno uzorkovanje je bio slučaj i u brojnim drugim istraživanjima koji podupiru pouzdanost ovog biljega u definiranju EN (166–168, 188, 224), a i drugih kroničnih tubulointersticijskih bolesti, kao što je kadmijaska nefropatija (171, 173, 174). Ograničenje ispitivanja izloženosti AA u daljoj prošlosti može biti u pristranosti ili nemogućnosti prisjećanja, ali ispitanicima su bili ponuđene fotografije, te su istodobno prikazani i drugi korovi, a važno je naglasiti da je stanovništvo endernih sela u razdoblju istraživanja još uvijek bilo uvjereno da je uzrok EN/UUC zagađena voda. Idući upitnik je korišten u drugim studijama s dosljednim

rezultatima (108, 114, 119). Ovi rezultati su dobiveni u samo jednom endemskom žarištu, te bi slična istraživanja trebalo provesti u drugim državama s EN. Endemska nefropatija i pridruženi karcinomi gornjeg dijela urotela su još uvijek prisutni kao posljedica ranije izloženosti aristolohičnoj kiselini, a budući da je izloženost smanjena u posljednjih par desetljeća, te da imigranti nemaju rizik oboljevanja, endemska nefropatija će postupno iščeznuti iz hrvatskog endemskog žarišta. Međutim, potrebno je pratiti i kontrolirati populaciju koja je prije tog vremena naseljavala endemska sela i time mogla biti izložena aristolohičnoj kiselini. Endemska nefropatija i pridruženi karcinomi gornjeg dijela urotela su odličan primjer kako promjene u ljudskom okolišu mogu utjecati na promjenu pojave bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. Status imigranta i bubrežno oštećenje

1.1 Imigranati, starosjedioci endemskih sela, te ispitanici iz kontrolnih, ne-endemskih sela se nisu razlikovali u tjelesnoj visini, tjelesnoj masi, arterijskom tlaku ni u udjelu ispitanika s arterijskom hipertenzijom i šećernom bolesti.

1.2.1. Imigranti koji su naselili endemska sela unatrag 15 do 30 godina se nisu razlikovali u vrijednostima biljega oštećenja proksimalnog tubula od nezahvaćenog stanovništva endemskih sela i ispitanika kontrolnih sela.

1.2.2. Oštećenje proksimalnog tubula iznad granične vrijednosti je bilo češće u starosjedioca endemskih sela nego u imigranata i ispitanika kontrolnih, ne-endemskih sela pri čemu imigranti, iako žive dugi niz godina u endemskim selima, imaju jednako očuvanu funkciju proksimalnog tubula kao i opća populacija, tj. ispitanici kontrolnih, ne-endemskih sela.

1.2.3. Zaključno, nema razlike u učestalosti snižene glomerularne filtracije i albuminurije između imigranata i nezahvaćenog stanovništva endemskih sela i ispitanika kontrolnih sela.

1.3.1. Između imigranata koji su naselili endemska i imigranata koji su naselili ne-endemska nije bilo razlike u dobi, duljini boravka, broju imigranata s pozitivnom obiteljskom, tj. anamnezom domaćinstva za endemsku nefropatiju, tjelesnoj visini, tjelesnoj masi, udjelu arterijske hipertenzije i šećerne bolesti. Nadalje, nije bilo razlike u stupnju edukacije, razini prihoda ili statusu pušenja pa se može zaključiti da su dvije skupine usporedive po velikom broju pokazatelja, a razlikuju se jedino po tome žive li u endemskom ili ne-endemskom selu.

1.3.2. Imigranti endemskih i ne-endemskih sela se nisu razlikovali u prevalenciji kronične bubrežne bolesti, albuminurije, alfa-1 mikroalbuminurije, ni u duljini bubrega, dok su štoviše imigranti kontrolnih sela imali nižu specifičnu težinu urina.

1.3.3. Zaključno, imigranti endemskih sela imaju jednako očuvanu bubrežnu funkciju, uključujući i očuvanu funkciju proksimalnog tubula, kao i imigranti kontrolnih, ne-endemskih sela.

2. Izloženost aristolohičnoj kiselini i rizik oštećenja proksimalnog tubula

2.1. U prošlosti su imigranti endemskih sela rjeđe imali polja i sijali žito u odnosu na starosjedioce i ispitanike kontrolnih sela, a njihova polja su bila rjeđe poplavljena.

2.2. Imigranti i ispitanici kontrolnih sela u prošlosti su rjeđe viđali biljku *Aristolochiae clematidis* i njene sjemenke među sjemenkama žita od starosjedioca endemskih sela.

2.3. Unatrag 20 do 30 godina, starosjedioci i ispitanici kontrolnih sela su češće pekli kruh od imigranta, a imigranti su češće kupovali kruh. Starosjedioci, ispitanici kontrolnih sela i imigranti koji su pekli kruh su većinom žito mljeli u mlinu, te dobivali brašno od mlinara. Imigranti su češće od starosjedioca i ispitanika kontrolnih sela brašno za kruh nabavljali iz prodavaonice.

2.4. Danas više nema razlike u posjedovanju polja, dok još uvijek starosjedioci endemskih i ne–endemskih sela češće siju žito u odnosu na imigrante, a danas starosjedioci endemskih i ne–endemskih sela, te imigranti endemskih sela rjeđe i bez razlike između skupinama viđaju biljku *Aristolochiae clematidis* i njene sjemenke među sjemenkama namjenjenim za brašno.

2.5. Multivarijatnom analizom uz prilagodbu za dob, spol, indeks tjelesne mase, dijagnozu arterijske hipertenzije i šećerne bolesti utvrđeno je da su pozitivni prediktori oštećenja proksimalnog tubula izloženost aristolohičnoj kiselini u prošlosti, boravak u endemskom selu, kao i obiteljska anamneza to jest anamneza domaćinstva za endemsku nefropatiju, a status imigranta je protektivni čimbenik. Značajno je za naglasiti da današnja izloženost aristolohičnoj kiselini i razdoblje boravka u endemskom selu u posljednjih 30 do 15 godina nisu povezani s oštećenjem proksimalnog tubula.

3. Trendovi prevalencije endemske nefropatije i urotelnih karcinoma gornjeg dijela mokraćnog sustava

3.1. Uspoređujući period od 1980-tih do 2010-tih godina pad srednje prevalencije endemske nefropatije u ispitivanih devet endemskih sela nije značajan, no ipak postoji trend sniženja s prijašnjih 1,3% na sadašnjih 1%, a značajno je za istaknuti pomak oboljelih prema starijoj životnoj dobi s prijašnjim medijanom pojavnosti bolesti u 60–oj godini na današnjih 77 godina.

3.2. Ukupna prevalencija bolesnih u svih devet endemskih sela prema modificiranim WHO kriterijima je stabilna. U šest endemskih sela se bilježi pad prevalencije, a po

prvi puta otkada se provode terenska istraživanja hrvatskog endemskog žarišta u jednom endemskom selu (Dubočac) nije registriran niti jedan oboljeli od endemske nefropatije.

3.3. U razdoblju od 1995. do 2012. godine niti jedan bolesnik nije započeo s postupcima nadomještanja bubrežne funkcije iz endemskih sela Dubočac i Živike, te niti jedan bolesnik nije operiran zbog karcinoma gornjeg dijela urotela iz endemskog sela Banovci. Navedeno upućuje na potrebu redefiniranja statusa endemskih sela.

3.4. Analizirano *joint point* metodom, značajan je trend porasta incidencije novih bolesnika u nadomještanju bubrežne funkcije od 5,4% godišnje, iako je taj trend manjeg intenziteta od 2002. godine. Također, postoji značajan trend porasta dobi započinjanja liječenja hemodijalizom od 2,2% godišnje.

3.5. Broj incidentnih bolesnika s endemskom nefropatijom na hemodijalizi u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu u posljednjem je desetljeću stabilan, ali je dob započinjanja liječenja pomaknuta prema starijim dobnim skupinama.

3.6. Broj incidentnih bolesnika operiranih od karcinoma urotela pokazuje statistički neznatilan silazni trend koji je do 2002. godine iznosio 6,93%, a nakon toga 0,75%, no u interpretaciji treba biti oprezan budući da bolest nije učestala, a period praćenja nije dovoljno dug što se odnosi i na zaključak 3.2.

3.7. Zaključno, prevalencija endemske nefropatije u hrvatskom endemskom žarištu ima tendenciju smanjivanja uz održanu prevalenciju bolesnika s endemskom nefropatijom liječenih nadomještanjem bubrežne funkcije, a dob oboljelih je značajno pomaknuta prema starijim dobnim skupinama.

4. Usporedba različitih dijagnostički kriterija za endemsku nefropatiju

4.1. Analizom korelacije modificiranih WHO i Danilovićevih kriterija utvrđeno je odlično podudaranje od 87% identičnog klasificiranja stanovništva endemskih sela, dok između Bračkih konsenzus kriterija i modificiranih WHO kriterija, kao i između Bračkih i Danilovićevih kriterija postoji samo dobro podudaranje u klasificiranju stanovništva u pojedine skupine od 79% i 77%.

4.2. Ustanovljena odlična podudarnost modificiranih WHO i Danilovićevih kriterija omogućava ekstrapolaciju i usporedbu rezultata istraživanja iz različitih endemskih područja gdje su se koristili različiti kriteriji.

4.3. Novi, Brački, konsenzus kriteriji preciznije klasificiraju stanovništvo endemskih sela.

4.4. Činjenica da između modificiranih WHO i Danilovićevih kriterija s jedne strane i novih, Bračkih konsenzus kriterija s druge postoji tek dobra podudarnost ukazuje kako je korištenjem ranijih kriterija bilo više lažno pozitivnih rezultata.

5. Kronična bubrežna bolest u hrvatskom endemskom žarištu

5.1. Ovo je prvo istraživanje o ukupnoj prevalenciji kronične bubrežne bolesti u hrvatskom endemskom žarištu, te uopće o prevalenciji kronične bubrežne bolesti u Hrvatskoj.

5.2. Kronična bubrežna bolest (stadiji KBB > 3a) češća je u autohtonog stanovništva endemskih sela u odnosu na stanovnike ne–endernih sela i imigrante endernih sela, a nema razlika između stanovnika ne–endernih sela i imigranata endernih sela.

5.3. Velika prevalencija kronične bubrežne bolesti od 16,6% u endemskom žarištu se može objasniti izloženosti aristolohičnoj kiselini u prošlosti.

5.4. Prevalencija kronične bubrežne bolesti u endemskom žarištu značajno je veća nego u drugim europskim državama.

5.5. Prevalencija kronične bubrežne bolesti u imigranata, te nezahvaćenog stanovništva endernih sela i stanovništva ne–endernih, kontrolnih sela je usporediva s prevalencijom u drugim državama.

5.6. Stadiji 4 i 5 kronične bubrežne bolesti su značajno češći u endemskim nego u kontrolnim, ne-endemskim selima. Veći postotak bolesnika u stadiju 4 i 5 iz endernih sela ukazuje da više bolesnika s endemskom nefropatijom u odnosu na druge kronične bubrežne bolesti doživi liječenje nadomještanjem bubrežne funkcije što može govoriti u prilog bolje preventivne skrbi ugroženog stanovništva, ali i mogućeg manjeg kardiovaskularnog mortaliteta bolesnika u ranim fazama endemske nefropatije.

Zaključno, ovo je najveće epidemiološko istraživanje koje je evaluiralo rano bubrežno oštećenje specifično za endemsku nefropatiju, kao i prvo istraživanje prevalencije kronične bubrežne bolesti u hrvatskom endemskom žarištu.

Svi dobiveni podaci, a pogotovo rezultati s imigrantima iz bosanskih ne–endernih krajeva, potvrđuju hipotezu da je izloženost stanovništva endernih sela aristolohičnoj kiselini značajno manja nego što je bila ranije, ukoliko je više uopće i prisutna.

7. SAŽETAK

Uvod: Tehnološki napredak agrikulturnih djelatnosti je smanjio kontaminaciju kruha aristolohičnom kiselinom, a time i razvoj endemske nefropatije. Stoga bi imigranti iz ne – endemskih sela Bosne koji su naselili endemska sela hrvatskog žarista unatrag 30 do 15 godina trebali biti pod manjim rizikom razvoja endemske nefropatije. S ciljem testiranja smanjenja izloženosti aristolohičnoj kiselini, analizirali smo prošlu i sadašnju izloženost aristolohičnoj kiselini, oštećenje proksimalnog tubula kao ranog znaka endemske nefropatije, te prevalenciju kronične bubrežne bolesti u starosjedioca endemskih i ne – endemskih sela, te imigranata endemskih sela.

Ispitanici i metode: U ovom opservacijskom, presječnom istraživanju od 2005. do 2010. godine je uključeno ukupno 2822 stanovnika ispitivanih sela, od čega je 2161 zadovoljilo kriterije za daljnju analizu i podjeljeno u tri skupine; starosjedioci endemskih i ne – endemskih sela, imigranti koji su se u endemska sela naselili unatrag 30 do 15 godina. Oštećenje proksimalnog tubula je definirano omjerom $\alpha 1$ mikroglobulina i kreatinina u urinu većim od 31,5 mg/g, a kronična bubrežna bolest procijenjenom glomerularnom filtracijom nižom od 60 ml/min/1,73m².

Rezultati: Prevalencija kronične bubrežne bolesti i oštećenja proksimalnog tubula je značajno niža u imigranata nego u starosjedioca endemskih sela (6,9% versus 16,9%; $p < 0,001$; 2,0% versus 6,2%; $p = 0,007$). Unatrag 20-tak godina imigranti endemskih sela su rjeđe viđali biljku *Aristolochiae clematidis* na svojim poljima (41,9% vs. 67,8%), njene sjemenke među sjemenkama žita namjenjenim za brašno (6,1% vs. 35,6%) nego starosjedioci endemskih sela. Također su imigranti, u odnosu na starosjedioce endemskih sela, češće jeli kupovni nego domaći kruh (38,5% vs. 14,8%, $p = 0,001$). Danas i starosjedioci i imigranti endemskih sela značajno manje viđaju biljku *Aristolochiae clematidis* i njene sjemenke među sjemenkama žita. Izloženost aristolohičnoj kiselini u prošlosti je povezana s oštećenjem proksimalnog tubula (OR, 1,64; 95% CI, 1,05 do 2,58; $p = 0,03$), dok sadašnja izloženost aristolohičnoj kiselini nije povezana s oštećenjem proksimalnog tubula (OR, 1,50; 95% CI, 0,93 do 2,41; $p = 0,98$). Nadalje, status imigranta je nezavisni negativni prediktor postojanja oštećenja proksimalnog tubula (OR, 0,41; 95% CI, 0,19 do 0,87; $p = 0,02$).

Zaključak: Imigranti i starosjedioci endemskih sela su značajno manje izloženi ingestiji aristolohične kiseline u odnosu na prošlost i za očekivati je daljnje smanjenje prevalencije endemske nefropatije i pridruženih karcinoma gornjeg dijela urotela.

8. SUMMARY

Kidney damage in two different population of endemic focus.

Ivana Vuković Lela, 2015.

Background and objectives: Improvements in agricultural practices in Croatia have reduced exposure to aristolochic acid via contaminated flour and risk for development of endemic (Balkan) nephropathy. Therefore, due to reduced exposure to aristolochic acid, it was hypothesized that Bosnian immigrants who settled in an endemic area in Croatia 15 – 30 years ago would be at lower risk of developing endemic nephropathy. To test this hypothesis, past and present exposure to aristolochic acid, proximal tubule damage as a hallmark of endemic nephropathy, and prevalence of CKD in Bosnian immigrants were analyzed.

Participants, and methods: In this cross-sectional observational study conducted from 2005 to 2010, overall 2822 inhabitants of the villages were enrolled, and 2161 eligible farmers were divided into groups: indigenous inhabitants from endemic nephropathy and non – endemic nephropathy villages and Bosnian immigrants; $\alpha 1$ microglobuline to creatinine ratio 31.5 mg/g and eGFR < 60 ml/min per 1.73m² were considered to be abnormal.

Results: CKD and proximal tubule damage prevalences were significantly lower in Bosnian immigrants than inhabitants of endemic nephropathy villages (6.9% versus 16.9%; $p < 0.001$; 2.0% versus 6.2%; $p = 0.007$, respectively); 20 years ago, Bosnian immigrants observed less *Aristolochia clematitis* in cultivated fields (41.9% versus 67.8%) and less seeds among wheat seeds (6.1% versus 35.6%) and ate more purchased than homemade bread compared with Croatian farmers from endemic nephropathy villages (38.5% versus 14.8%, $p = 0.001$). Currently, both Croatian farmers and Bosnian immigrants observe significantly fewer *Aristolochia* plants growing in their fields compared with 15–30 years ago. Prior aristolochic acid exposure was associated with proximal tubule damage (OR, 1.64; 95% CI, 1.05 to 2.58; $p = 0.03$), whereas present exposure was not (OR, 1.50; 95% CI, 0.93 to 2.41; $p = 0.98$). Furthermore, immigrant status was an independent negative predictor of proximal tubule damage (OR, 0.41; 95% CI, 0.19 to 0.87; $p = 0.02$).

Conclusions: Bosnian immigrants and autochthonous Croats residing in endemic areas are exposed significantly less to ingestion of aristolochic acid than in the past. The prevalence of endemic nephropathy and its associated urothelial cancers is predicted to decrease over time.

9. POPIS LITERATURE

1. Tanchev Y, Evstatiev P, Dorosiev D, Penčeva Ž, Cvetkov G. Proučavanje na nefrite v Vračanska okolija. *Svremena medicina*. 1956;7:14-29.
2. Tanchev Y, Dorosiev D. The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. *IARC Sci Publ*. 1991(115):21-8.
3. Čeović S, Miletić-Medved M. Epidemiological features of endemic nephropathy in focal area of Brodska Posavina, Croatia. In: Čvorišćec S, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, editors. *Endemic nephropathy in Croatia*. Zagreb, Croatia: Academia Croatica scientiarum medicarum; 1996. p. 7-21.
4. Bukvić D, Janković S, Đukanović L. Urinary tract tumors in Kolubara region. *Facta Universitatis*. 2004;11(1):5-10.
5. Čukuranović R, Ignjatović I, Višnjić M, Veličković L, Petrović B, Potić M, et al. Characteristics of upper urothelial carcinoma in an area of Balkan endemic nephropathy in south Serbia. A fifty-year retrospective study. *Tumori*. 2010;96(674-9).
6. Miletić-Medved M, Domijan AM, Peraica M. Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia. *Wien Klin Wochenschr*. 2005;117(17):604-9.
7. Cvitković A, Ivic-Hofman I, Juric D. Upper urothelium carcinomas in Croatian endemic area. *Wien Klin Wochenschr*. 2013;125(17-18):529-36.
8. Đukanović L, Radovanović Z. Clinical Nephrotoxins: Renal Injury from Drugs and Chemicals. In: de Broe M, Porter G, Bennett W, Verpooten G, editors. *Clinical Nephrotoxins*. 2 ed: Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 587-601.
9. Radovanović Z. Topografska distribucija endemske nefropatije u SR Srbiji po naseljima. In: Vukušić Z, editor. *Zbornik radova III simpozija o endemskoj nefropatiji*. Beograd: Galenika; 1977. p. 30-9.
10. Nikolic J. Epidemijska nefropatija i tumori gornjeg urotela: Izdavačko preduzeće Beograd; 2006. 171-81 p.
11. Balkan endemic nephropathy as a medical and social problem in Vratsa region, Bulgaria. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Proceedings of the 4th Symposium of Endemic (Balkan) Nephropathy*. Niš 1979. p. 261.
12. Čeović S, Hrabar A, Saric M. Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol*. 1992;30(3):183-8.
13. Dinev IH. Results of long – term observation of patients and normal individuals who have emigrated from the village of Karash and settled in Sofia suburb villages. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Proceedings of the 4th Symposium of Endemic (Balkan) Nephropathy*; Niš 1979. p. 271.
14. Čeović S, Hrabar A, Radončić M. An etiological approach to Balkan endemic nephropathy based on the investigation of two genetically different populations. *Nephron*. 1985;40(2):175-9.
15. 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):223-8.
16. Toncheva DI, Von Ahsen N, Atanasova SY, Dimitrov TG, Armstrong VW, Oellerich M. Identification of NQO1 and GSTs genotype frequencies in Bulgarian patients with Balkan endemic nephropathy. *J Nephrol*. 2004;17(3):384-9.
17. Toncheva D. Genetic studies in BEN and associated urothelial cancers. *Coll Antropol*. 2006;30:34.
18. Mihailov T. Genealogical status of Balkan endemic nephropathy in Bulgaria. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Proceedings of the 4th Symposium of Endemic (Balkan) Nephropathy*; Niš 1979.
19. Stefanović V, Toncheva D, Atanasova S, Polenaković M. Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *Am J Nephrol*. 2006;26(1):1-11.

20. Radonić M, editor *Epidemiologie, clinique, histologie et etiologie de la nephrite endemique en Yugoslavia*. Proceedings of the 1st International Congress of Nephrology; 1961; Paris.
21. Čeović S, Hrabar A, Radonić M. Epidemiološka i socijalno medicinska obilježja balkanske endemske nefropatije u Brodsko-posavskom žarištu. *Med Vjes*. 1988;20(2):53-7.
22. Čeović S, Hrabar A, Radonić M. Proširenost, učestalost i druge epidemiološke značajke balkanske endemske nefropatije u Brodskoj posavini. *Anali Zavoda Jugoslav Akad*. 1985;4:373-85.
23. Pichler O, Bobinac E, Miljuš B, Sindik A. O učestaloj pojavi bubrežnih oboljenja u okolini Slavenskog Broda. *Lijec Vjesn*. 1959;81:295-306.
24. Ceovic S, Plestina R, Miletic-Medved M, Stavljenic A, Mitar J, Vukelic M. Epidemiological aspects of Balkan endemic nephropathy in a typical focus in Yugoslavia. *IARC Sci Publ*. 1991(115):5-10.
25. Cvoriscec D, Ceovic S, Borso G, Rukavina AS. Endemic nephropathy in Croatia. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36(5):271-7.
26. Cvitkovic A, Vukovic-Lela I, Edwards KL, Karanovic S, Juric D, Cvoriscec D, et al. Could disappearance of endemic (Balkan) nephropathy be expected in forthcoming decades? *Kidney Blood Press Res*. 2012;35(3):147-52.
27. Sauter G, Algaba F, Amin M, Busch C, Cheville JC, Gasser T, et al. Tumors of the urinary system. In: Eble JN, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I, editors. *World Health Organisation classification of tumors Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs*. Lyon, France: IARC Press; 2004. p. 110-23.
28. Sostaric B, Vukelic M. Characteristics of urinary tract tumours in the area of Balkan endemic nephropathy in Croatia. *IARC Sci Publ*. 1991(115):29-35.
29. Chen CH, Dickman KG, Huang CY, Moriya M, Shun CT, Tai HC, et al. Aristolochic acid-induced upper tract urothelial carcinoma in Taiwan: clinical characteristics and outcomes. *Int J Cancer*. 2013;133(1):14-20.
30. Belicza M, Demirovic A, Tomic K, Lenicek T, Pavic I, Jakovina K, et al. Comparison of occurrence of upper urinary tract carcinomas in the region with endemic villages and non-endemic nephropathy region in Croatia. *Coll Antropol*. 2008;32(4):1203-7.
31. Čala S. Endemic nephropathy in Croatian registry for renal replacement therapy. II Nephrology Congress of Bosnia and Herzegovina; Tuzla 2005. p. 148.
32. Trnačević S, Halilbašić A, Imamović G, Mešić E. Balkan Endemic Nephropathy in Bosnia and Herzegovina. *Facta Universitatis, Series Medicine and Biology*. 2002;9(1):31-3.
33. Vizjak A, Trnacevic S, Ferluga D, Halilbasic A. Renal function, protein excretion, and pathology of Balkan endemic nephropathy. IV. Immunohistology. *Kidney Int Suppl*. 1991;34:S68-74.
34. Gaon J. Endemic nephropathy in Bosnia. In: Wolstenholme G, Knight J, editors. *The Balkan Nephropathy*. London: Churchill Ltd; 1967. p. 51-71.
35. Fajgelj A, Filipović A, Popović N. Akcioni republički program rješavanja problema endemske nefropatije u SR Bosni i Hercegovini (rezultati poslije prve godine njegove primjene). *Acta Med Saliniana*. 1976;5:57-65.
36. Imamović G, Trnačević S, Mešić E, Stipančić Ž. Endemic (Balkan) nephropathy in Bosnia and Herzegovina: current status. *Coll Antropol*. 2006;30(1):41.
37. Mesic E. Early detection of Balkan endemic nephropathy in Bosanska Posavina. *Bosn J Basic Med Sci*. 2010;10 Suppl 1:S83-90.
38. Mesic E, Resic H, Halilbasic A, Komljenovic I, Vasilj M, Vucicevic L, et al. Renal replacement therapy in Bosnia and Herzegovina: report of the Society of Nephrology, Dialysis and Transplantation of Bosnia and Herzegovina. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(4):661-3.

39. Mesic E, Lukic L, Dolenc L, Petkovic N, Stipancic Z, Resic H, et al. [Balkan endemic nephropathy in Bosnia and Herzegovina--renal registry report]. *Med Arh*. 2006;60(4):240-2.
40. Danilovic V, Djuricic M, Mokranjac M, Stojimirovic B, Zivojinovic J, Stojakovic P. [Familial kidney diseases in the village Sopic caused by chronic lead poisoning]. *Srp Arh Celok Lek*. 1957;85(10):1115-25.
41. Naumović T, Stamenković M, Joksimović L, Velimirović DI, Nis, 1983. Eds. S . . . 1983: . editors. Frequency on Endemic Nephropathy and Tumors of the Urothelium in the Kolubara region. Proceedings of the 5th Symposium on Endemic (Balkan) nephropathy; 1983; Nis: University Press.
42. Danilović V, Velimirović D, Naumović T. Endemic nephropathy in the Lazarevac community. In: Puchlev A, Dinev I, Milev B, Doichinov D, editors. *Endemic Nephropathy, Proceedings of the 2nd International Symposium on Endemic Nephropathy*. Sophia, Bulgaria: Bulgarian Academy of Sciences Press; 1972. p. 281–3.
43. Bukvic D, Jankovic S, Arsenovic A, Djukanovic L. Balkan endemic nephropathy is still present in the Kolubara region, Serbia. *Ren Fail*. 2005;27(5):565-9.
44. Bukvic D, Maric I, Arsenovic A, Jankovic S, Djukanovic L. Prevalence of Balkan endemic nephropathy has not changed since 1971 in the Kolubara region in Serbia. *Kidney Blood Press Res*. 2007;30(2):117-23.
45. Jankovic S, Bukvic D, Marinkovic J, Jankovic J, Maric I, Djukanovic L. Trends in incidence and prevalence of Balkan endemic nephropathy in the three most affected villages in Serbia over a 36-year period. *Ren Fail*. 2013;35(4):509-13.
46. Nikolić J, Milenković D. Teritorial distribution of endemic nephropathy and tumors of pyelum and ureter in the Lazarevac region. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Current research in endemic (Balkan) nephropathy Proceedings of the 5th Symposium on Endemic (Balkan) nephropathy*. Nis: University Press; 1983. p. 238 - 44.
47. Bukvić D. Odnos endemske nefropatije i malignih tumora gornjeg urotela. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu; 1996.
48. Nikolić J. Epidemijska nefropatija i tumori gornjeg urotela. Stefanović V, Nešić V, Đokić M, editors. Beograd: Izdavačko preduzeće Beograd; 2006.
49. Nikolić J, Đokić M, Crnomarković D, Marinković J. Upper urothelial tumors and Balkan nephropathy- dose responsible diseases. *J Facta Universitas, Series: Medicine and Biology*. 2002;9:114-8.
50. Robles NR, Calero R, Rengel M, Valderrabano F. Hemodialysis and cancer. *Nephron*. 1990;54(3):271-2.
51. Strahinjić S, Stefanović V, Vukušić Z. Endemic (Balkan) Nephropathy rate of frequency and distribution around the river Južna Morava and lower reaches of its tributaries. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Current Research in Endemic (Balkan) Nephropathy, Proc 5th symp on Endemic (Balkan) Nephropathy*. Niš: University Press; 1983. p. 293-301.
52. Čukuranović R, Vasovic L, Pavlović S, Vlajkovic S, Dakovic-Bjelakovic M, Jovanovic I, et al. Four decades of Endemic nephropathy in Mezgraja. *Acta Medica Medianae*. 2003;3:27-9.
53. Raičević R, Vuksanović P, Suša S, Čukuranović R, Mitić B. Terensko ispitivanje Donje Trnave kao endemskog žarišta posle 22 godine. *Acta Medica Medianae*. 2005;4:13-5.
54. Cukuranovic R, Petrovic B, Cukuranovic Z, Stefanovic V. Balkan endemic nephropathy: a decreasing incidence of the disease. *Pathol Biol (Paris)*. 2000;48(6):558-61.
55. Čukuranović R, Petrović B, Marković N, Stefanović N, Stefanović V. Balkan endemic nephropathy and upper urothelial cancer in the South Morava river basin. *Facta Universitatis*. 2002;9(1):104-7.

56. Markovic N, Ignjatovic I, Cukuranovic R, Petrovic B, Kocic B, Stefanovic V. Decreasing incidence of urothelial cancer in a Balkan endemic nephropathy region in Serbia. A surgery based study from 1969 to 1998. *Pathol Biol (Paris)*. 2005;53(1):26-9.
57. Krčmarević J, Stašević Z, Stolić R, Karaferić A, Mihajlović D, Krušić V, et al. Epidemiološke karakteristike i učestalost terminalne bubrežne insuficijencije i hemodijalize kod bolesnika sa područja balkanske endemske nefropatije (Vitina i okolica). VI Kongres Nefrologa Jugoslavije; Beograd: Knjiga sažetaka; 1998. p. 38.
58. Šubarić Gorgieva GUu, Niš, 2007: 71-75. „Vitinska nefropatija“-neke dileme o učestalosti i kliničkim karakteristikama balkanske endemske nefropatije. In: Strahinjić S, Čukuranović R, Pavlović N, Babić R, editors. *Balkanska endemska nefropatija 50 godina naučno istraživačkog rada 1957-2007*. Niš: Medicinski fakultet; 2007. p. 71-5.
59. Gluhovschi G, Margineanu F, Velciov S, Gluhovschi C, Bob F, Petrica L, et al. Fifty years of Balkan endemic nephropathy in Romania: some aspects of the endemic focus in the Mehedinti county. *Clin Nephrol*. 2011;75(1):34-48.
60. Bruckner I, Nicifor F, Rusu G. Endemic nephropathy in Romania. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Proceedings of the 4th Symposium of Endemic (Balkan) Nephropathy*. Niš: Institute of Nephrology and Hemodialysis; 1979. p. 11-4.
61. Gluhovschi G, Margineanu F, Kaycsa A, Velciov S, Gluhovschi C, Bob F, et al. Therapeutic remedies based on *Aristolochia clematitis* in the main foci of Balkan endemic nephropathy in Romania. *Nephron Clin Pract*. 2010;116(1):c36-46.
62. Chernozemsky IN. Balkan endemic nephropathy and the associated tumours of the urinary system: a summary of epidemiological features in Bulgaria. *IARC Sci Publ*. 1991(115):3-4.
63. Dimitrov PS, Simeonov VA, Stein AD. Balkan endemic nephropathy in Vratza, Bulgaria, 1964-1987: an epidemiologic analysis of population-based disease registers. *Eur J Epidemiol*. 2001;17(9):847-53.
64. Tsvetan D. Balkan endemic nephropathy in Bulgaria. *Facta universitatis*. 2002;9:7-14.
65. Nikolov I, Chernozemsky I, Petkova-Bocharova T, Vrabcheva T, Stojchev I, Bankov B, et al. Review of the cooperative studies of the national oncological centre in Bulgaria on Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours (1991-2001). *Facta Universitatis*. 2002;9:119-22.
66. Voice T, Long D, Radovanović Z, Atkins J, McElmurry S, Niagolova N, et al. Critical evaluation of environmental exposure agents suspected in the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Coll Antropol*. 2006;30(1):45.
67. Bui-Klimke T, Wu F. Evaluating weight of evidence in the mystery of balkan endemic nephropathy. *Risk Anal*. 2014;34(9):1688-705.
68. Voice TC, Long DT, Radovanovic Z, Atkins JL, McElmurry SP, Niagolova ND, et al. Critical evaluation of environmental exposure agents suspected in the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Int J Occup Environ Health*. 2006;12(4):369-76.
69. Krogh P. Mycotoxic porcine nephropathy: A possible model for Balkan endemic nephropathy. In: Puhlev A, editor. *Endemic Nephropathy*. Sofia: Publishing House of the Bulgarian Academy of Science; 1974. p. 266-70.
70. Huff JE. Carcinogenicity of ochratoxin A in experimental animals. *IARC Sci Publ*. 1991(115):229-44.
71. Petkova-Bocharova T, Castegnaro M, Michelon J, Maru V. Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *IARC Sci Publ*. 1991(115):83-7.
72. Radic B, Fuchs R, Peraica M, Lucic A. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol Lett*. 1997;91(2):105-9.
73. Petkova-Bocharova T, Castegnaro M, Pfohl-Leskowicz A, Garren L, Grosso F, Nikolov I, et al. Analysis of ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: A one-month follow-up study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;52(8):2404-10.

74. Mally A, Zepnik H, Wanek P, Eder E, Dingley K, Ihmels H, et al. Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. *Chem Res Toxicol*. 2004;17(2):234-42.
75. Turesky RJ. Perspective: ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. *Chem Res Toxicol*. 2005;18(7):1082-90.
76. Pfohl-Leszkowicz A, Tozlovanu M, Manderville R, Peraica M, Castegnaro M, Stefanovic V. New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(9):1131-46.
77. Clark HA, Snedeker SM. Ochratoxin a: its cancer risk and potential for exposure. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2006;9(3):265-96.
78. Ozcelik N, Kosar A, Soysal D. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicol Lett*. 2001;121(1):9-13.
79. Breitholtz-Emanuelsson A, Minervini F, Hult K, Visconti A. Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders. *Nat Toxins*. 1994;2(6):366-70.
80. Hassen W, Abid S, Achour A, Creppy E, Bacha H. Ochratoxin A and beta2-microglobulinuria in healthy individuals and in chronic interstitial nephropathy patients in the centre of Tunisia: a hot spot of Ochratoxin A exposure. *Toxicology*. 2004;199(2-3):185-93.
81. members Ep. 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 Journal*. 2006;365:1-56.
82. Kumar V, Poonam, Prasad AK, Parmar VS. Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities. *Nat Prod Rep*. 2003;20(6):565-83.
83. Cosyns JP. Aristolochic acid and 'Chinese herbs nephropathy': a review of the evidence to date. *Drug Saf*. 2003;26(1):33-48.
84. Grollman A, Scarborough J, Jelaković B. Aristolochic Acid Nephropathy: An Environmental and Iatrogenic Disease. *Advances in Molecular Toxicology*. 3: Elsevier B.V; 2009. p. 211-22.
85. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet*. 1993;341(8842):387-91.
86. Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P, Vanherweghem JL. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet*. 1994;343(8890):174.
87. Vanherweghem J, Debelle F, Muniz-Martinez M, Nortier J. Aristolochic acid nephropathy after Chinese herb remedies. In: De Broe M, Porter G, Bennett W, Verpoeten G, editors. *Clinical Nephrotoxins*. 2 ed. Dordrecht: Kluwer; 2003. p. 579-603.
88. Dawson W. Birthwort: a study of the progress of medical botany through twenty-two centuries. *Pharm J Pharmacist*. 1927:396-7.
89. Debelle FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney Int*. 2008;74(2):158-69.
90. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, De Plaen JF, Ferluga D, van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int*. 1994;45(6):1680-8.
91. Depierreux M, Van Damme B, Vanden Houte K, Vanherweghem JL. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *Am J Kidney Dis*. 1994;24(2):172-80.
92. Kabanda A, Jadoul M, Lauwerys R, Bernard A, van Ypersele de Strihou C. Low molecular weight proteinuria in Chinese herbs nephropathy. *Kidney Int*. 1995;48(5):1571-6.

93. Reginster F, Jadoul M, van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12(1):81-6.
94. Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med*. 2000;342(23):1686-92.
95. Nortier JL, Schmeiser HH, Muniz Martinez MC, Arlt VM, Vervaet C, Garbar CH, 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):426-8.
96. Karanovic S, Lela IV, Jelakovic B, Dickman KG, Peic AK, Dittrich D, et al. Variation in presentation and presence of DNA adducts and p53 mutations in patients with endemic nephropathy--an environmental form of the aristolochic acid nephropathy. *Kidney Blood Press Res*. 2013;37(1):1-8.
97. Schmeiser HH, Bieler CA, Wiessler M, van Ypersele de Strihou C, Cosyns JP. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Res*. 1996;56(9):2025-8.
98. Arlt VM, Alunni-Perret V, Quatrehomme G, Ohayon P, Albano L, Gaid H, 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):977-80.
99. Lord GM, Cook T, Arlt VM, Schmeiser HH, Williams G, Pusey CD. Urothelial malignant disease and Chinese herbal nephropathy. *Lancet*. 2001;358(9292):1515-6.
100. Schmeiser HH, Nortier JL, Singh R, da Costa GG, Sennesael J, Cassuto-Viguier E, 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):502-7.
101. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, Wese FX, van Ypersele de Strihou C. Urothelial lesions in Chinese-herb nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 1999;33(6):1011-7.
102. Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis*. 2002;17(4):265-77.
103. Lord GM, Hollstein M, Arlt VM, Roufosse C, Pusey CD, Cook T, et al. DNA adducts and p53 mutations in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(4):e11-7.
104. Sidorenko VS, Yeo JE, Bonala RR, Johnson F, Scharer OD, Grollman AP. Lack of recognition by global-genome nucleotide excision repair accounts for the high mutagenicity and persistence of aristolactam-DNA adducts. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(6):2494-505.
105. Moriya M, Slade N, Brdar B, Medverec Z, Tomic K, Jelakovic B, et al. TP53 Mutational signature for aristolochic acid: an environmental carcinogen. *Int J Cancer*. 2011;129(6):1532-6.
106. Slade N, Moll UM, Brdar B, Zoric A, Jelakovic B. p53 mutations as fingerprints for aristolochic acid: an environmental carcinogen in endemic (Balkan) nephropathy. *Mutat Res*. 2009;663(1-2):1-6.
107. Ivic M. [Etiology of endemic nephropathy]. *Lijec Vjesn*. 1969;91(12):1273-81.
108. Hranjec T, Kovac A, Kos J, Mao W, Chen JJ, Grollman AP, et al. Endemic nephropathy: the case for chronic poisoning by aristolochia. *Croat Med J*. 2005;46(1):116-25.
109. Long DT, Voice TC. Role of exposure analysis in solving the mystery of Balkan endemic nephropathy. *Croat Med J*. 2007;48(3):300-11.
110. Dumić A. Horse poisoning with *Aristolochia clematitis* [in Croatian]. *Izdanje vojnotehničkog glasnika*. 1954:3-45.
111. Martinčić M. Toxische einwirkungen der *Aristolochia clematitis* auf die Niere des Pferdes. *Veterinarski Archiv*. 1958;27(51-59).

112. Martinez MC, Nortier J, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. Progression rate of Chinese herb nephropathy: impact of Aristolochia fangchi ingested dose. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(3):408-12.
113. Hsieh SC, Lin IH, Tseng WL, Lee CH, Wang JD. Prescription profile of potentially aristolochic acid containing Chinese herbal products: an analysis of National Health Insurance data in Taiwan between 1997 and 2003. *Chin Med*. 2008;3:13.
114. Ivkovic V, Karanovic S, Fistrek Prlic M, Misic M, Kos J, Juric D, et al. Is herbal tea consumption a factor in endemic nephropathy? *Eur J Epidemiol*. 2014;29(3):221-4.
115. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U, et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12129-34.
116. Feldmeyer N, Schmeiser HH, Muehlbauer KR, Belharazem D, Knyazev Y, Nedelko T, et al. Further studies with a cell immortalization assay to investigate the mutation signature of aristolochic acid in human p53 sequences. *Mutat Res*. 2006;608(2):163-8.
117. Liu Z, Hergenhausen 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):2963-8.
118. Yun BH, Rosenquist TA, Nikolic J, Dragicevic D, Tomic K, Jelakovic B, et al. Human formalin-fixed paraffin-embedded tissues: an untapped specimen for biomonitoring of carcinogen DNA adducts by mass spectrometry. *Anal Chem*. 2013;85(9):4251-8.
119. Jelakovic B, Karanovic S, Vukovic-Lela I, Miller F, Edwards KL, Nikolic J, et al. Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney Int*. 2012;81(6):559-67.
120. Schmeiser HH, Kucab JE, Arlt VM, Phillips DH, Hollstein M, Gluhovschi G, et al. Evidence of exposure to aristolochic acid in patients with urothelial cancer from a Balkan endemic nephropathy region of Romania. *Environ Mol Mutagen*. 2012;53(8):636-41.
121. De Broe ME. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney Int*. 2012;81(6):513-5.
122. Vanherweghem JL. Aristolochia sp and chronic interstitial nephropathies in Indians. *Lancet*. 1997;349(9062):1399.
123. Chen CH, Dickman KG, Moriya M, Zavadil J, Sidorenko VS, Edwards KL, et al. Aristolochic acid-associated urothelial cancer in Taiwan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(21):8241-6.
124. Boršo G. Characteristics of clinical data on endemic nephropathy. In: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, editors. *Endemic nephropathy in Croatia*. Zagreb: Academica Croatica Scientiarum Medicarum; 1996. p. 73-7.
125. Radonic M, Radošević Z. Clinical features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol*. 1992;30(3):189-92.
126. Teskera T, Leko N, Čala S. Erythropoietin requirement in endemic nephropathy. *Coll Antropol*. 2006;30:50.
127. Lukic L, Mitrovic D, Kovacevic S, Stanisic M, Pelemis S. [Higher dose of erythropoietin for anemia correction in balkan endemic nephropathy patients]. *Srp Arh Celok Lek*. 2012;140(7-8):456-61.
128. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int*. 1993;44(5):1149-62.
129. Ratcliffe PJ. Molecular biology of erythropoietin. *Kidney Int*. 1993;44(4):887-904.

130. Loya F, Yang Y, Lin H, Goldwasser E, Albitar M. Transgenic mice carrying the erythropoietin gene promoter linked to lacZ express the reporter in proximal convoluted tubule cells after hypoxia. *Blood*. 1994;84(6):1831-6.
131. Miletić-Medved M, Jelaković B, Bistrovic D, Leko N, Maric Z. [Epidemiologic characteristics of endemic nephropathy in Croatia in 2005]. *Acta Med Croatica*. 2007;61(2):141-8.
132. Arsenović A, Bukvić D, Trbojević S, Maric I, Djukanović L. Detection of renal dysfunctions in family members of patients with Balkan endemic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2005;25(1):50-4.
133. Dimitrov P, Tsoleva S, Georgieva R, Bozhilova D, Simeonov V, Bonev A, et al. Clinical markers in adult offspring of families with and without Balkan Endemic Nephropathy. *Kidney Int*. 2006;69(4):723-9.
134. Dika Z, Juras J, Kos J, Edwards K, Fistrek M, Premuzić V, et al. Prevalence, treatment and control of hypertension in a Croatian endemic nephropathy area. *Kidney Blood Press Res*. 2012;35(6):678-86.
135. Cukuranović R, Savić V, Stefanović N, Stefanović V. Progression of kidney damage in Balkan endemic nephropathy: a 15-year follow-up of patients with kidney biopsy examination. *Ren Fail*. 2005;27(6):701-6.
136. Velimirović D. Contribution to the study of clinical course of endemic nephropathy. Beograd: Sveučilište u Beogradu; 1984.
137. Bukvić D, Janković S, Dukanović L, Marinković J. Survival of Balkan endemic nephropathy patients. *Nephron*. 2000;86(4):463-6.
138. Pleština S. Diagnosis and treatment of patients with upper urothelial cancers. *Coll Antropol*. 2006;30:64.
139. Petković S, Mutavdžić, Petronić V, Marković V. [Tumors of the kidney pelvis and ureter. Clinical and etiologic research]. *J Urol Nephrol (Paris)*. 1971;77(6):429-39.
140. Djokić M, Hadži-Djokić J, Nikolić J, Dragicević D. [Quality of life in patients with tumors of the upper urothelium and indications for conservative surgery]. *Acta Chir Iugosl*. 1999;46(1 Suppl):23-6.
141. Milojević B, Djokić M, Sipetić-Grujić S, Milenković-Petronić D, Vuksanović A, Bumbasirević U, et al. Upper urinary tract transitional cell carcinoma: location is not correlated with prognosis. *BJU Int*. 2012;109(7):1037-42.
142. Petković SD. Epidemiology and treatment of renal pelvic and ureteral tumors. *J Urol*. 1975;114(6):858-65.
143. Dragicević D, Djokić M, Pekmezović T, Micic S, Hadži-Djokić J, Vuksanović A, et al. Survival of patients with transitional cell carcinoma of the ureter and renal pelvis in Balkan endemic nephropathy and non-endemic areas of Serbia. *BJU Int*. 2007;99(6):1357-62.
144. Janković Velicković L, Hattori T, Dolicanin Z, Visnjic M, Krstić M, Ilić I, et al. Upper urothelial carcinoma in Balkan endemic nephropathy and non-endemic regions: a comparative study of pathological features. *Pathol Res Pract*. 2009;205(2):89-96.
145. Glogovac S, Đorđević V, Tomin J, Živanov-Čurils J, Kostić S, Prokopović N, et al. Balkan endemic nephropathy and malignant urothelial tumors. *Acta Medica Medianae*. 2005;44(1):15-9.
146. Kovač-Peić A, Miletić-Medved M, Kos J, Pećin I, Barešić M, Leko N, et al. Carcinoma frequency in a Croatian endemic focus. *Coll Antropol*. 2006;30(69).
147. Leko N, Stipančić Ž, Teskera T, Vinković M, Baričić M, Miletić-Medved M, et al. Endemic nephropathy as a cause of end-stage renal disease in Croatian and Bosnian endemic areas. Do the focuses differ? *Coll Antropol*. 2006;30:53.
148. Cukuranović R, Jovanović I, Miljković S, Stefanović N, Vlajković S, Prokopović M, et al. Hemodialysis treatment in patients with Balkan endemic nephropathy: an epidemiological study. *Ren Fail*. 2007;29(7):805-10.

149. Vukelic M, Sostaric B, Belicza M. Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol.* 1992;30(3):193-200.
150. Ferluga D, Hvala A, Vizjak A, Trnacevic S, Halilbasic A. Renal function, protein excretion, and pathology of Balkan endemic nephropathy. III. Light and electron microscopic studies. *Kidney Int Suppl.* 1991;34:S57-67.
151. Ferluga D. Balkan endemic nephropathy. In: Vizjak A, Ferluga D, Bussolati G, editors. *Update in Pathology, Proceedings of the Nineteenth European Congress of Pathology.* Ljubljana, Slovenia: University of Ljubljana; 2003. p. 244-7.
152. Stefanović V, Cosyns J. Balkan Nephropathy. In: Davison A, Cameron J, Grünfeld J, Ponticelli C, Ritz E, Winearls C, et al., editors. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology.* New York: Oxford University Press; 2005. p. 1095-101.
153. Vukelic M, Sostaric B, Fuchs R. Some pathomorphological features of Balkan endemic nephropathy in Croatia. *IARC Sci Publ.* 1991(115):37-42.
154. Dimitrov T. Clinical and morphologic stages in Balkan endemic nephropathy. *Vutr Boles.* 1983;22(6):69-72.
155. Nortier JL, Vanherweghem JL. Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *Toxicology.* 2002;181-182:577-80.
156. Debelle FD, Nortier JL, De Prez EG, Garbar CH, Vienne AR, Salmon IJ, et al. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(2):431-6.
157. Ferluga D, Vizjak A, Hvala A, Vodovnik A, Trnačević S, Halilbašić A. Kidney biopsy study of early Balkan endemic nephropathy. In: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, editors. *Endemic Nephropathy in Croatia.* Zagreb: Academia Croatica Scientiarum Medicarum; 1996. p. 43-72.
158. Belicza M, Dzombeta T, Stanic G, Tomic K, Lenicek T, Peric-Balja M, et al. Higher apoptotic cell rate in Balkan endemic nephropathy--stereologic analysis. *Acta Clin Croat.* 2011;50(1):45-50.
159. Cukuranovic R, Savic V, Dojcinov D, Stefanovic V. Immunohistochemical localization of laminin in renal lesions of Balkan nephropathy. *Nephron.* 1995;70(4):504-5.
160. Stefanovic V, Cukuranovic R, Dojcinov D, Savic V. Coexpression of vimentin and cytokeratin in damaged tubular epithelia of kidney in Balkan nephropathy. *Nephron.* 1996;72(1):119-20.
161. Hvala A, Ferluga D, Rott T, Kobenter T, Koselj-Kajtna M, Trnacevic S. Peritubular capillary changes in alport syndrome, diabetic glomerulopathy, Balkan endemic nephropathy and hemorrhagic fever with renal syndrome. *Ultrastruct Pathol.* 2005;29(6):451-9.
162. Delahunt B, Amin M, Hofstädter F, Hartmann A, Tyczynski J. Tumours of the renal pelvis and ureter. *World Health Organisation classification of tumors Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs.* Lyon, France: IARC Press; 2004. p. 146-50.
163. Krušlin B. Pathomorphological characteristics and classification of upper urothelial cancers. *Coll Antropol.* 2006;30:62.
164. Urological Tumours. Renal Pelvis and Ureter. In: Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours: Wiley-Blackwell;* 2009. p. 258-61.
165. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. Urological Tumours. Renal Pelvis and Ureter. In: Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours: Wiley-Blackwell;* 2009. p. 258-61.
166. Čvoriscec D. Early diagnosis of endemic nephropathy. *Clin Chim Acta.* 2000;297(1-2):85-91.
167. Čvorišćec D, Stavljenić-Rukavina A. Laboratory diagnosis of endemic nephropathy. In: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, editors. *Endemic*

- nephropathy in Croatia. Zagreb: Academia Croatica scientiarum medicarum; 1996. p. 77-87.
168. Itoh Y, Cooper EH, Stavlienic A, Cvoriscec D. Urinary alpha 1 microglobulin levels in surveys of Balkan endemic nephropathy. *Biomed Pharmacother.* 1986;40(9):341-4.
 169. Hall PW, Vasiljevic M. Beta 2 -microglobulin excretion as an index of renal tubular disorders with special reference to endemic Balkan nephropathy. *J Lab Clin Med.* 1973;81(6):897-904.
 170. Hall PW, 3rd, Piscator M, Vasiljevic M, Popovic N. Renal function studies in individuals with the tubular proteinuria of endemic Balkan nephropathy. *Q J Med.* 1972;41(164):385-93.
 171. Kido T, Honda R, Yamada Y, Tsuritani I, Ishizaki M, Nogawa K. alpha 1-Microglobulin determination in urine for the early detection of renal tubular dysfunctions caused by exposure to cadmium. *Toxicol Lett.* 1985;24(2-3):195-201.
 172. Chia KS, Tan AL, Chia SE, Ong CN, Jeyaratnam J. Renal tubular function of cadmium exposed workers. *Ann Acad Med Singapore.* 1992;21(6):756-9.
 173. Ikeda M, Ezaki T, Tsukahara T, Moriguchi J, Furuki K, Fukui Y, et al. Reproducibility of urinary cadmium, alpha1-microglobulin, and beta2-microglobulin levels in health screening of the general population. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2005;48(1):135-40.
 174. Ikeda M, Ezaki T, Tsukahara T, Moriguchi J, Furuki K, Fukui Y, et al. Critical evaluation of alpha1- and beta2-microglobulins in urine as markers of cadmium-induced tubular dysfunction. *Biometals.* 2004;17(5):539-41.
 175. Radonic M. beta2-Microglobulin in Balkan endemic nephropathy. *Pathol Biol (Paris).* 1978;26(6):317-20.
 176. Hrabar A, Aleraj B, Ceovic S, Cvoriscec D, Vacca C, Hall PW, 3rd. Beta 2-microglobulin studies in endemic Balkan nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 1991;34:S38-40.
 177. Hrabar A, Aleraj B, Ceovic S, Cvoriscec D, Vacca C, Hall PW, 3rd. A fifteen year cohort based evaluation of beta 2-microglobulin as an early sign of Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 1991;34:S41-3.
 178. Hall P. A review of the role of beta-2 microglobulin in investigation of Balkan nephropathy and papillary transitional cell tumors. *I Kongres nefrologa Jugoslavije; Beograd: Zbornik radova; 1981. p. 90-4.*
 179. Bautman V. Possible pathogenetic role of low-molecular-weight proteins in Balkan nephropathy. *Kidney Int.* 1991;40(34):89-92.
 180. Stefanovic V, Mitic-Zlatkovic M, Cukuranovic R, Miljkovic P, Pavlovic NM, Vlahovic P. Beta 2-microglobulin in patients with Balkan nephropathy and in healthy members of their families. *Kidney Int Suppl.* 1991;34:S21-6.
 181. Doitchinov D. Immunohistochemical studies in Balkan endemic nephropathy. *Proceeding of the 4th Symposium on Endemic (Balkan) nephropathy; Niš1979. p. 265.*
 182. Radonić M, Mikuličić V, Čeović S, Aleraj B, Hrabar A, Radošević Z, et al. Clearance of beta-2 microglobulin in endemic nephropathy. *Proceedings of the 4th Symposium on endemic (Balkan) nephropathy; Niš1979. p. 141-5.*
 183. Schardini G, Statiusvaneps L. Beta-2 microglobulin: its significance in the evaluation of renal function. *Kidney Int.* 1987;32:635-41.
 184. Hall PW, 3rd, Dammin GJ. Balkan nephropathy. *Nephron.* 1978;22(4-6):281-300.
 185. Kettner H. The Endemic Nephropathy of South-Eastern Europe. *Bull World Health Organ.* 1965;32:431-48.
 186. Donaldson MD, Chambers RE, Woolridge MW, Whicher JT. Stability of alpha 1-microglobulin, beta 2-microglobulin and retinol binding protein in urine. *Clin Chim Acta.* 1989;179(1):73-7.

187. Guder WG, Hofmann W. Clinical role of urinary low molecular weight proteins: their diagnostic and prognostic implications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2008;241:95-8.
188. Stefanovic V, Djukanovic L, Cukuranovic R, Bukvic D, Lezaic V, Maric I, et al. Beta2-microglobulin and alpha1-microglobulin as markers of Balkan endemic nephropathy, a worldwide disease. *Ren Fail.* 2011;33(2):176-83.
189. Ekstrom B, Peterson PA, Berggard I. A urinary and plasma alpha1-glycoprotein of low molecular weight: isolation and some properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975;65(4):1427-33.
190. Penders J, Delanghe JR. Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications. *Clin Chim Acta.* 2004;346(2):107-18.
191. Vincent C, Marceau M, Blangarin P, Bouic P, Madjar JJ, Revillard JP. Purification of alpha 1-microglobulin produced by human hepatoma cell lines. Biochemical characterization and comparison with alpha 1-microglobulin synthesized by human hepatocytes. *Eur J Biochem.* 1987;165(3):699-704.
192. Akerstrom B, Logdberg L, Berggard T, Osmark P, Lindqvist A. alpha(1)-Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482(1-2):172-84.
193. Grubb AO, Lopez C, Tejler L, Mendez E. Isolation of human complex-forming glycoprotein, heterogeneous in charge (protein HC), and its IgA complex from plasma. Physicochemical and immunochemical properties, normal plasma concentration. *J Biol Chem.* 1983;258(23):14698-707.
194. Berggard T, Cohen A, Persson P, Lindqvist A, Cedervall T, Silow M, et al. Alpha1-microglobulin chromophores are located to three lysine residues semiburied in the lipocalin pocket and associated with a novel lipophilic compound. *Protein Sci.* 1999;8(12):2611-20.
195. Itoh Y, Enomoto H, Takagi K, Kawai T, Yamanaka T. Human alpha 1-microglobulin in various hepatic disorders. *Digestion.* 1983;27(2):75-80.
196. Takagi K, Itoh Y, Enomoto H, Koyamaishi Y, Maeda K, Kawai T. A comparative study of serum alpha 1-microglobulin and beta 2-microglobulin levels in cancerous and other diseases. *Clin Chim Acta.* 1980;108(2):277-83.
197. Vincent C, Kew MC, Bouic P, Flacher M, Revillard JP. Alpha 1-microglobulin (HC protein) in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 1989;59(3):415-6.
198. Grubb A. Diagnostic value of analysis of cystatin C and protein HC in biological fluids. *Clin Nephrol.* 1992;38 Suppl 1:S20-7.
199. Kusano E, Suzuki M, Asano Y, Itoh Y, Takagi K, Kawai T. Human alpha 1-microglobulin and its relationship to renal function. *Nephron.* 1985;41(4):320-4.
200. Itoh Y, Enomoto H, Takagi K, Obayashi T, Kawai T. Human alpha 1-microglobulin levels in neurological disorders. *Eur Neurol.* 1983;22(1):1-6.
201. Bouic P, Vincent C, Revillard JP. Localization of alpha 1-microglobulin (HC protein) in normal human tissues: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Histochem J.* 1984;16(12):1311-24.
202. Verroust PJ, Birn H, Nielsen R, Kozyraki R, Christensen EI. The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. *Kidney Int.* 2002;62(3):745-56.
203. Gosling P. Proteinuria. In: Marshall W, Bangert S, editors. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.* 2 ed: Elsevier; 2008. p. 156–73.
204. Takagi T, Takagi K, Kawai T. Complete amino acid sequence of human alpha 1-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;98(4):997-1001.
205. Bergon E, Granados R, Fernandez-Segoviano P, Miravalles E, Bergon M. Classification of renal proteinuria: a simple algorithm. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(11):1143-50.
206. Bakker AJ. Detection of microalbuminuria. Receiver operating characteristic curve analysis favors albumin-to-creatinine ratio over albumin concentration. *Diabetes Care.* 1999;22(2):307-13.

207. Shidham G, Hebert LA. Timed urine collections are not needed to measure urine protein excretion in clinical practice. *Am J Kidney Dis.* 2006;47(1):8-14.
208. Mattix HJ, Hsu CY, Shaykevich S, Curhan G. Use of the albumin/creatinine ratio to detect microalbuminuria: implications of sex and race. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(4):1034-9.
209. Carter CE, Gansevoort RT, Scheven L, Heerspink HJ, Shlipak MG, de Jong PE, et al. Influence of urine creatinine on the relationship between the albumin-to-creatinine ratio and cardiovascular events. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(4):595-603.
210. Members KB. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney Int.* 2013;3:19-62.
211. Andersson L, Haraldsson B, Johansson C, Barregard L. Methodological issues on the use of urinary alpha-1-microglobuline in epidemiological studies. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(4):1252-6.
212. Payn MM, Webb MC, Lawrence D, Lamb EJ. Alpha1-microglobulin is stable in human urine ex vivo. *Clin Chem.* 2002;48(7):1136-8.
213. Yu H, Yanagisawa Y, Forbes MA, Cooper EH, Crockson RA, MacLennan IC. Alpha-1-microglobulin: an indicator protein for renal tubular function. *J Clin Pathol.* 1983;36(3):253-9.
214. Weber MH, Verwiebe R. Alpha 1-microglobulin (protein HC): features of a promising indicator of proximal tubular dysfunction. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1992;30(10):683-91.
215. Endo G, Konishi Y, Kiyota A, Horiguchi S. Urinary alpha 1 microglobulin in lead workers. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1993;50(5):744-9.
216. Vyssoulis GP, Tousoulis D, Antoniadis C, Dimitrakopoulos S, Zervoudaki A, Stefanadis C. Alpha-1 microglobulin as a new inflammatory marker in newly diagnosed hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2007;20(9):1016-21.
217. Marczewski KT, Dziemidok P, Grzywna R, Krawczyk W. Microalbuminuria or micro-alpha-1-microglobulinuria: which one is better predictor of the development of the secondary nephropathy? *Clin Nephrol.* 1996;45(2):136-7.
218. Pfeleiderer S, Zimmerhackl LB, Kinne R, Manz F, Schuler G, Brandis M. Renal proximal and distal tubular function is attenuated in diabetes mellitus type 1 as determined by the renal excretion of alpha 1-microglobulin and Tamm-Horsfall protein. *Clin Investig.* 1993;71(12):972-7.
219. Brocco E, Fioretto P, Mauer M, Saller A, Carraro A, Frigato F, et al. Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Kidney Int Suppl.* 1997;63:S40-4.
220. Walton C, Bodansky HJ, Wales JK, Forbes MA, Cooper EH. Tubular dysfunction and microalbuminuria in insulin dependent diabetes. *Arch Dis Child.* 1988;63(3):244-9.
221. Marczewski K, Krawczyk W, Rozyc P, Raszewski G, Grzywna R, Klimek K. Day/night ratio of microproteinuria and blood pressure rhythm in type II diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996;33(3):169-72.
222. Corso A, Zappasodi P, Pascutto C, Bosoni T, Mangiacavalli S, Lorenzi A, et al. Urinary proteins in multiple myeloma: correlation with clinical parameters and diagnostic implications. *Ann Hematol.* 2003;82(8):487-91.
223. Dika Ž. Evaluacija dijagnostičkih kriterija za endemsku nefropatiju (disertacija). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2012.
224. Jelakovic B, Nikolic J, Radovanovic Z, Nortier J, Cosyns JP, Grollman AP, et al. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(11):2020-7.
225. Goren MP, Li JT. The Coomassie Brilliant Blue method underestimates drug-induced tubular proteinuria. *Clin Chem.* 1986;32(2):386-8.

226. Honkanen E, Pettersson T, Teppo AM. Urinary alpha 1- and beta 2-microglobulin in light chain proteinuria. *Clin Nephrol.* 1995;44(1):22-7.
227. Djukanovic L, Djordjevic V, Lezaic V, Cukuranovic R, Maric I, Bukvic D, et al. Urinary protein patterns in patients with Balkan endemic nephropathy. *Int Urol Nephrol.* 2013;45(6):1661-9.
228. Stefanovic V, Cukuranovic R, Mitic-Zlatkovic M, Hall PW. Increased urinary albumin excretion in children from families with Balkan nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2002;17(11):913-6.
229. Stavljenic-Rukavina A, Čvorišćec D, Radonić M, Čeović S. Evaluation of urinary enzyme patterns in Balkan endemic nephropathy. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Etiology of endemic (Balkan) nephropathy Proceedings of the 6th Symposium of Endemic (Balkan) Nephropathy.* Niš: University of Niš; 1987. p. 109-13.
230. Nortier JL, Deschodt-Lanckman MM, Simon S, Thielemans NO, de Prez EG, Depierreux MF, et al. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney Int.* 1997;51(1):288-93.
231. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-12.
232. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, Zhang YL, Beck GJ, Froissart M, et al. Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m². *Am J Kidney Dis.* 2010;56(3):486-95.
233. Wetzels JF, Kiemeny LA, Swinkels DW, Willems HL, den Heijer M. Age- and gender-specific reference values of estimated GFR in Caucasians: the Nijmegen Biomedical Study. *Kidney Int.* 2007;72(5):632-7.
234. Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.* 2011;80(1):17-28.
235. Danilović V. Diagnosis of endemic nephropathy. *Radovi XLVII AN BiH.* 1973;17(53-64).
236. Stefanović V. Diagnostic criteria for endemic (Balkan) nephropathy. In: Strahinjić S, Stefanović V, editors. *Current Research in Endemic (Balkan) Nephropathy.* Niš: University Press; 1983. p. 351.
237. Djukanovic L, Maric I, Marinkovic J, Ignjatovic S, Bukvic D. Evaluation of criteria for the diagnosis of Balkan endemic nephropathy. *Ren Fail.* 2007;29(5):607-14.
238. Cvitkovic A. *Međudjelovanje dijagnostičkih biljega endemske nefropatije (disertacija).* Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu; 2012.
239. Sonicki Z, Cvitkovic A, Edwards KL, Miletic-Medved M, Cvoriscec D, Babus V, et al. Visual assessment of endemic nephropathy markers relationship. *Stud Health Technol Inform.* 2009;150:836-40.
240. Djukanovic L, Marinkovic J, Maric I, Lezaic V, Dajak M, Petronic D, et al. Contribution to the definition of diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(12):3932-8.
241. Hanjansit K, Karmaus W, Dimitrov P, Zhang H, Burch J, Tzolova S, et al. The role of a parental history of Balkan endemic nephropathy in the occurrence of BEN: a prospective study. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2012;5:61-8.
242. Hanjansit K, Dimitrov P, Karmaus W, Batuman V, Simeonov V, Bonev A, et al. Reduced kidney size in adult offspring of Balkan endemic nephropathy patients and controls: a prospective study. *Am J Med Sci.* 2010;340(2):94-102.
243. Roupert M, Babjuk M, Comperat E, Zigeuner R, Sylvester R, Burger M, et al. European guidelines on upper tract urothelial carcinomas: 2013 update. *Eur Urol.* 2013;63(6):1059-71.

244. Hrabar A, Aleraj B. Na čemu se osniva hipoteza da je endemska nefropatija bolest prirodnog žarišta. *Med Vjes.* 1988;20:67-72.
245. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999;341(23):1725-30.
246. Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Berling DP, Jiang K. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. *JAMA.* 1993;270(11):1339-43.
247. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van Der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(11):2135-41.
248. Petronic VJ, Bukurov NS, Djokic MR, Milenkovic DZ, Vuksanovic AM, Avramovic AD, et al. Balkan endemic nephropathy and papillary transitional cell tumors of the renal pelvis and ureters. *Kidney Int Suppl.* 1991;34:S77-9.
249. Yang TC, Shu KH, Cheng CH, Wu MJ, Lian JD. Malignancy following renal transplantation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* 1998;61(5):281-8.
250. Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, Stewart JH, Bucciante G, Lowenfels AB, et al. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. *Lancet.* 1999;354(9173):93-9.
251. Basic-Jukic N, Hrsak-Puljic I, Kes P, Bubic-Filipi L, Pasini J, Hudolin T, et al. Renal transplantation in patients with Balkan endemic nephropathy. *Transplant Proc.* 2007;39(5):1432-5.
252. Touraraine J, Malik M, Stefanovic V. Lack of recurrence of of endemic nephropathy over the first five years following renal transplantation. 8th Int Congr Nephrol; Athens1981. p. 487.
253. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2013;31(7):1281-357.
254. Association AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2008;31(1):555-60.
255. Guh JY, Chen HC, Tsai JF, Chuang LY. Herbal therapy is associated with the risk of CKD in adults not using analgesics in Taiwan. *Am J Kidney Dis.* 2007;49(5):626-33.
256. Zhang J, Zhang L, Wang W, Wang H, Group CNSoCKDW. Association between aristolochic acid and CKD: a cross-sectional survey in China. *Am J Kidney Dis.* 2013;61(6):918-22.
257. Hwang S, Tsai J, Chen H. Epidemiology, impact and preventive care of chronic kidney disease in Taiwan. *Nephrology (Carlton).* 2010;15(2):3-9.
258. Cirillo M, Del Giudice L, Bilancio G, Franzese MD, Chiricone D, De Santo NG. [Early detection of chronic kidney disease: epidemiological data on renal dysfunction]. *G Ital Nefrol.* 2008;25(6):690-3.
259. Hallan SI, Coresh J, Astor BC, Asberg A, Powe NR, Romundstad S, et al. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(8):2275-84.
260. Nitsch D, Felber Dietrich D, von Eckardstein A, Gaspoz JM, Downs SH, Leuenberger P, et al. Prevalence of renal impairment and its association with cardiovascular risk factors in a general population: results of the Swiss SAPALDIA study. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(4):935-44.
261. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F, Group ES. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia.* 2010;30(1):78-86.

262. Süleymanlar G, Utaş C, Arinsoy T, Ateş K, Altun B, Altiparmak MR, et al. A population-based survey of Chronic RENal Disease In Turkey--the CREDIT study. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(6):1862-71.
263. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-305.
264. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med*. 2004;164(6):659-63.
265. Bukvic D, Jankovic S, Maric I, Stosovic M, Arsenovic A, Djukanovic L. Today Balkan endemic nephropathy is a disease of the elderly with a good prognosis. *Clin Nephrol*. 2009;72(2):105-13.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1983. godine u Splitu gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Nakon mature klasičnog programa u 1.gimnaziji 2002. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje sam diplomirala 2008. godine. Obavezni pripravnički staž odradila sam u Kliničkoj bolnici „Sveti Duh“ u Zagrebu nakon čega sam 2009. godine položila državni ispit. Od rujna 2009. godine radim kao znanstveni novak–asistent Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na istraživačkom projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta „Endemska nefropatija–etiopatogeneza, epidemiologija i dijagnostika“ i projekta Hrvatske zaklade za znanost „Molekularno profiliranje i proteomika karcinoma urotela“ prof.dr.sc. Bojana Jelakovića. Znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2009.godine. U prosincu 2011. godine započela sam specijalizaciju iz nefrologije. Autorica i koautorica sam deset znanstvenih radova koji se citiraju u Current Contents. Aktivno sam sudjelovala na više domaćih i međunarodnih kongresa. Udana sam i majka sina.