

# Evaluacija dijagnostičkih kriterija za endemsku nefropatiju

---

Dika, Živka

Doctoral thesis / Disertacija

2012

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:394178>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Dika, Živka (2012) *Evaluacija dijagnostičkih kriterija za endemsku nefropatiju*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1641>

University of Zagreb Medical School Repository

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

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Živka Dika**

**Evaluacija dijagnostičkih kriterija za endemsku  
nefropatiju**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2012**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Živka Dika**

**Evaluacija dijagnostičkih kriterija za endemsku  
nefropatiju**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2012**

Disertacija je izrađena u Zavodu za nefrologiju, hipertenziju i dijalizu i Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb te u Zavodu za eksperimentalnu nefrologiju u laboratoriju za eksperimentalnu hormonologiju Medicinskog fakulteta Slobodnog sveučilišta u Briselu u Belgiji.

Voditelj istraživanja: prof. dr. sc. Bojan Jelaković

# Sadržaj

## POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD	1
1.1 Epidemiološki podaci	2
1.2. Etiologija endemske nefropatije	3
1.3. Klinička slika i tijek bolesti	6
1.4. Patohistološki nalaz	7
1.5. Dijagnostički kriteriji za endemsku nefropatiju	8
1.6. Laboratorijske značajke endemske nefropatije	9
1.6.1. Tubularna proteinurija i enzimurija	9
1.6.2. Procjena bubrežne funkcije u endemskoj nefropatiji	11
1.7. TGF $\beta$ i bubrežne bolesti	12
1.7.1. Osnovna obilježja TGF $\beta$	12
1.7.2. TGF $\beta$ u bubrežnim bolestima	14
1.7.2.1 TGF $\beta$ u nefropatiji aristolohične kiseline	18
1.8 Svrha rada	18
2. HIPOTEZE I CILJEVI RADA	20
2.1. Hipoteze	21
2.2. Ciljevi istraživanja	22
3. ISPITANICI I METODE	23
3.1. Ispitanici	24
3.2. Metode	25
3.3. Statistička obrada	27
4. REZULTATI	29
5. RASPRAVA	81
6. ZAKLJUČAK	91
7. SAŽETAK	93
8. SUMMARY	95
9. POPIS LITERATURE	98
10. ŽIVOTOPIS	113

## POPIS OZNAKA I KRATICA

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

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

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

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

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

ANOVA – analiza varijance (*engl. Analysis of variance*)

C – medijan (*engl. median*)

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

ECM – izvanstanični matriks (*engl. extracellular matrix*)

EMT – epitelino-mezenhimalna tranzicija (*engl. Epithelial–mesenchymal transition*)

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

F – vrijednost testa analize varijance

H – vrijednost Kruskal-Wallis testa (*engl. Kruskal-Wallis analysis*)

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

LAP - leucin aminopeptidaza (*engl. Leucine aminopeptidase*)

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

P – vjerojatnost (*engl. probability*)

ROC krivulja (*engl. receiver operating characteristic (ROC) curve*)

$r_s$  – Spearmanov koeficijent povezanosti (*engl. Spearman's Correlation Coefficient*)

SAT – sistolički arterijski tlak (*engl. systolic blood pressure*)

SD – standardna devijacija (*engl. standard deviation*)

t – vrijednost Studentova testa nezavisnih (zavisnih) uzoraka (*engl. Student's t-test*)

TGF $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta beta (*engl. Transforming Growth Factor -  $\beta$* )

X – aritmetička sredina (*engl. mean*)

$\alpha_1m$  – alfa 1 mikroglobulin u mokraći (*engl. alfa 1 microglobulinuria*)

$\alpha_1mCR$  – omjer alfa 1 mikroglobulina po gramu kreatinina u mokraći (*engl. alfa 1 microglobulin –creatinin ratio*)

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

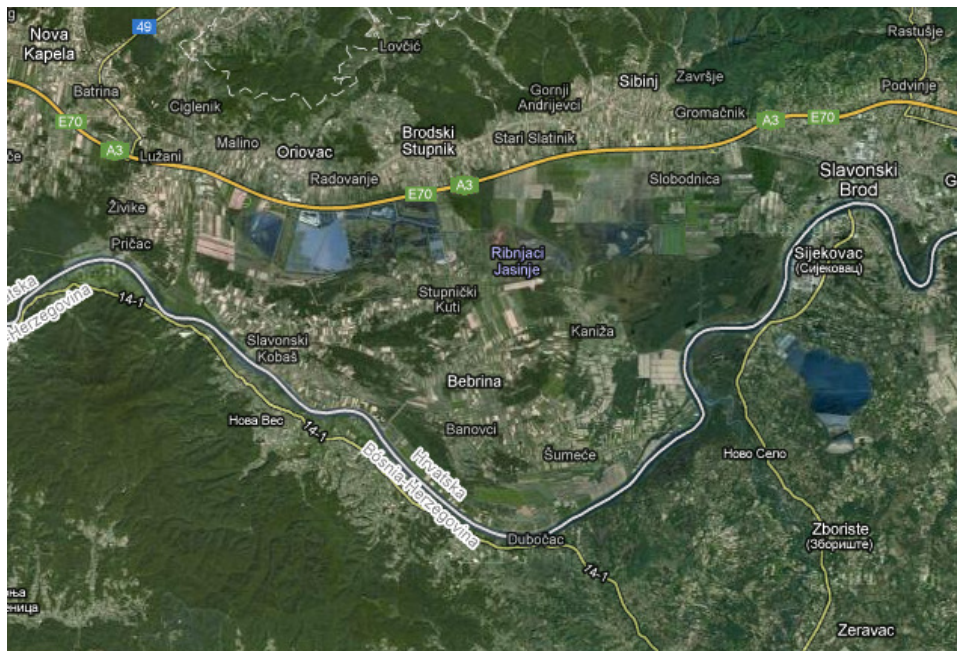
# **1. UVOD**



## 1.1. Epidemiološki podaci

Endemska nefropatija (EN) je kronična tubulointersticijska nefropatija egzotoksične etiologije s višegodišnjim asimptomatskim tijekom koji se nakon toga razdoblja najčešće klinički očituje terminalnim bubrežnim oštećenjem. U ranijem periodu je opisivano da je anemija izrazitija od stupnja renalne insuficijencije (1).

Bolest je opisana isključivo u ruralnoj populaciji, u osoba koje su u tim krajevima provele više od 10-15 godina. Žarišta EN evidentirana su u aluvijalnim nizinama velikih pritoka rijeke Dunav u Bosni, Bugarskoj, Hrvatskoj, Rumunjskoj i Srbiji. U Hrvatskoj endemsko žarište se nalazi zapadno od Slavenskog Broda uz rijeku Savu, u inundiranom i u prošlosti često plavljenom Jelas polju, a obuhvaća 14 sela s populacijom od 10 865 stanovnika (2). (Slika 1.)



**Slika 1. Endemsko žarište u Hrvatskoj**

Bolest je prvi put opisana sredinom prošlog stoljeća premda je prema crkvenim zapisima bila najvjerojatnije prisutna i ranije te se u Hrvatskoj nazivala Kobaška bolest (po selu Slavonki Kobaš) (3-5). Prvi dokumentirani slučaj endemske nefropatije je zapis obdukcije muškarca iz sela Slavonki Kobaš koji je preminuo 1948.godine u slici uremije u Kliničkom bolničkom centru u Zagrebu.

Posljednih pedesetak godina koliko se istražuje i prati ova bolest geografska raspodjela endemskih sela se nije mijenjala niti su opisani novi slučajevi u drugim selima koristeći postojeće dijagnostičke kriterije.

Prevalencija EN nije u našem žarištu prema zadnjim rezultatima bitnije promijenjena i kreće se oko 2-10% (1-2). Slični podaci su dobiveni u drugim endemskim žarištima (6-7). U hrvatskim EN selima također nije opažena značajnija promjena u učestalost sumnjivih čija je učestalost oko dva do tri puta veća od one u bolesnih, kao niti u onih s rizikom od oboljenja od EN koji čine oko jedne petine populacije EN sela (2). Ono što se uočava u svim žarištima je pomak u dobi postavljanja dijagnoze, tj sada je prosječna dob oko 55-60 godina, dok je ranije bila oko 45-50 godina. Ove promjene su dijelom odraz poboljšanih dijagnostičkih i terapijskih postupaka, a dijelom manje izloženosti ili potpunog prestanka izloženosti egzogenom toksičnom čimbeniku.

Bolest se javlja samo u određenim kućanstvima, ali nije izravno nasljedna što je najočitije potvrdio tzv. prirodni pokus s Ukrajinčima (1). Ukrajinski imigranti kao i njihovi potomci koji su naselili endemska sela krajem 19 i početkom 20 stoljeća podjednako su oboljevali od EN i karcinoma gornjeg dijela mokraćnog sustava kao i autohtono stanovništvo za razliku njihovih rođaka ili sunarodnjaka koji su ostali živjeti u Ukrajini i imigranta koji su naselili okolna neendemska sela što je upućivalo na ključnu važnost izloženosti okolišnom čimbeniku/čimbenicima u endemskim selima (1).

Sljedeće važno obilježje EN je znatno veća učestalost karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (8). Za razliku od karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava u općoj populaciji, u endemskim žarištima karcinom je češći u žena (9-11). Specifični mortalitet od ovih malignoma je u našem žarištu 14 puta veći nego u cijeloj Brodsko-posavskoj županiji te 55 puta veći nego u drugim dijelovima Hrvatske (11).

## **1.2. Etiologija endemske nefropatije**

Posljednih pedesetak godina intenzivno se istražuje čitav niz vanjskih etioloških čimbenika za EN uključujući i okolišne toksine poput mikotoksina, fitotoksina, teških metala, virusa i elemenata u tragovima (12-14) s ohratoksinom A (15-16). Posljednjih petnaestak godina u fokusu je bio ohratoksin A. No, za ovaj ubikvitaran mikotoksin nema dokaza da izaziva toksičnu nefropatiju u ljudi, patohistološke promjene koje izaziva u životinja ne odgovaraju

promjenama u EN, a naročito je važan podatak da u životinja izaziva karcinom bubrega, ali ne i karcinom prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava što je malignom koji je povezan s EN (16-17). Prema IARC ohratoksin A je svrstan u skupinu 2B što je potvrda da nema dokaza o toksičnosti/karcinogenosti u ljudi, a Europsko povjerenstvo za hranu zaključilo je još 2006. godine da nema dovoljno dokaza koji bi potvrdili povezanost ohratoksina A i EN (18-19). Novija istraživanja pokazala su da ohratoksin A ne stvara kovalentne adukte s DNK te da stoga nema sigurnih dokaza da je humani karcinogen kao niti etiološki čimbenik za EN. Ovime je definitivno odbačena ova hipoteza koja je godinama potisnula u drugi plan istraživanja aristolohične kiseline. Danas postoje neoborivi dokazi da je aristolohična kiselina, fitotoksin iz biljke vučje stope (*Aristolochia clematitis*) glavni rizični čimbenik i uzročnik EN i pridruženih karcinoma prijelaznog epitela mokraćnog sustava (20-22).

Peroralni unos biljnih preparata koji sadrže aristolohičnu kiselinu povezuje se s razvojem sindroma poznatijeg kao nefropatija aristolohične kiseline (AAN – aristolochic acid nephropathy). (23-25). Obilježja ovog sindroma su progresivno kronično bubrežno zatajenje, tubulointersticijska fibroza koja počinje od korteksa i postupno se širi prema meduli i visoka učestalost inače rijetkog karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava (26-27). Etiološka istraživanja EN su pokazala kako postoji sličnost patofizioloških promjena, ali i patohistološkog nalaza s AAN koja se do nedavno nazivala i nefropatijom kineskih trava (28-30). Skupina hrvatskih znanstvenika i stručnjaka s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Instituta Ruđer Bošković u suradnji s američkim kolegama sa State University at Stony Brook u New York su epidemiološko-molekularnim istraživanjima dokazali kako je aristolohična kiselina etiološki čimbenik EN konačno potvrdivši staru Ivićevu hipotezu i opažanje iz 1969.godine. (31-34). Ivić je naime uočio da su sjemenke korova vučje stope (*Aristolochia clematitis*) bile pomiješane zajedno sa sjemenkama žita i tako se zajedno mljele i dospijevale u brašno za kruh, glavnu prehrambenu namjernicu endemskih sela, ali i općenito populacije na ovim prostorima (31). **(Slika 2.)** Kovalentno vezani AA-DNK adukti kao doživotni biljeg ranije izloženosti AA nađeni su u bolesnika iz EN sela Hrvatske, Bosne i Hercegovine i Srbije, dok adukti nisu nađeni u niti jednog bolesnika iz kontrolne skupine, tj. bolesnika izvan endemskih područja što upućuje na zaključak da EN je nefropatija aristolohične kiseline (34-35). Osim nalaza adukata aristolohične kiseline koji su dokaz da je ovaj okolišni fitotoksin i karcinogen unesen u organizam, sljedeći ključni dokaz o tome da aristolohična kiselina izaziva EN i udružene karcinome prijelaznog epitela je nalaz tipične

mutacije onkosupresora p53 tj. transverzija A-T u T-A. Ova mutacija nađena je u nizu staničnih modela i u bolesnika s AAN. U IARC učestalost ove mutacije u svijetu je oko 5%, dok je u bolesnika s EN oko 70%. Ista učestalost ove tipične mutacije nađena je u bolesnika s AAN na Tajvanu i dodatne mutacije se nalaze u bolesnika s Tajvana i bolesnika iz naših endemskih sela u istim „vrućim točkama“ (34, 36-37). Svi ti rezultati nedvojbeno potvrđuju da je aristolohična kiselina glavni čimbenik rizika i uzročnik EN i udruženih karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava. Ostaje otvoreno pitanje zbog čega bolest zahvaća samo dio izložene populacije, je li bolest zaista ograničena na ranije određena žarišta, i može li se zbog napredovanja poljoprivredne tehnologije i onemogućavanja kontaminacije žita sjemenkama očekivati u budućnosti postepeno isčezavanje EN čemu u prilog govore i neka opažanja iz Hrvatske (38). Na prva dva pitanja odgovor će dati dodatna genska testiranja koja su u tijeku.



**Slika 2. Vučja stopa (*Aristolochia clematitis*) u žitnom polju**

### 1.3. Klinički slika i tijek bolesti

EN je kronična sporo progresivna bubrežna bolest bez jasnih znakova i simptoma koji bi u početnoj asimptomatskoj fazi upućivali na kronično bubrežno oštećenje. Oboljeli dobro podnose bolest te je njihova radna sposobnost narušena tek u uznapredovalom stadiju bubrežne bolesti (39- 41). Prvi znak oštećenja bubrežne funkcije je poremećaj koncentriranja mokraće kao posljedica oštećenja tubula. Glomerulana funkcija je dugo očuvana te se azotemija i uremija javljaju mnogo godina nakon početka bubrežne bolesti. U ranoj fazi dok su još bubrezi funkcionalni moguća je pojava nespecifičnih bolova u slabinskoj regiji. Jedan od ranih znakova bolesti koji se ranije opisivao je normocitno-normokromna anemija s normosideremijom. Anemija je bila izrazitija od one koja bi se očekivala prema stupnja bubreženog oštećenja (42) te je u oboljelih od EN koji se liječe bubrežnom nadomjesnom terapijom zahtijevala više doze eritropoetina nego u bolesnika s drugim bubrežnim bolestima (43).

Umor, bijedilo kože i sluznica, glavobolja, gubitak na tjelesnoj masi i poliurija s nikturijom javljaju se daljnjom progresijom bolesti prema terminalnom stadiju. Edemi su prisutni tek u uznapredovaloj fazi kao posljedica zadržavanja natrija i vode. Arterijski tlak je u početku normalan, ali raste napredovanjem bubrežne bolesti. Novija istraživanja su pokazala da povišeni arterijski tlak se javlja i u ranoj fazi bolesti što bi se moglo dijelom objasniti porastom incidencije hipertenzije u općoj populaciji, a dijelom boljim dijagnostičkim postupcima i smanjenom izloženosti vanjskom etiološkom čimbeniku, aristolohičnoj kiselini. (7, 44).

U većine bolesnika s nefropatijom karcinomi prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava obično se javljaju desetak godina od pojave bolesti, dok u manjeg broja bolesnika pojava karcinoma prethodi nefropatiji (10, 45). Obično su karcinomi unilateralni i očituju se bezbolnom makrohematurijom te anemijom uz prethodno opisane simptome i znakove nefropatije. Rjeđe se javlja bol u slabinskoj regiji obično kao rezultat postepene opstrukcije/distenzije uretera ili bubrežnom kolikom zbog opstrukcije ugruškom. Gubitak na tjelesnoj masi, anoreksija, palpabilna masa u slabinskoj regiji i bolovi u kostima su znakovi i simptomi uznapredovale bolesti i očituju se u malog broja bolesnika s karcinomom.

Spomenute razlike u kliničkom tijeku i znakovima bolesti vjerojatno su odraz različitog trajanja izloženosti egzotoksinu, ali i genetskih razlika koje predisponiraju određeni klinički tijek bolesti.

#### 1.4. Patohistološki nalaz

Za EN karakterističan je nalaz izrazite hipocelularne fibroze intersticija s tubularnom atrofijom. Promjene najprije zahvaćaju superficijalni dio korteksa s postepenim širenjem prema unutarnjem dijelu korteksa i meduli tijekom daljnje progresije bolesti (28, 46-49). U ranom stadiju bolesti promjene u intersticiju mogu biti multifokalne sa zahvaćenjem većeg dijela superficijalnog dijela korteksa uz edem intersticija, hipocelularne kronične infiltrate i degeneraciju epitelnih stanica proksimalnog tubula s blagim glomerularnim i vaskularnim promjenama. Glomerularne promjene obuhvaćaju periglomerularnu fibrozu, ishemijske mikrocistične i kolabirane glomerule uz povremene promjene koje nalikuju trombotskoj mikroangiopatiji i fokalnoj segmentalnoj glomerulosklerozi. Promjene na krvnim žila svjetlosnim mikroskopom uključuju hijalinozu arteriola, fibrozu hiperplaziju intime. Na elektronskom mikroskopu često se nađu multifokalna zadebljanja i razdvajanja peritubularne kapilarne bazalne membrane. Ove su vaskularne promjene najvjerojatnije sekundarno nastale u sklopu progresivnog oštećenja bubrega tubulointersticijskom fibrozom.

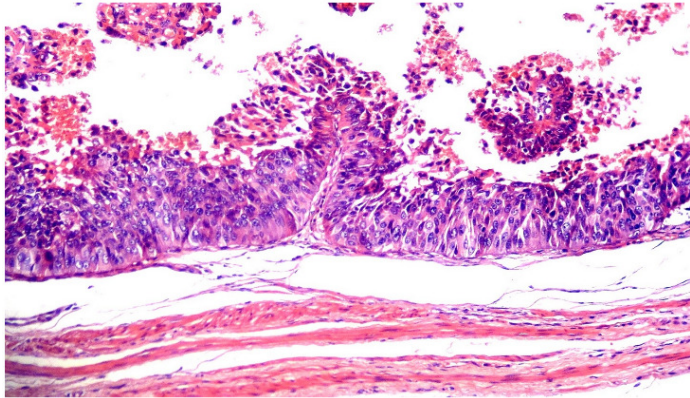
Terminalni stadij bolesti makroskopski obilježavaju izrazito mali simetrično skvrčeni bubrezi glatkih kontura svega 20-30 g ukupne mase.

Oko 40% bolesnika s EN ima multifokalni karcinom prijelaznog epitela u području gornjeg dijela mokraćnog sustava (26-27). Obično se radi o neinvazivnom papilarnom karcinomu uroepitela. (Slika 3.)

Otvoreno je pitanje koliko je patohistološki nalaz intersticijske fibroze značajan u postavljanju dijagnoze EN. Iako je potrebno isključiti sve potencijalne uzroke intersticijske fibroze na osnovi morfoloških i kliničkih nalaza, ovaj se tip hipocelularne fibroze s kortikomedularnim gradijentom širenja ne nalazi u najčešćim uzrocima terminalnog bubrežnog oštećenja kao što je nefroskleroza, kronični pijelonefritis ili refluksna nefropatija i kronični glomerulonefritis (50). Intersticijska fibroza je opisana također i kod izlaganja kadmiju, olovu, litiju, ciklosporinu A, ifosfamid, pamidronatu i nitrozoureji zbog čega je potrebno isključiti moguće izlaganje i tim čimbenicima na osnovi anamnestičkih i kliničkih podataka (50). S obzirom na povezanost s tumorima prijelaznog epitela potrebno je isključiti i analgetsku nefropatiju koju obilježavaju atrofični bubrezi valovitih kontura s kortikalnom multifokalnom umjerenom intersticijskom staničnom infiltracijom i medularnom papilarnom nekrozom i/ kalkifikacijom bez postojanja kortikomedularnog gradijenta fibroze kojeg nalazimo u EN. Cosyns je već ranije uočio patohistološke izrazite sličnosti između EN i AAN u tipu fibroze i



slične učestalosti u karcinomima gornjeg mokraćnog sustava u oba entiteta. Danas znamo da je riječ o istom kliničkom entitetu.



**Slika 3. Patohistološki nalaz papilarnog karcinoma prijelaznog epitela uretera**

### **1.5. Dijagnostički kriteriji za endemsku nefropatiju**

Dijagnoza EN danas se još uvijek ne postavlja na temelju specifičnog i pogotovo patognomoničnog biljega. Tijekom proteklih desetljeća nisu u svim državama u kojima postoje dokazana žarišta EN korišteni isti kriteriji. U Hrvatskoj se dijagnoza i klasifikacija temelje na modificiranim kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) postavljanim još 1965. godine (51-52). Prema tim kriterijima ruralno endemsko stanovništvo se klasificira u 4 podskupine: bolesni, sumnjivi da boluju od EN, ugroženi i ostali prema sljedećim dijagnostičkim elementima: a) pozitivna obiteljska anamneza za EN ili život u domaćinstvu u kojem ima oboljelih od endemske nefropatije; b) proteinurija niske molekularne mase ( $\alpha_1$  mikroglobulinurija  $>10$  mg/L ili  $>14$  mg/g kreatinina); c) serumski kreatinin  $>132,6$   $\mu\text{mol/L}$ ; d) anemija (hemoglobin  $<120$  g/L za muškarce,  $<113$  g/L za žene); e) isključivanje drugih bubrežnih bolesti uključujući i šećernu bolest. Dijagnoza EN odnosno bolesnih osoba se postavlja ukoliko su ispunjene sljedeće kombinacije: a+b+c+d+e, ili b+c+d+e ili a+b+d+e.; osoba se proglašava sumnjivom da boluje od EN ukoliko su prisutni a+b ili b+d. Osobe koje su pod većim rizikom obolijevanja od EN su one koje žive u kućanstvima gdje je bilo oboljelih od EN, dok u skupinu ostalih ako nije zadovoljen nijedan prethodno spomenutih kriteriji.

Postojeći kriteriji (51, 53-54) za EN su zastarjeli, neujednačeni (3 vrste kriterija za EN) te nisu u skladu s novim preporukama za klasifikaciju bubrežnih bolesti (55) i stoga su neprecizni tako da je u pripremi konsenzus eksperata iz svih zemalja s EN koji bi trebao biti suvremen i jedinstven.

## **1.6. Laboratorijske značajke endemske nefropatije**

### **1.6.1. Tubularna proteinurija i enzimurija**

EN se laboratorijski očituje tubularnom proteinurijom koja je prvi znak oštećenja bubrega (oštećenje proksimalnog tubula), a u uznapredovalim stadijima bubrežne bolesti obično je manja od 1 g/L. Proteinurija male molekularne mase je obilježje EN i često je udružena s tubularnom enzimurijom drugim pokazateljem da je proksimalni tubul ciljno mjesto djelovanja toksina (52; 56-58). Od proteina niske molekularne mase koji se izlučuju u mokraći najčešće se u literaturi spominju  $\beta$ 2mikroglobulin ( $\beta$ 2m),  $\alpha$ 1mikroglobulin ( $\alpha$ 1m), retinol vezujući protein (RBP), clara cell protein (CC16), cistatin (cyst C), lizozim (muramidaza), transferin i drugi. Spomenuti proteini se zbog svoje male molekularne mase filtriraju kroz glomerularnu bazalnu membranu i resorbiraju u stanicama proksimalnog tubula a pojavljuju se u mokraći u slučaju oštećenog mehanizma resorpcije kao što je megalin-kubulinski receptorski sustav (59-60).

Od navedenih proteina u kliničkom radu najčešće se određuju  $\alpha$ 1m i  $\beta$ 2m.

U ranoj fazi bubrežne bolesti dolazi do oštećenja proksimalnog tubula što se manifestira porastom proteina niske molekularne mase i enzimurijom. Općenito postoje dva glavna patološka mehanizma njihova nastanka: (1) Akutno ili kronično oštećenje tubularnih stanica dovodi do oslobađanja enzima i/ili proteina niske molekularne mase fiziološki prisutnih u spomenutim stanicama u tubularni lumen. Brzina izlučivanja enzima mokraćom je povećana zbog njihova oslobađanja iz oštećenih stanica ili zbog povećane indukcije enzima u obnavljajućim stanicama. (2) Proteini male molekularne mase koji fiziološki slobodno prolaze glomerularnu kapilarnu membranu i gotovo se u potpunosti resorbiraju u proksimalnom tubulu mogu biti patološki povišeni u mokraći zbog povećanog resorptivnog opterećenja (povećani transglomerularni prolaz proteina) ili zbog funkcionalnog ili strukturnog oštećenja (toksični učinak filtriranog proteina ili direktni učinak toksina) (61, 63). Enzimi kao biljezi



oštećenja nefrona se nalaze u različitim dijelovima stanica, u lizosomima, na četkastoj prevlaci stanica proksimalnog tubula i u citoplazmi stanice. N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminidaza (NAG) je tipičan primjer lizosomskog enzima koji se pretežno nalazi u stanicama proksimalnog tubula. Alkalna fosfataza, naročito intestinalna (iAP),  $\gamma$ -glutamyl-transferaza (GGT), alanin aminopeptidaza (AAP) i leucin amniopeptidaza (LAP – točnije leucil-arilamidaza) su enzimi četkaste prevlake stanica proksimalnog tubula, dok  $\alpha$ - i  $\pi$  glutathion S-transferaza su citosolni izomeri enzima stanica proksimalnog i distalnog tubula (63-64). Kako je tubularna proteinurija uz enzimuriju rano obilježje bubrežnog oštećenja, pa tako i EN, određivanje tubularnih biljega može biti od velikog značaja u ranoj asimptomatskoj fazi bolesti. Nortier i sur. (65) su pokazali da se enzimi četkaste prevlake stanica proksimalnog tubula manje izlučuju mokraćom u ispitanika s nefropatijom kineskih trava (Chinese herbs nephropathy) od kontrola te da stupanj strukturnog oštećenja tubula pozitivno korelira s vrijednostima klirensa kreatinina, a negativno s vrijednostima proteina niske molekularne mase u mokraći. Osim toga Debelle i sur. su na animalnom modelu za AAN pokazali kako visoke doze aristolohične kiseline dovode do oštećenja stanica proksimalnog tubula s posljedičnim, u početku porastom a potom padom LAP enzimurije te nastupom atrofije tubularnih epitelnih stanica (66). Osim toga, LAP se pokazao kao dobar pokazatelj tubularnog oštećenja u različitim toksičnim i hipoksičnim (vaskularnim) bubrežnim oštećenjima u ljudi i na animalnim modelima (67-70). Važno je spomenuti kako povećanu aktivnost enzima u mokraći može pokrenuti i aktivacija fibrinolize bez obzira na uzrok i to aktivacijom bubrežnog plazminogena s posljedičnim oslobađanjem bubrežnih peptidaza u mokraću (71). Ti rezultati potvrđuju razmišljanja kako enzimurija može biti od koristi u ranoj fazi bolesti, ali ne i u uznapredovalim oblicima kada atrofički i fibrozni procesi postanu dominantni te time više nisu primjermi test procjene tubularnog bubrežnog oštećenja. Čvorišćec i sur. (57) su pokazali da bi lizozimurija mogla biti korisna ne samo u razlikovanju oboljelih od EN od kontrola, nego i u razlikovanju oboljelih od drugih SZO podskupina (sumnjivih, rizičnih i ostalih). Isti autori su određivanjem NAG-a (lizosomski enzim) i AAP-a (enzim četkaste prevlake) u mokraći ispitanika iz endemskih i kontrolnih sela dobili kako je izlučivanje oba enzima povećano u oboljelih, i to značajnije AAP-a. Osim toga, u istom istraživanju je opaženo povećano izlučivanje AAP-a mokraćom u podskupinama sumnjivih i rizičnih. Dijagnostička osjetljivost ovih enzima za oboljele i sumnjive ispitanike prema SZO kriterijima je bila visoka (NAG 91%, AAP 86%), ali je specifičnost za oba enzima vrlo niska,

svoga 15%. S druge strane osjetljivost i specifičnost  $\beta_2m$  u mokraći u tom istraživanju je bila značajnija (osjetljivost 75%, specifičnost 63%) nego li za spomenute enzime. (57).

Donedavno je u SZO kriterijima (51) za postavljanje dijagnoze EN, kao pokazatelj tubularnog oštećenja uvršten  $\beta_2m$ . Kako je  $\beta_2m$  nestabilan pri nižim vrijednostima pH mokraće brzo se raspada (72), te njegova koncentracija u mokraći često raste uz prisutnu leukocituriju (73), pa time nije dovoljno osjetljiv kao test probira. Budući da nisu sigurni podaci koji se dobiju analizom, on nije niti dovoljno specifičan, što ukazuje na jednu od potrebnih promjena u kriterijima EN (58, 74). Određivanje  $\alpha_1mCR$  ima mnogo prednosti u usporedbi s  $\beta_2m$ . Za razliku od  $\beta_2m$   $\alpha_1mCR$  je stabilan u mokraći (72, 75) te na koncentraciju  $\alpha_1mCR$  u mokraći ne utječu serumski paraproteini (76) ili infekcija CMV (77). Osim toga, koncentracija  $\alpha_1mCR$  iz jednokratnog uzoraka mokraće pokazuje dobru poveznost s koncentracijom mokraće prikupljene tijekom 24 sata (78) što omogućuje jednostavniji i jeftiniji način prikupljanja uzoraka naročito u epidemiološkim istraživanjima u svrhu probiranja populacije s rizičnom tubulointersticijskom bolesti kao što je endemska nefropatija.

Prema novijim istraživanjima raznih bubrežnih bolesti  $\alpha_1m$  je pouzdan biljeg oštećenja proksimalnog tubula (79) kao što su trovanja teškim metalima (80-82), u hipertenziji (83), mutliplom mijelomu (76).  $\alpha_1m$  se pokazao pouzdanim također i u procjeni renalne funkcije nakon kirurškog zahvata (84), u bolesnika na imunosupresivnoj terapiji (85), te u šećernoj bolesti tipa 1 (86) i tipa 2 (87), kao i u dijabetičara bez klinički manifestne nefropatije (88-89) i prije pojave same mikroalbuminurije (90). Zbog navedenih prednosti, u Hrvatskoj, a i nekim drugim centrima,  $\alpha_1m$  je potisnuo  $\beta_2m$  i danas se koristi u probiru i dijagnostici (52).

### **1.6.2. Procjena bubrežne funkcije u endemskoj nefropatiji**

Kriterij procjene bubrežne funkcije prema SZO kriterijima za EN je ista granična vrijednost serumskog kreatinina za muškarce i žene. Današnji stav je da je preciznija metoda procjena veličine glomerularne filtracije (estimated glomerular filtration rate - eGFR) pomoću MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) (91) ili Cockcroft-Gaultove jednadžbe (92). Validacijske studije u osoba srednje životne dobi s kroničnom bubrežnom bolesti su pokazale kako je MDRD preciznija metoda u procjeni bubrežne funkcije od Cockcroft - Gaultove jednadžbe. (91). Međutim, u osoba bez kronične bubrežne bolesti procjena bubrežne funkcije pomoću MDRD i Cockcroft-Gaultove jednadžbe umanjuje stvarnu veličinu glomerularne

filtracije te su precizne jedino u identifikaciji osoba sa značajnim bubrežnim oštećenjem (stadij KBB 3-5) (93-95). Rule i sur. su pokazali da je procjena veličine glomerularne filtracije pomoću MDRD jednadžbe u osoba istog spola, dobi i vrijednosti serumskog kreatinina u prosjeku za 26% viša u zdravih nego li u osoba s kroničnom bubrežnom bolesti (95). Stoga je preporuka izražavanja procjenjene veličine glomerularne filtracije pomoću MDRD jednadžbe kao vrijednost veća od 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> ako je dobiveni rezultat veći od 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup>, dok u slučaju dobivenih rezultata manjih ili jednakih 60 mL/min/1.73m<sup>2</sup> kao cijeli broj.

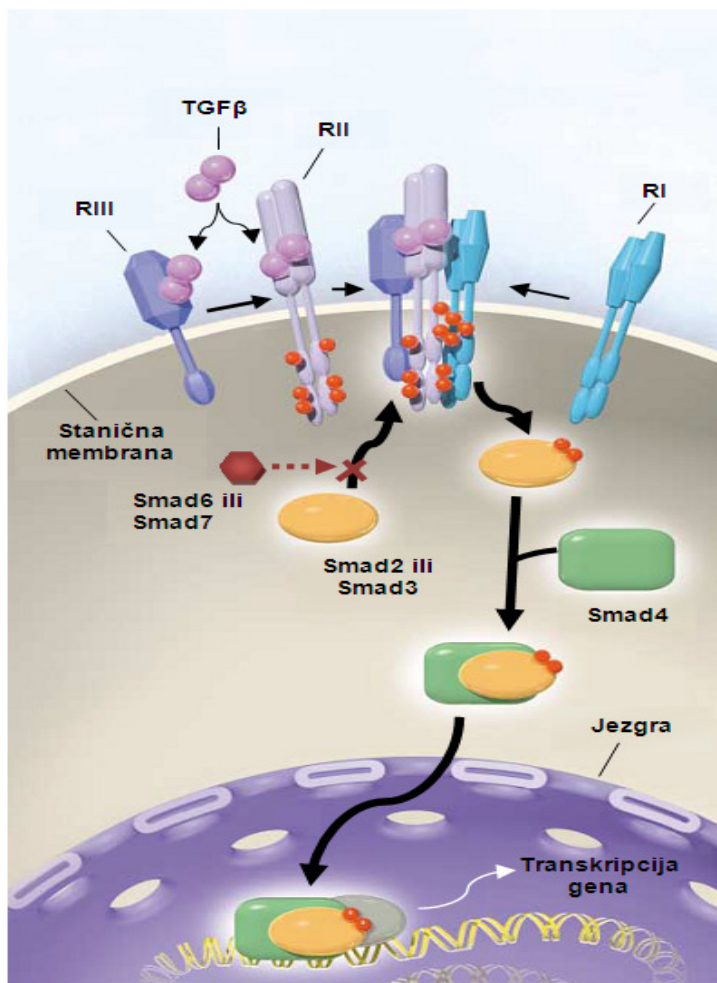
## **1.7. TGF- $\beta$ i bubreže bolesti**

### **1.7.1. Osnovna obilježja TGF $\beta$**

TGF $\beta$  je multifunkcionalni citokin koji sudjeluje u regulaciji proliferacije i diferencijacije stanica, embrionalnom razvoju, cijeljenju rana i angiogenezi (96-100). TGF $\beta$  pripada porodici dimeričnih polipeptidnih čimbenika rasta zajedno s koštanim morfogenetskim proteinom (BMP) i aktivinom. Postoje tri tipa TGF $\beta$ : TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 i TGF $\beta$ 3 koji su strukturno i funkcionalno vrlo slični. Aktivni oblik svih triju tipova TGF $\beta$  su polipeptidni dimeri od 12-kD koji nastaju proteolitičkim procesom iz većih propeptida (101-102). Svaki tip TGF $\beta$  kodira drugi gen. Ekspresija TGF $\beta$ 1 mRNA se nalazi u epitelnim, hematopoetskim stanicama i stanicama vezivnog tkiva, TGF $\beta$ 2 mRNA u epitelnim i neuronskim stanicama te TGF $\beta$ 3 primarno u mezenhimalnim stanicama (103). Tijekom razvoja rano dolazi do ekspresije TGF $\beta$ 1 i TGF $\beta$ 3 u strukturama uključenim u morfogenezu, dok TGF $\beta$ 2 se javlja kasnije u zrelom i diferenciranom epitelu (104).

TGF $\beta$  regulira stanične procese vezivanjem s visokim afinitetom na tri tipa membranskih receptora (tip I, II, III). Tip III (R III) je najzastupljeniji. Njegova uloga nije u prijenosu unutrastaničnog signala vezivanjem TGF $\beta$  za R III već u predočavanju dvama preostalim receptorima. Tip I (R I) i II (R II) su TGF $\beta$  receptori čiji citoplazmatski dijelovi imaju aktivnost serin-treonin kinaza kojima započinje unutarstanični prijenos signala fosforilacijom transkripcijskih čimbenika poznatijih kao Smad (ime po Sma i MAD homolognim genima u *Caenorhadbitis elegans* i *Drosophila melanogaster*). Tip RI fosforilira Smad2 i Smad3. Smad6 i Smad7 su inhibitorni transkripcijski čimbenici koji blokiraju fosforilaciju Smads2 i Smad3,

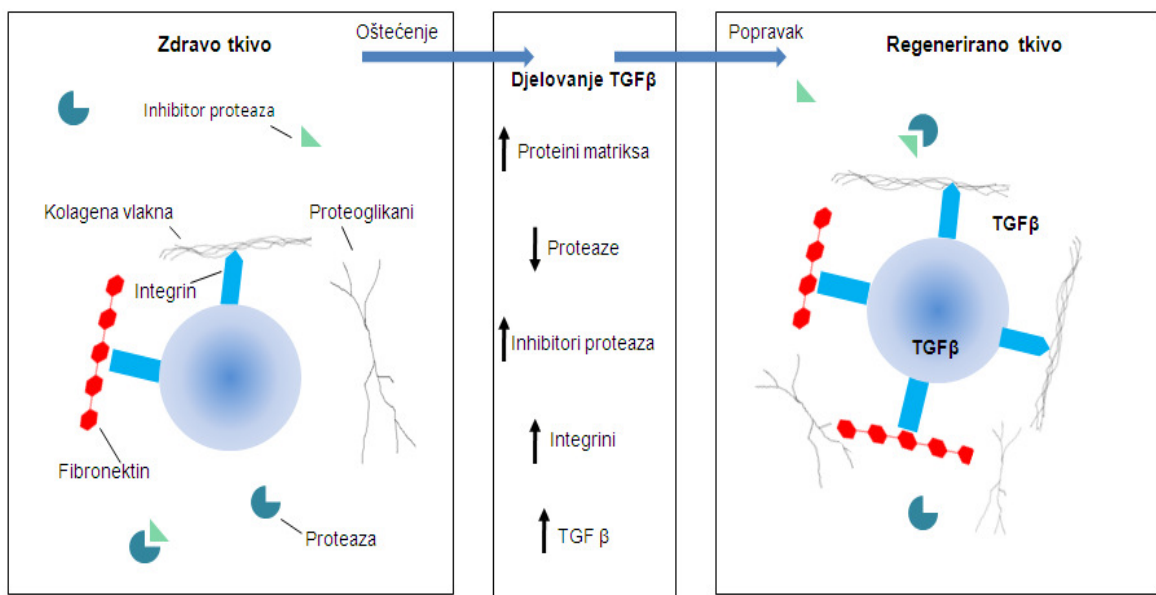
a time i ciljno djelovanje TGF $\beta$  na stanicu. Ukratko, TGF $\beta$  se veže za tip R III koji prezentira TGF $\beta$  tipu R II ili se TGF $\beta$  izravno veže za tip RII. Aktivirani RII se veže i fosforilira tip RI čime dolazi do RI aktivacije. RI nadalje aktivira Smad2 i Smad3 fosforilacijom. Aktivirani transkripcijski čimbenici čine kompleks sa Smad4, zajedničkom poveznicom za sve receptore aktivirane Smadom, kojim ulaze u jezgru gdje reguliraju transkripciju različitih gena ovisno o tipu stanice koja je aktivirana TGF $\beta$  (105-106). Djelovanje TGF $\beta$  se očituje i aktivacijom Smad neovisnih signalnih putova i to Erk, JNK i p38 MAPK kinaznih putova (107-108). (Slika 4.)



**Slika 4. Prijenos signala TGF $\beta$  u stanici**

Nakon oštećenja tkiva TGF $\beta$  je uključen u više događaja tijekom njenog popravka. Trombociti sadrže visoke koncentracije TGF $\beta$  i degranulacijom ih otpuštaju u velikim količinama na mjestu ozljede. Potom TGF $\beta$  započinje kompleksnu kaskadu događaja koji

dovode do cijeljenja rane. Ti događaji uključuju kemotaksiju monocita i leukocita, indukciju angiogeneze, kontrolu stvaranja citokina i drugih čimbenika upale (109-111). Dvije dodatne osobitosti TGF $\beta$  u odgovoru na ozljedu se očituju u stvaranju TGF $\beta$  autoindukcijom (112) te njegovom djelovanju na povećano stvaranje izvanstaničnog matriksa (ECM) (113-115). TGF $\beta$  stimulira sintezu pojedinih komponenata ECM kao što je fibronektin, tenascin, kolagen i proteoglikane (113, 116-117) uz istodobno blokiranje razgradnje matriksa smanjenjem sinteze proteaza i povećanjem sinteze inhibitora proteaza (118-119). Osim toga, TGF $\beta$  povećava ekspresiju integrina i mijenja njihov udio na površini stanice čime potiče staničnu adheziju za ECM (120).



**Slika 5. Djelovanje TGF $\beta$  u procesu cijeljenja tkiva**

Svi spomenuti događaji su korisni u procesu cijeljenja, ali tamna strana TGF $\beta$  djelovanja očituje se u povećanom odlaganju i smanjenoj razgradnji ECM na mjestu ozljede što može rezultirati ožiljkom i fibrozom. Osim toga, njegova sposobnost samoindukcije i sinteze ključna je u razvoju fibroze i ožiljka u kroničnim i progresivnim stanjima koja dovode do gubitka strukture tkiva a time i funkcije organa (121).

### 1.7.2. TGF $\beta$ u bubrežnim bolestima

Iako TGF $\beta$  igra ključnu ulogu u procesu cijeljenja oštećenog tkiva, povećano stvaranje TGF $\beta$  može rezultirati prekomjernim odlaganjem ožiljnog tkiva i fibrozom (99). Bubrežna fibroza je

završno zajedničko očitovanje različitih, tj. svih kroničnih bubrežnih bolesti bez obzira na uzrok. Povećano stvaranje TGF $\beta$  prisutno je u različitim bubrežnim bolestima poput IgA nefropatije, fokalne segmentalne glomeruloskleroze, lupus nefritisa, dijabetičke i HIV nefropatije (122-124).

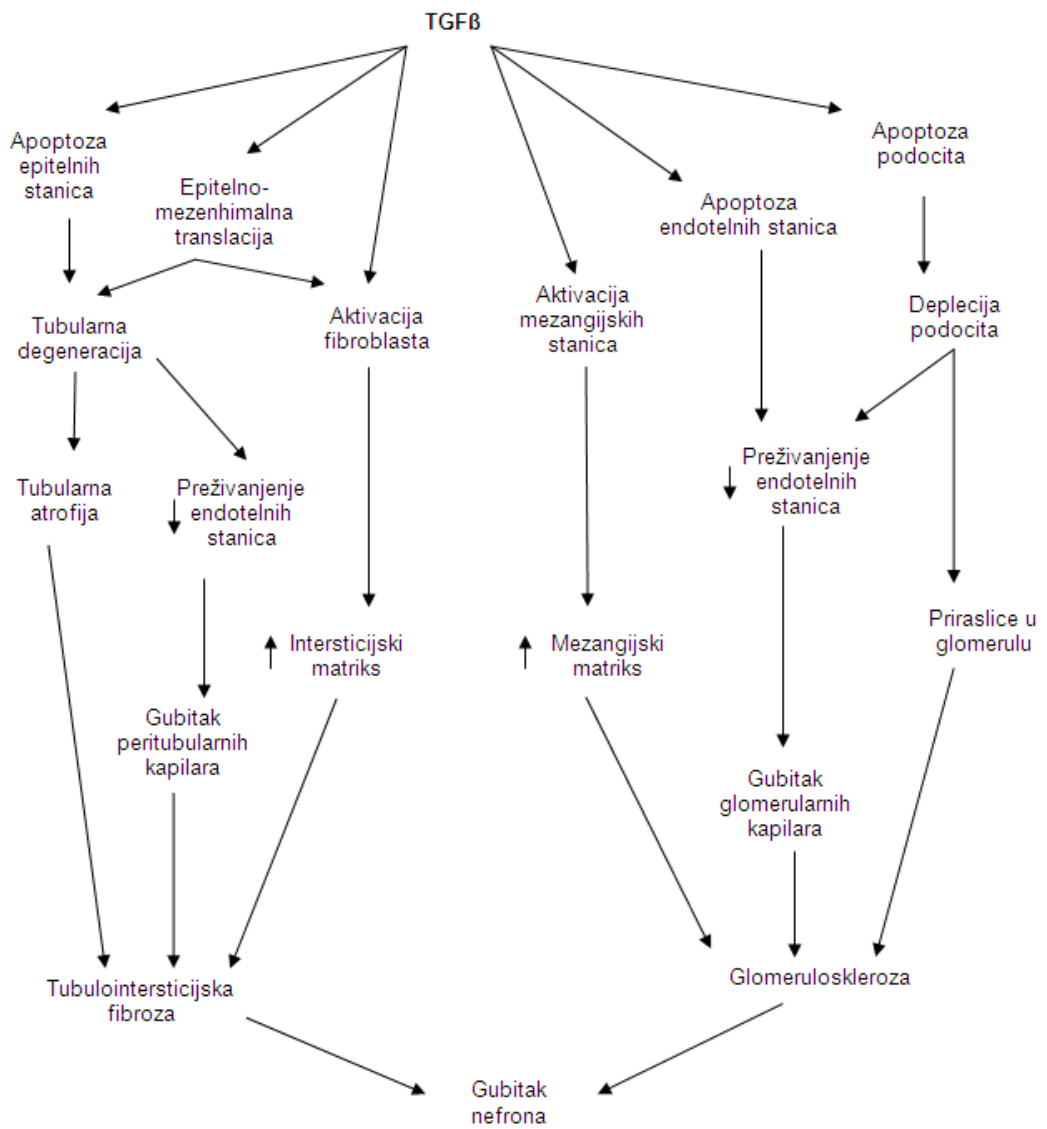
Bubrežna fibroza se očituje glomerulosklerozom, tubulointersticijskom fibrozom, infiltracijom upalnim stanicama, gubitkom parenhima u vidu tubularne atrofije, gubitka kapilara i deplecije podocita. Spomenute histološke promjene uključuju više složenih staničnih događaja: aktivaciju mezangijskih stanica i fibroblasta, tubularnomezenhimalnu tranziciju (EMT), infiltraciju monocitima/makrofazima i T stanicama, apoptozu stanica (125). Nakon početne ozljede zahvaćeno bubrežno tkivo prolazi različite procese popravka oštećenja (126). Ti procesi uključuju aktivaciju stanica bubrežnog parenhima što omogućuje stvaranje i sekreciju proupalnih citokina. Kemotaksijski gradijent citokina stvara signal koji usmjerava infiltraciju monocita/makrofaga i T stanica na mjesto ozljede. Ovisno o etiologiji bubrežnog oštećenja, upalne stanice u glomerulu ili intersticiju se aktiviraju te stvaraju molekule poput superoksida, fibrogenih i upalnih citokina koji dovode fenotipske aktivacije mezangijskih stanica, fibroblasta i tubularnih epitelnih stanica te stvaranja velike količine ECM. Stalno odlaganje ECM rezultira fibrozom ožiljkom i remeti finu arhitekturu bubrežnog tkiva što naposljetku dovodi do kolapsa bubrežnog parenhima i gubitka bubrežne funkcije.

Bubrežna fibrogeneza je dinamični proces čiji su ključni događaji nakupljanje ECM i aktivacija fibrogenih stanica. Ovisno o prirodi i mjestu ozljede, glomerularne mezangijske stanice, intersticijski fibroblasti i tubularne epitelne stanice su glavne fibrogene stanice u oštećenom bubregu (127-128). TGF $\beta$  je ključni fibrogeni čimbenik koji potiče miofibroblastnu aktivaciju ili tranziciju mezangijskih stanica, intersticijskih fibroblasta i tubularnih epitelnih stanica u fibrogene stanice koje stvaraju matriks. Miofibroblastna aktivacija mezangijskih stanica i fibroblasta javlja se u ranoj fazi odgovora na bubrežno oštećenje, dok tubularna EMT kasnije (129-130). Glavna obilježja aktivacije mezangijskih stanica i fibroblasta kao i tubularne EMT čine de novo ekspresija alfa-glatkomišićnog aktina, kontraktilnog proteina kojeg normalno nalazimo samo u perivaskularnoj glatkoj muskulaturi te povećanom stvaranju intersticijskog matriksa i to kolagena tip I i II te fibronektina.

U fibrozno promjenjenom bubregu brojni mehanizmi dovode do povećane aktivnosti Smad signalnog puta, ključnog signalnog puta u bubrežnoj fibrogenezi (125, 131-133). U normalnom zdravom bubregu Smad signalizacija je pod kontrolom Smad transkripcijskih korepresora koji uključuje sljedeće proteine: SnoN, Ski i TGIF. U fibrozno promjenjenom

bubregu dolazi do progresivnog gubitka SnoN i Ski što upućuje da je gubitak Smad antagonista važan mehanizam pojačavanja TGF $\beta$  signala (134). Osim Smad transkripcijskih korepresora nedavno su identificirani i drugi endogeni antifibrogeni čimbenici poput jetrenog čimbenika rasta (HGF) i koštanog morfogenetskog proteina -7 (BMP-7) koji antagoniziraju fibrozne učinke TGF $\beta$ . HGF i BMP-7 djeluju tako što blokiraju TGF $\beta$  posredovanu miofibroblastnu aktivaciju glomerularnih mezangijskih stanica i intersticijskih fibroblasta te inhibiraju tubularnu EMT (126, 135-137).

Pretjerano nakupljanje ECM u fibrozno promjenjenom bubregu je rezultat ne samo njegovog pretjeranog stvaranja već i njegove poremećene razgradnje. Bubrežno tkivo stvara veliki broj proteaza od kojih sustav plazminogen/plazmin i MMP čine ključnu mrežu razgradnje svih proteinskih sastavnica matriksa. Istraživanja na animalnim modelima su pokazala suprotno očekivanju da plazmin (serinska proteaza, direktni aktivator MMP) ne djeluje zaštitno u bubrežnoj tubularnoj fibrozi te da MMP cijepaju tubularnu bazalnu mebranu i potiču EMT što dovodi do bubrežne fibroze (138-140). (**Slika 6.**)



**Slika 6. Mehanizam djelovanja TGFβ u bubrežnom oštećenju i fibrozi**



### **1.7.2.1. TGFβ i nefropatija aristolohične kiseline (AAN)**

Nefropatija aristolohične kiseline, u koju se danas ubraja i EN, je bubrežna bolest koju karakterizira izrazita tubulointersticijska fibroza s atrofijom i gubitkom tubula (25, 141-142). Aristolohična kiselina primarno djeluje na epitelne stanice proksimalnog tubula inducirajući apoptozu stanice proksimalnog tubula i EMT (143-145). Ključan mehanizam nastanka kronične AAN je Smad TGFβ ovisni i neovisni signalni put induciran AA (133, 146-147).

Na malom uzorku ispitanika u Srbiji određivanjem TGFβ1 u plazmi i mokraći bolesnika s endemskom nefropatijom, s glomerulonefritisom te u zdravih ispitanika nisu nađene značajne razlike u plazmatskoj koncentraciji TGFβ1 između ispitivanih skupina. Obje skupine ispitanika s bubrežnim bolestima, EN i glomerulonefritisom su imale značajno više koncentracije TGFβ1 u mokraći u uspoređi sa zdravim ispitanicima, dok nije bilo razlike između skupina s bubrežnim bolestima. Ovi rezultati bi mogli upućivati na moguću ulogu TGFβ1 u razvoju kroničnih tubulointersticijskih promjena u EN (148).

## **1.8 Svrha rada**

Među najbitnije čimbenike renalne fibroze ubraja se TGFβ. Na temelju rezultata istraživanja u drugim bubrežnim bolestima (149-151) može se zaključiti kako se na temelju određivanja TGFβ u mokraći može odrediti stupanj bubrežnog oštećenja, to jest kako je ovaj citokin bitan prognostički faktor.

Prema epidemiološkim i kliničkim podacima danas je još uvijek u EN selima velik broj osoba izložen riziku progresije u terminalnu bubrežnu bolest. To su osobe starije životne dobi koje su ranije bile izložene uzročniku, te kod kojih bubrežna bolest više nije u početnoj fazi kada su zahvaćeni samo proksimalni tubuli, te time kod njih određivanje ranih pokazatelja tubularnog oštećenja poput  $\alpha$ 1mCR i LAP nije od većeg dijagnostičkog značenja. Uz to, u tih je osoba veća i prevalencija hipertenzije i šećerne bolesti što dodatno smanjuje osjetljivost i specifičnost tubularne proteinurije i enzimurije (155). To je jedan od razloga zbog čega nije bilo moguće točno definirati kriterije za postavljanje dijagnoze EN. Međutim, sasvim je izvjesno kako je u tih bolesnika koji su dakle, ranije bili izloženi uzročniku i kod kojih je primarno bio oštećen proksimalni tubul, danas vjerojatno u tijeku proces fibroze koja je jedna od najvažnijih patohistoloških značajki uznapredovale faze EN (28,50). U dostupnoj literaturi nismo našli podatak o istraživanju ovog citokina u EN pomoću biološkog testa TGFβ-

osjetljivih BL41 stanica s luciferaznom aktivnosti te je određivanje ovog citokina u mokraći, točnije jedne njegove izoforme i to TGFβ1 pomoću ELISA testa opisano samo u jednom radu (148) pri čemu su korišteni drugi dijagnostički kriteriji za klasifikaciju EN (53). Osim toga, samo je još Toncheva (156) uključila gen za TGFβ1 u svoja istraživanja genske podloge EN i progresije bolesti.

Na temelju dobivenih rezultata ocijeniti će se jesu li pokazatelji ranog odnosno kasnog oštećenja bubrega čiju ćemo dijagnostičku vrijednost testirati dovoljno osjetljivi da budu uvršteni u dijagnostički algoritam. Ukoliko bude opaženih razlika između EN i neendemske populacije u ranijim biljezima oštećenja proksimalnog tubula, biti određene granične vrijednosti za te biljege. S druge strane, ukoliko neće biti razlika u ranim biljezima, a biti će prisutne razlike u biljegu kasnog bubrežnog oštećenja predložiti će se u dijagnostički algoritam određivanje TGFβ u urinu. Ukoliko se i rani i kasni biljezi pokažu nedovoljno osjetljivi također i ti rezultati će biti vrlo korisni jer će moći usmjeriti druga istraživanja u traženju osjetljivih biljega kako za probir tako i za dijagnosticiranje oboljelih od EN.

Uz evaluaciju kriterija za postavljanje dijagnoze EN, znanstveni svrha ovog rada je postavljanje metode određivanja TGF beta mokraćom. Tako postavljena metoda moći će se koristiti i u ostalim kroničnim bolestima, primarno u glomerulopatijama i nakon transplantacije bubrega.

## **2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

## 2. 1. Hipoteze

Na temelju epidemioloških podataka, novih rezultata vezanih uz etiologiju endemske nefropatije, te poznavanja mehanizama nastanka kroničnih promjena u tubulointersticiju i uloge TGF beta postavljene su sljedeće hipoteze

1. Zbog prestanka izloženosti aristolohičnoj kiselini prije dvadesetak godina učestalost oštećenja proksimalnog tubula u endemskim selima ne razlikuje se u učestalosti u neendemskim selima stoga nema razlika u izlučivanju LAP i  $\alpha$ 1mCR mokraćom između endemskih i neendemskih sela, kao niti između pojedinih skupina prema SZO klasifikaciji, te LAP nije koristan dodatni dijagnostički biljeg.
2. Više nema novih slučajeva endemske nefropatije pa tako i osoba samo s oštećenjem proksimalnog tubula. Bolesni i sumnjivi da boluju od endemske nefropatije koji su sada stariji nego što su to bili bolesni i sumnjivi prije dvadesetak godina nalaze se u uznapredovalijoj fazi kronične bubrežne bolesti s izrazitijom fibrozom te je u njih izlučivanje TGF $\beta$  mokraćom veće i zbog toga postoji značajna razlika između endemskih i neendemskih sela.

## 2.2. Ciljevi istraživanja

1. Odrediti prevalenciju EN i dob bolesnih, sumnjivih , ugroženih i ostalih, te usporediti s podacima iz epidemioloških studija provedenih prije dvadeset godina.
2. Odrediti značaj biljega ranog oštećenja proksimalnog tubula (LAP,  $\alpha$ 1mCR) analizirajući vrijednosti između pojednih SZO podskupina ispitanika
3. Odrediti dijagnostičku vrijednost TGF $\beta$  u mokraći uspoređujući vrijednosti dobivene u pojedinim SZO podskupinama
4. Na temelju dobivenih rezultata predložiti evaluaciju postojećih dijagnostičkih kriterija za EN, tj. uvrštavanje TGF $\beta$  u dijagnostički algoritam

### **3. ISPITANICI I METODE**

### 3.1. Ispitanici

Ovo istraživanje je provedeno u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Endemska nefropatija u Hrvatskoj, epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza“ (108-0000000-0329). Kao dio projekta organizirane su perlustracije u suradnji s Hrvatskim zavodom za javno zdravstvo i Zavodom za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije, a prema Planu i programu mjera Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske uz odobrenje nadležnih etičkih povjerenstava i pismeni informirani pristanak ispitanika.

U istraživanju je sudjelovalo 1140 punoljetnih ispitanika iz triju endemskih (Pričac, Slavonski Kobaš, Živike) i dvaju kontrolnih sela (Klakar, Donja Bebrina). U sklopu istraživanja je proveden opsežan upitnik koji je sadržavao podatke iz osobne i obiteljske anamneze, podatke o duljini boravka u selu/selima, o prehrambenim navikama ispitanika, o načinu obrade zemlje prije 20-30 godina i za vrijeme provođenja upitnika. Svi ispitanici su klinički pregledani te im je izmjerena tjelesna visina i masa iz čega je izračunat indeks tjelesne mase (ITM). Arterijski tlak (AT) je mjereno tri puta Omronovim tlakomjerom (Omron M3 i M6) u sjedećem položaju nakon 5 minuta odmora odgovarajućom manžetom prema preporukama Europskog društva za hipertenziju (152). U sklopu kliničkog pregleda je učinjen i ultrazvuk urotakta. Svim je ispitanicima uzet uzorak krvi natašte i drugi jutarnji uzorak mokraće. Na temelju anamneze, kliničkog pregleda, te određivanjem laboratorijskih pokazatelja bitnih u postavljanju dijagnoze EN – serumskog kreatinina, crvene krvne slike, , proteinurije – albuminurije i  $\alpha$ 1mikroglobulinurije učinjena je klasifikacija ispitanika prema SZO kriterijima u sljedeće skupine (51):

- 1) Bolesni – ispitanici s pozitivnom obiteljskom anamnezom za EN,  $\alpha$ 1mikroglobulinurijom, azotemijom, anemijom ili ispitanici s  $\alpha$ 1mikroglobulinurijom, azotemijom, anemijom ili ispitanici s pozitivnom obiteljskom anamnezom za EN,  $\alpha$ 1mikroglobulinurijom i anemijom uz isključenje drugih bubrežnih bolesti
- 2) Sumnjivi da boluju od endemske nefropatije – ispitanici s pozitivnom obiteljskom anamnezom za EN i  $\alpha$ 1mikroglobulinurijom ili ispitanici s  $\alpha$ 1mikroglobulinurijom i anemijom
- 3) Ugroženi to jest ispitanici pod rizikom od oboljenja – ispitanici s pozitivnom obiteljskom anamnezom za EN
- 4) Ostali – ispitanici koji ne ispunjavaju spomenute kriterije

Posebnu skupinu su činili ispitanici iz neendemskih (kontrolnih) sela.

Kronična bubrežna bolest je klasificirana prema K/DOQI smjernicama (55)

**Tablica 1. Stadiji kronične bubrežne bolesti**

Stupanj	Opis	Glomerularna filtracija (GF) (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )
Nema KBB	Rizični – bolesnici s arterijskom hipertenzijom bez bubrežnog oštećenja i s normalnom GF	≥90
1	Bubrežno oštećenje s normalnom ili ↑ GF + albuminurija ≥ 30 mg/g kreatinina	≥90
2	Bubrežno oštećenje s blagim ↓ GF	60-89
3	Umjereno ↓ GF	30-59
4	Teško ↓ GF	15-29
5	Bubrežna zatajenje	<15 (ili dijaliza)

### 3.2. Metode

Laboratorijska obrada je učinjena u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te određivanje TGFβ i enzimske aktivnosti LAP u Zavodu za eksperimentalnu nefrologiju u laboratoriju za eksperimentalnu hormonologiju Medicinskog fakulteta Slobodnog sveučilišta u Briselu u Belgiji (prof. dr.sc. Jöelle L. Nortier, dr.sc. Marie - Helene Antoine, Cecile Husson, Eric G. De Prez, Živka Dika).

Istraživanje se odvijalo na sljedeći način: 1. dan ispitanicima su bile podijeljene bočice za skupljanje urina te su tada dobili točne upute o davanju uzorka druge jutarnje mokraće; 2. dan liječnici, medicinske sestre i tehničari su otišli u EN selo gdje je ispitanik potpisao suglasnost,



potom je uzeta anamneza i učinjen klinički pregled, te izvađena krv natašte i te uzet uzorak druge jutarnje mokraće. Uzorci mokraće za TGF $\beta$  i LAP su unutar 2 sata od prikupljanja bili centrifugirani, te je TGF $\beta$  odmah bio pohranjen na suhom ledu, dok LAP na 4°C kao i ostatak necentrifugirane mokraće. Uzorci krvi i mokraće su isti dan transportirani u Zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb gdje je učinjena laboratorijska obrada. Uzorci mokraće za TGF $\beta$  su bili pohranjeni u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb u zamrzivaču na -80°C, a uzorci za LAP na -20°C do slanja u Belgiju ponovno za TGF $\beta$  na suhom ledu i LAP s ohlađenim termojastučicama u stiropornim kutijama.

Svakom je ispitaniku izvađeno ukupno 20 mL venske krvi (10 mL epruveta s EDTA za kompletnu krvnu sliku, 10 mL epruveta sa smolom za biokemiju). Kompletna krvna slika je određena prema načelu laserske tehnologije rasipanja svjetlosti (uređaj Sysmex XE 5000), a iz centrifugirane krvi (10 minuta na 3500 okretaja pri sobnoj temperaturi) serumski kreatinin „kontinuiranom“ fotometrijom s alkalnim pikratom (uređaj Olympus AU 2700 analizator, reagens Beckman-Coulter), glukoza u serumu UV fotometrijom s heksokinazom (uređaj Olympus AU 2700 analizator), trigliceridi fotometrijom s glicerolfosfat-oksidadom (GPO-PAP), ukupni kolesterol fotometrijom s kolesterol-oxidazom (CHOD-PAP), HDL- kolesterol homogenom enzimoimunoinhibicijskom metodom te LDL-kolesterol homogenom metodom s CHE i CHO (uređaj Olympus AU 2700 analizator).

Iz uzorka druge jutarnje mokraće je određena mokraća kvalitativno (glukoza, proteini, bilirubin, urobilinogen, pH, specifična težina urina, krv, ketoni, nitriti, leukociti) test trakom (test traka Aution Stick 10EA, uređaj Arkray Aution Max AX 4280), kreatinin u mokraći „kontinuiranom“ fotometrijom s alkalnim pikratom (uređaj Olympus AU 2700 analizator, reagens Beckman-Coulter), te lateks-imunonefelometrijski  $\alpha$ 1mmikroglobulin i albumin u mokraći (uređaj Behring Nephelometer Analyzer II). Iz supernatanta druge jutranje mokraće (centrifugiranje 10 minuta na 1500 okretaja pri sobnoj temperaturi) je određen TGF $\beta$  i leucin aminopeptidaza (LAP).

TGF $\beta$  je određen biološkim testom TGF $\beta$ -osjetljivih BL41 stanica (stanice Burkitt limfoma) s luciferaznom aktivnosti (153). Dobiveni rezultati su izraženi kao količina TGF $\beta$  u ng/g kreatinina u mokraći. Ukratko, 250  $\mu$ L uzorka mokraće se inkubiralo 18 sati s 1 mL BL41 stanica ( $10^6$ /mL). Luciferazna aktivnost se određivala luminometrom (Centro LB 960 Microplate Luminometer, Berthold Technologies GmbH&Co. KG) pomoću kita za luciferazu (Promega, Charbonnieres, Francuska) prema uputama proizvođača. Koncentracija TGF $\beta$  se

izračunavala iz standardnih krivulja luciferazne aktivnosti dobivenih svakim izvođenjem postupka s poznatim različitim koncentracijama razrjeđenih uzoraka. TGFβ specifičnost testa se ispitala tako što se 250μL uzorka mokraće s pozitivnim TGFβom inkubirao jedan sat na 4°C s i bez 0,5μg neutralizirajućih antiTGFβ protutijela (R&D System, Abingdon, Ujedinjeno Kraljevstvo) prije dodavanja stanica.

Količina LAP u mokraći se određivala spektrofotometrijski nakon razjeđivanja uzorka 1:30 s Tris-HCl puferom (pH 7,6). Tako razrjeđeni uzorak mokraće s nepoznatom koncentracijom LAP u mokraći inkubiran je sa sintetskim supstratom leucin-7-amido-4-metil-kumarin (AMC) (Bachem, Bubendorf, Švicarska) na 37°C šezdeset minuta. Nakon zagrijavanja uzorka mokraće na 95°C pet minuta spektrofotometrijski izmjerna je količina oslobođenog AMC pri valnim duljinama od 367 i 440 nm. Izmjerena količina AMC je konvertirana u mU/mL mokraće te je iz kalibracijske krivulje s poznatim koncentracijama LAP u mokraći dobivenih tijekom inkubacije s AMC određena količina LAP u mokraći. (66) Iz uzorka mokraće određen je kreatinin te konačni rezultat LAP izražen po gramu kreatinina (U/g).

Veličina glomerularne filtracije je određena pomoću modificirane MDRD (91,154) i Cockcroft-Gaultove formule (92):

Cockcroft-Gaultova formula:

$GFR = [(140 - \text{dob [u godinama]}) \times \text{tjelesna masa u kg}] / [\text{kreatinin(s) u umol/l}] \times (0.85 \text{ ako žena})$

Modificirana MDRD formula:

$GFR, \text{ u ml/min/1.73 m}^2 = 186.3 \times (\text{kreatinin(s)}^{-1.154}) \times (\text{dob}^{-0.203}) \times (0.742 \text{ ako žena})$

### **3.3 Statističke metode**

Podaci su analizirani statističkim postupcima ispitivanja razlika i povezanosti pomoću SPSS 17 (IBM, Somers, New York). Normalnom raspodjelom kontinuirane varijable smatrala se svedenost i zaobljenost raspodjela manja od 1. Također se pravilnost raspodjele provjerila Smirnov-Kolmogorovljevim testom. Nominalni pokazatelji su prikazani raspodjelom učestalosti po skupinama i udjelom. Za utvrđivanje razlika između dva nezavisna uzorka upotrijebljen je Studentov t test, odnosno Mann-Whitneyev za varijable s nepravilnom raspodjelom, a za utvrđivanje razlika između više od dva nezavisna uzorka upotrijebljena

je ANOVA, te Hochbergov test za post hoc analizu, odnosno Kruskal-Wallisov test i Mann-Whitneyev za post hoc analizu. Za utvrđivanje razlika među proporcijama između više od dva nezavisna uzorka je upotrijebljen Pearsonov  $\chi^2$ , pa  $\chi^2$  za post hoc analizu. Za utvrđivanje povezanosti uzorka je upotrijebljen Spearmanov rho test za neparametrijsku analizu. Za utvrđivanje prediktivnih vrijednosti seta varijabli i omjer izgleda za nefropatiju upotrijebljena je logistička linearna regresija. Prediktivne vrijednosti kontinuiranih varijabli, osjetljivost i specifičnost testa, kao i pozitivni te negativni omjeri vjerojatnosti i prediktivne vrijednosti dobiveni su ROC analizom. Podaci s pravilnom raspodjelom prikazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a s nepravilnom medijanom, najmanjom i najvećom vrijednošću odnosno interkvartilnim rasponom. Statistička značajnost je prihvaćena uz  $P < 0,05$ .

## **3. REZULTATI**

## DEMOGRAFSKI PODACI ISPITANIKA

U ovom istraživanju učestalost bolesnih u endemskim selima (Pričac, Živike, Slavonski Kobaš) je iznosila 4,58%, sumnjivih 9,16%, rizičnih 27,75% te ostalih 58,51%.

U endemskim selima je bilo značajno više žena nego li u kontrolnim selima (61,4 vs. 54,3%,  $\chi^2=5,006$ ,  $P=0,025$ ), dok nije bilo razlike u dobi, duljini boravka u selima i pušenju između endemskih i kontrolnih sela (**Tablica 2.**).

Unutar endemskih sela bilo je značajno više žena u podskupinama sumnjivih ( $Z=4,541$ ,  $P<0,001$ ), rizičnih ( $Z=2,886$   $P=0,004$ ) i ostalih ( $Z=4,212$   $P<0,001$ ), dok nije bilo značajne razlike u raspodjeli muškaraca i žena u kontrolnim selima ( $Z=1,652$   $P=0,098$ ) i podskupini bolesnih ( $Z=0,846$ ,  $P=0,398$ ).

U endemskim selima nije bilo razlike u dobi između bolesnih i sumnjivih te su obje podskupine bile značajno starije od rizičnih i ostalih u endemskim selima kao i od ispitanika u kontrolnim selima. Rizični su bili mlađi od ispitanika u kontrolnim selima, dok nije bilo dobne razlike između rizičnih i ostalih u endemskim selima.

S obzirom na boravak u selu nije nađena razlika između bolesnih i sumnjivih te obje podskupine su duže boravile u selu od preostalih ispitivanih podskupina. Podskupina ostali najkraće je boravila u selima i to značajno kraće od rizičnih u endemskim selima s jedne strane te ispitanika u kontrolnim selima s druge strane. Bolesni i sumnjivi se nisu razlikovali u učestalosti pozitivne obiteljske anamneze ( $P=0,075$ ) te spomenute podskupine su pušile manje cigareta od preostalih ispitivanih podskupina (svi  $P<0,05$ ). (**Tablica 3.**)

**Tablica 2. Demografski podaci ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela**

	Endemska sela	Kontrolna sela	Statistika
Spol muškarci/žene (m %)	295/469 (38,6)	172/204 (45,7)	P=0,021 $\chi^2=5,3$
Dob (godine)*	52 (19-91)	50 (19-93)	P=0,389 Z=0,861
Boravak u selu (godine)*	45 (0-91)	45 (1-90)	P=0,922 Z=0,098
Pozitivna obiteljska anamneza za EN (%)	38,2	1,1	P<0,001 $\chi^2=180,972$
Pušači (%)	23,5	18,6	P=0,147 $\chi^2=2,106$

\*C (minimalno – maksimalno)

**Tablica 3. Demografski podaci ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

	Bolesni <sup>a</sup>	Sumnjivi <sup>b</sup>	Rizični	Ostali	Kontrolna sela	Statistika
Spol muškarci/žene (m %)	15/20 (42,9)	16/54 (22,9)	85/127 (40,1)	179/268 (40)	172/204 (45,7)	P=0,01 $\chi^2=13,318$
Dob (godine)*	73 (35-85)	68 (21-91)	46 (19-88)	50 (19-87)	50 (19-93)	P<0,001 Z=100,434
Boravak u selu (godine)*	68,5 (35-85)	66,5 (16-91)	43 (2-88)	40 (0-84)	45 (1-90)	P<0,001 Z=103,878
Pozitivna obiteljska anamneza za EN (%)	65,7	81,4	100	0	1,1	a. vs.b P=0,075 $\chi^2=3,176$
Pušači (%)	11,5	8,8	25,5	26	18,6	P=0,011 $\chi^2=13,01$

\*C (minimalno – maksimalno)

## KLINIČKA OBILJEŽJA ISPITANIKA

Ispitanici u kontrolnim selima su imali viši SAT i opseg struka nego ispitanici u EN selima, dok između ispitivanih grupa nije bilo razlike u DAT, srčanoj frekvenciji i ITM. (**Tablica 4.**)

Bolesni su imali viši SAT od rizičnih ( $p < 0.001$ ) i ostalih u EN selima ( $p = 0,026$ ), a sumnjivi viši SAT od rizičnih ( $P < 0.001$ ) i ispitanika u kontrolnim selima ( $p = 0.048$ ). Ispitanici u kontrolnim selima su imali viši SAT od rizičnih ( $P < 0.001$ ), dok nije bilo razlike u SAT između sumnjivih i bolesnih kao niti između sumnjivih i ostalih te između rizičnih i ostalih (svi  $P > 0.05$ ). Između svih ispitivanih skupina nisu nađene razlike u DAT, srčanoj frekvenciji i ITM (svi  $P > 0.05$ ).

Ispitanici u kontrolnim selima su imali značajno veći opseg struka nego li ispitanici u podskupinama rizičnih i ostalih (svi  $P < 0.05$ ), dok između preostalih ispitivanih podskupina nije bilo razlike u opsegu struka (**Tablica 5.**).



**Tablica 4. Klinička obilježja ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela**

	Endemska sela N X (SD)	Kontrolna sela N X (SD)	Statistika
SAT (mm Hg)	581 137,22 (23,30)	203 142,86 (24,37)	P=0,003 t =2,934
DAT (mm Hg)	581 82,16 (12,48)	203 83,18 (12,8)	P=0,318 t =1
Srčana frekvencija (otkucaji/min)	570 77,8 (12,211)	201 77 (12,5)	P=0,437 t =0,778
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	739 27,44 (5,25)	245 28,17 (5,42)	P=0,062 t =1,865
Opseg struka (cm)*	764 94 (84-104)	253 99 (88-109)	P<0,001 Z=-3,9

\*C (25.-75. P.)

**Tablica 5. Klinička obilježja ispitanika iz iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

	Bolesni N X (SD)	Sumnjivi N X (SD)	Rizični N X (SD)	Ostali N X (SD)	Kontrolna sela N X (SD)	Statistika
SAT (mm Hg)	26 151,21 (25,76)	59 146,05 (24,93)	152 131,42 (19,42)	344 137,21 (23,57)	203 142,86 (24,37)	P<0,001 F =9,083
DAT (mm Hg)	26 79,46 (12,55)	59 83,81 (12,88)	152 81,86 (12,33)	344 82,22 (12,48)	203 83,18 (12,8)	P=0,509 F =0,826
Srčana frekvencija (otkucaji/min)	25 76,8 (13,2)	58 80,3 (13,8)	149 76,3 (12,4)	338 78,1 (11,7)	201 77 (12,5)	P=0,245 F =1,363
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	28 27,77 (5,18)	68 27,84 (5,99)	206 27,84 (5,05)	437 27,17 (5,22)	245 28,17 (5,42)	P=0,179 F =1,575
Opseg struka (cm)*	35 98 (75-105)	70 93 (84-104)	212 96 (85-104)	447 93 (84-103)	253 99 (88-109)	P=0,003 H=16,282

\*C (25.-75. P.)

## LABORATORIJSKI POKAZATELJI ISPITANIKA

U ovom istraživanju nisu nađene razlike u parametrima krvne slike između ispitanika iz EN sela s jedne strane s ispitanicima iz kontrolnih sela s druge strane (**Tablica 6.**). Također nije bilo razlike u spomenutim parametrima niti između pojednih podskupina ispitanika iz EN sela kao niti između svake pojednine podskupine iz EN sela s ispitanicima iz kontrolnih sela (**Tablica 7.**).

Ispitanici u kontrolnim selima su imali više koncentracije glukoze u serumu od ispitanika iz EN sela, dok nije bilo razlike između ispitivanih skupina u lipidnim parametrima (**Tablica 8.**).

Također nisu nađene razlike u ukupnom kolesterolu, LDL-kolesterolu i trigliceridima između pojednih podskupina iz EN sela kao niti između spomenutih pojednih podskupina s ispitanicima u kontrolnim selima (Tablica 8.). Bolesni i sumnjivi u EN selima kao i ispitanici iz kontrolnih sela su imali značajno više koncentracije glukoze u serumu u odnosu prema ispitanicima iz podskupina rizičnih i ostalih iz EN sela (svi  $P < 0,05$ ), dok nije bilo razlika u glukozu između bolesnih, sumnjivih te ispitanika iz kontrolnih sela.

Iako su bolesni imali najniži HDL-kolesterol i najviše trigliceride (TG) u cijelom ispitivanom uzorku, jedina statistički značajna razlika je bila u HDLkolesterol i to između bolesnih i rizičnih u EN selima ( $P=0,045$ ) te između bolesnih i ispitanika u kontrolnim selima ( $P=0,042$ ). (**Tablica 9.**)

Nije bilo razlika u laboratorijskim pokazateljima mokraće test trakom između ispitanika iz kontrolnih i EN sela (**Tablica 10.**). Također nije bilo statistički značajne razlike između pojednih podskupina u EN selima te između pojednih spomenutih podskupina i ispitanika iz kontrolnih sela u učestalosti pozitivnog nalaza eritocita u mokraći, iako je opažen trend opadanje učestalosti eritociturije od bolesnih prema rizičnim, ostalim i kontrolnim podskupinama (**Tablica 11.**).

**Tablica 6. Laboratorijski pokazatelji krvne slike u ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela**

	Endemska sela N C (25.-75. P.)	Kontrolna sela N C (25.-75. P.)	Statistika
Eritrociti ( $10^{12}/L$ )	757 4,66 (4,34-4,99)	265 4,69 (4,39-4,96)	P=0,64 Z=-0,467
Hemoglobin* (g/L)	757 134,55 (16,7)	266 136,05 (13,67)	P=0,15 t=1,442
Hematokrit (L/L)	757 0,41 (0,38-0,43)	266 0,41 (0,38-0,43)	P=0,881 Z=-0,149
Leukociti ( $10^{12}/L$ )	762 5,9 (4,7-7,2)	264 5,75 (4,8-6,9)	P=0,286 Z=-1,068

\*X (SD)

**Tablica 7. Laboratorijski pokazatelji krvne slike u ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

	Bolesni N C (25.- 75. P.)	Sumnjivi N C (25.- 75. P.)	Rizični N C (25.- 75. P.)	Ostali N C (25.- 75. P.)	Kontrolna sela N C (25.-75. P.)	Statistika	
Eritrociti ( $10^{12}/L$ )	35 4,61 (4,31- 4,93)	69 4,67 (4,35- 4,92)	208 4,65 (4,38- 5,02)	445 4,67 (4,34- 4,99)	265 4,69 (4,39-4,96)	H=1,495	P=0,827
Hemoglobin* (g/L)	35 134,14 (16,15)	69 132,65 (17,43)	208 135,62 (16,77)	445 134,38 (16,62)	265 136,05 (13,67)	F=0,924	P=0,449
Hematokrit (L/L)	35 0,41 (0,38- 0,43)	69 0,4 (0,36- 0,43)	208 0,41 (0,38- 0,44)	445 0,41 (0,38- 0,43)	266 0,41 (0,38-0,43)	H=1,899	P=0,754
Leukociti ( $10^{12}/L$ )	34 6,1 (3,8-6,8)	70 5,9 (4,7-7,8)	208 5,8 (4,8-6,8)	446 5,9 (4,7-7,3)	264 5,75 (4,8-6,9)	H=3,548	P=0,471

\*X (SD)

**Tablica 8. Laboratorijski pokazatelji ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela u krvi**

	Endemska sela N C (25.-75. P.)	Kontrolna sela N C (25.-75. P.)	Statistika
Glukoza u serumu (mmol/L)	764 5 (4,7-5,6)	263 5,2 (4,8-5,8)	P=0,006 Z=-2,766
Kolesterol ukupni* (mmol/L)	764 5,67 (1,23)	263 5,65 (1,2)	P=0,828 t=-0,217
HDL-CL* (mmol/L)	764 1,53 (0,38)	263 1,57 (0,43)	P=0,148 t=1,45
LDL-CL (mmol/L)	763 3,4 (2,7-4,1)	262 3,2 (2,7-3,9)	P=0,126 Z=-1,528
TG (mmol/L)	764 1,27 (0,92-1,86)	263 1,37 (0,96-1,92)	P=0,111 Z=-1,592

\*X (SD)

**Tablica 9. Laboratorijski pokazatelji ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima u krvi**

	Bolesni N C (25.-75. P.)	Sumnjivi N C (25.-75. P.)	Rizični N C (25.- 75. P.)	Ostali N C (25.- 75. P.)	Kontrolna sela N C (25.-75. P.)	Statistika
Glukoza u serumu (mmol/L)	35 5,3 (4,8-5,9)	70 5,3 (4,9-5,8)	212 4,9 (4,5-5,4)	447 5,1 (4,7-5,7)	263 5,2 (4,8-5,8)	P<0,001 H=26,832
Kolesterol ukupni* (mmol/L)	35 5,62 (1,2)	70 5,89 (1,29)	212 5,61 (1,26)	447 5,66 (1,21)	263 5,65 (1,2)	P=0,565 F=0,739
HDL-CL* (mmol/L)	35 1,37 (0,37)	70 1,56 (0,36)	212 1,57 (0,4)	447 1,51 (0,37)	263 1,57 (0,43)	P=0,023 F=2,853
LDL-CL (mmol/L)	35 3,3 (2,9-4)	70 3,7 (3,1-4,3)	212 3,2 (2,7-4)	447 3,4 (2,7-4,2)	262 3,2 (2,7-3,9)	P=0,072 H=8,581
TG (mmol/L)	35 1,66 (1,09-2,17)	70 1,25 (1-1,86)	212 1,21 (0,84-1,77)	447 1,27 (0,92-1,87)	263 1,37 (0,96-1,92)	P=0,082 H=8,29

\*X (SD)

**Tablica 10. Laboratorijski pokazatelji mokraće test trakom u ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela**

	Endemska sela N=760	Kontrolna sela N=358	Statistika
Eritrociti u mokraći % pozitivnih nalaza	5,1	5,9	P=0,587 $\chi^2=1,929$
Leukociti u mokraći % pozitivnih nalaza	16,4	13,7	P=0,743 $\chi^2=1,959$
Nitriti u mokraći % pozitivnih nalaza	4,7	6,7	P=0,312 $\chi^2=2,33$



**Tablica 11. Laboratorijski pokazatelji mokraće test trakom u ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

	Bolesni N=35	Sumnjivi N=70	Rizični N=211	Ostali N=444	Kontrolna sela N=358	Statistika	
Eritrociti u mokraći % pozitivnih nalaza	14,3	8,6	4,7	4,1	5,9	Pearsonov $\chi^2=15,554$	P=0,213
Leukociti u mokraći % pozitivnih nalaza	14,3	27,1	11,8	17,1	13,7	Pearsonov $\chi^2=27,326$	P=0,038
Nitriti u mokraći % pozitivnih nalaza	8,6	12,9	2,8	4,1	6,7	Pearsonov $\chi^2=28,671$	P<0,001

## OBILJEŽJA BUBREŽNE FUNKCIJE ISPITANIKA

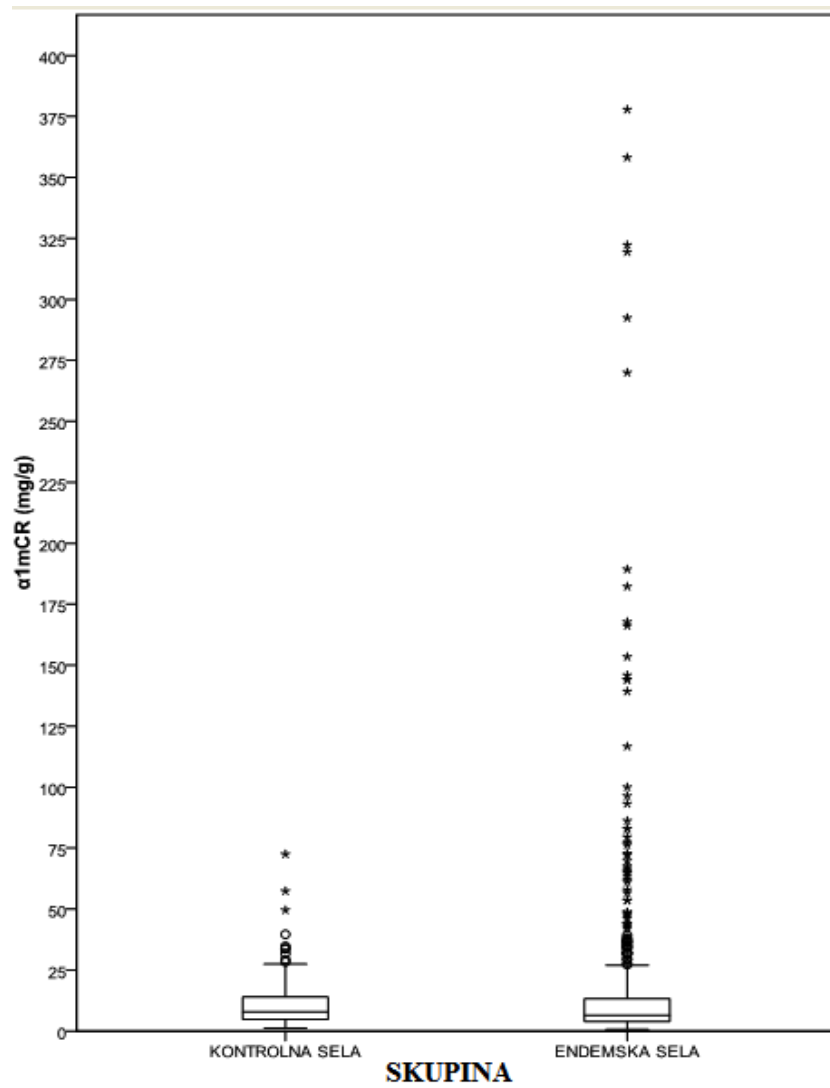
U **tablici 12.** opisana su obilježja bubrežne funkcije ispitanika iz kontrolnih i EN sela. Nije bilo značajne razlike između obje grupe sela u ACR, natrijuriji, kalijuriji i specifičnoj težini mokraće. Ispitanici u kontrolnim selima imali su više eGFR prema MDRD i Cockcroft-Gaultu kao i više vrijednosti  $\alpha$ 1mCR. (**Slika 7.**)

U ovom istraživanju bolesni su imali najviši kreatinin u serumu,  $\alpha$ 1mCR i ACR, najniži eGFR (MDRD i Cockcroft Gault) i najrazrijeđeniju mokraću s najnižim koncentracijama natrija i kalija u mokraći (**Tablica 13.**). Uz prethodno spomenutu podskupinu bolesnih, sumnjivi su također imali viši serumski kreatinin,  $\alpha$ 1mCR, ACR te niži eGFR (**Slika 8.**) i nižu specifičnu težinu mokraće u odnosu na preostale ispitivane podskupine (svi  $P < 0,001$ ), dok nije bilo razlike u ACR i specifičnoj težini mokraće između bolesnih i sumnjivih, kao niti između rizičnih, ostalih i ispitanika iz kontrolnih sela (**Slika 9. i Slika 10.**). Bolesni su imali značajno viši serumski kreatinin i niži eGFR od sumnjivih ( $P < 0,001$ ), dok nije bilo razlike u spomenutim parametrima između rizičnih, ostalih i ispitanika iz kontrolnih sela (svi  $P > 0,05$ ). Ispitanici u kontrolnim selima su imali viši  $\alpha$ 1mCR od ispitanika u podskupinama ostalih i rizičnih u EN selima (svi  $P < 0,05$ ) (**Slika 11.**).

**Tablica 12. Obilježja bubrežne funkcije ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela**

	Endemska sela N X (SD)	Kontrolna sela N X (SD)	Statistika
Kreatinin u serumu* ( $\mu\text{mol/L}$ )	764 85 (76-98)	267 78 (70-89)	P<0,001 Z=-6,918
Klirens kreatinina (MDRD) mL/min/1,73m <sup>2</sup>	764 72,4 (19,53)	267 80,52 (15,86)	P<0,001 t=6,76
Klirens kreatinina <60 mL/min (MDRD) (%)	20,2	5,1	P<0,001 $\chi^2=43,365$
Klirens kreatinina (Cockcroft-Gault) mL/min	744 87,37 (32,5)	243 98,02 (29,67)	P<0,001 t=4,532
Klirens kreatinina<60 mL/min (Cockfrot-Gault) (%)	20	4,8	P<0,001 $\chi^2=44,553$
ACR (mg/g)*	764 6,15 (4,02-12,43)	363 6,37 (4,3-12,84)	P=0,376 Z=-0,885
$\alpha 1\text{mCR}^*$ (mg/g)	715 6,45 (3,93-13,26)	224 7,76 (4,72-13,88)	P=0,032 Z=-2,149
$\alpha 1\text{mCR} >15 \text{ mg/g}$ (%)	20,8	22,8	P=0,538 Pearsonov $\chi^2=0,379$
$\alpha 1\text{mCR} >23,5 \text{ mg/g}$ (%)	13,1	7,6	P=0,025 Pearsonov $\chi^2=5,054$
$\alpha 1\text{mCR} >31,5 \text{ mg/g}$ (%)	9,7	3,6	P=0,004 Pearsonov $\chi^2=8,373$
Natrijuriija (mmol/L)	674 152,31 (55,88)	230 149,97 (55,58)	P=0,584 t=-0,548
Kalijuriija (mmol/L)	674 45,4 (26,32)	230 47,7 (28,81)	P=0,264 t=1,117
Specifična težina urina	762 1,014 (0,008)	362 1,015 (0,008)	P=0,509 t=0,661

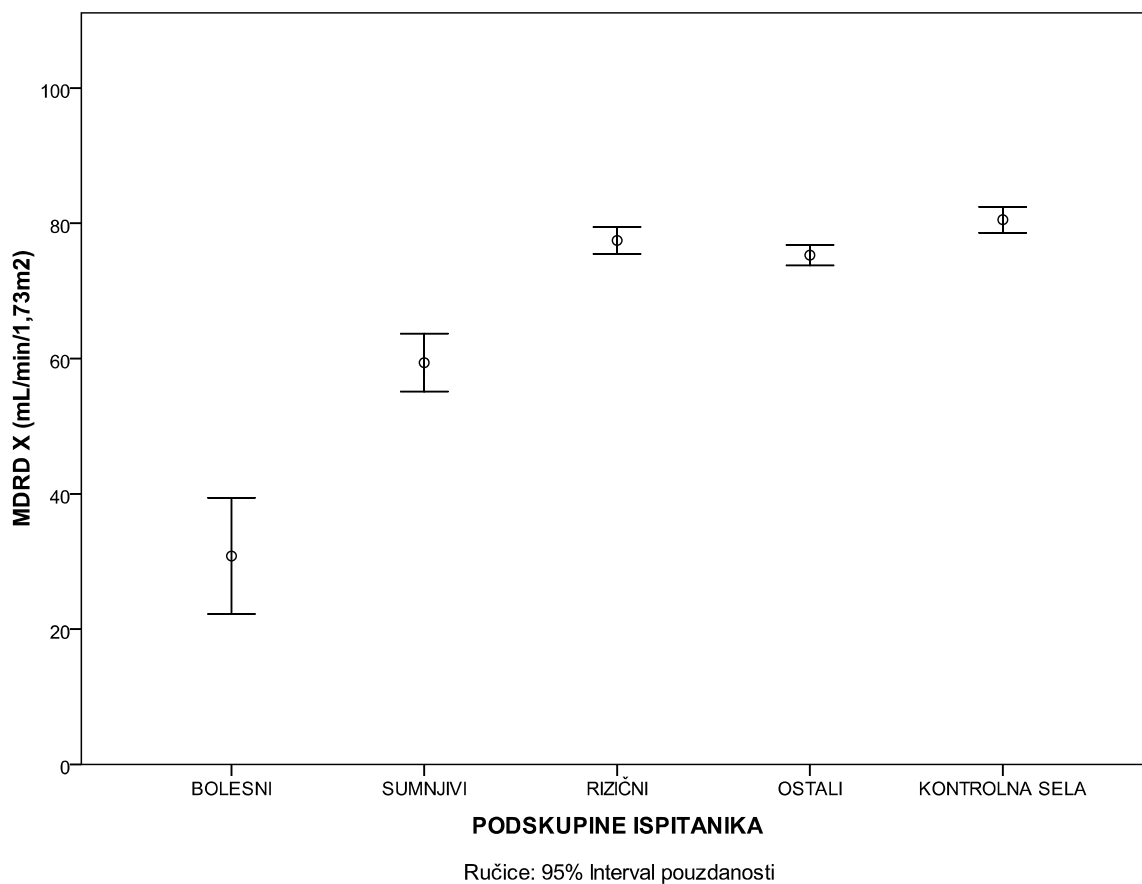
\*C (25.-75. P.)



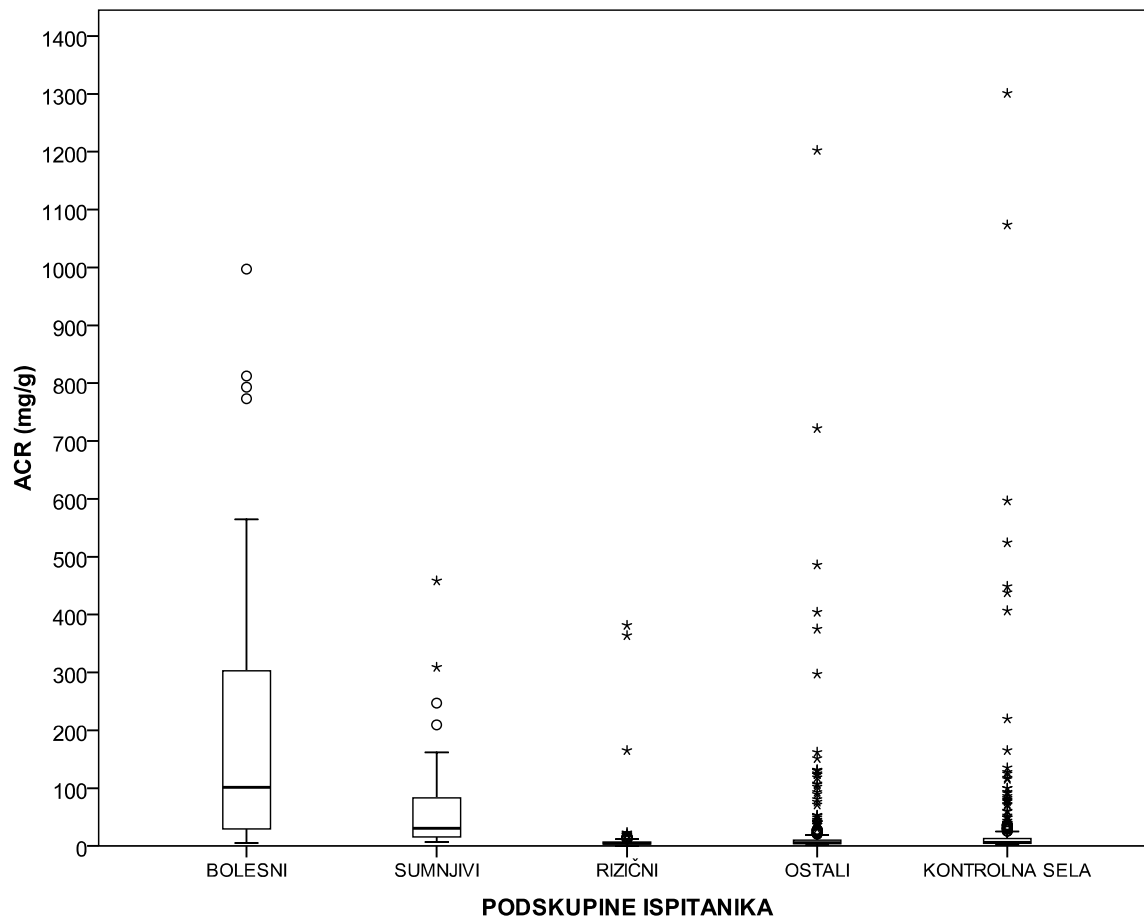
Slika 7.  $\alpha 1\text{mCR}$  ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela

**Tablica 13. Obilježja bubrežne funkcije ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

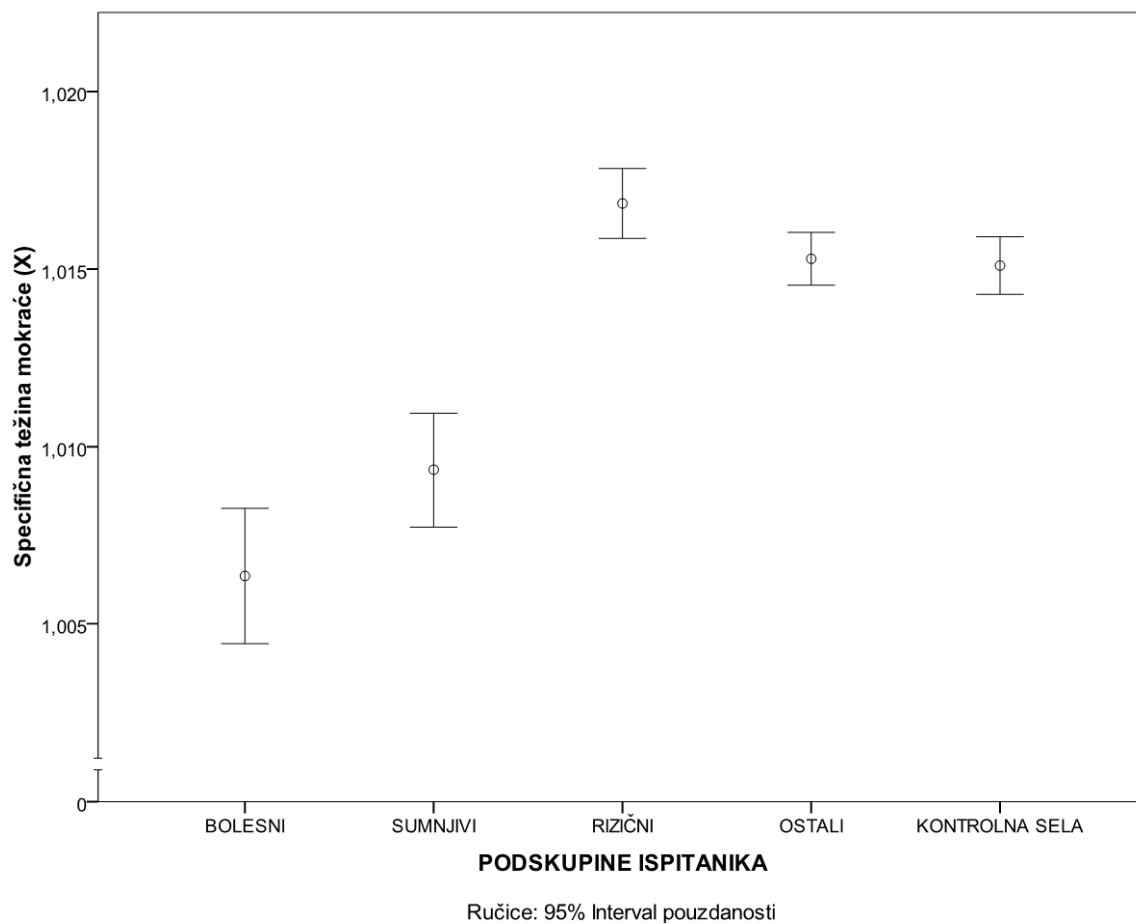
	Bolesni N X (SD)	Sumnjivi N X (SD)	Rizični N X (SD)	Ostali N X(SD)	Kontrolna sela N X (SD)	Statistika
Kreatinin u serumu ( $\mu\text{mol/L}$ )	35 194 (131- 558)	70 92 (79-114)	212 82 (76-94)	447 84 (75-95)	267 78 (70-89)	P<0,001 H=120,4
Klirens kreatinina (MDRD) ( $\text{mL/min/1,73m}^2$ )	35 30,81 (25)	70 59,4 (17,91)	212 77,46 (14,79)	447 75,3 (16,39)	267 80,52 (15,86)	P<0,001 F=87,812
Klirens kreatinina <60 $\text{mL/min}$ (MDRD) (%)	88,6	50	10,4	15,4	5,1	P<0,001 Pearsonov $\chi^2=242,659$
Klirens kreatinina (Cockcroft-Gault) ( $\text{mL/min}$ )	29 34,9 (32,47)	68 64,24 (27,97)	206 99,8 (26,94)	441 88,58 (30,35)	243 98,02 (29,67)	P<0,001 F=49,023
Klirens kreatinina <60 $\text{mL/min}$ (Cockcroft-Gault %)	68,6	52,9	7,1	17,2	4,8	P<0,001 Pearsonov $\chi^2=200,402$
ACR ( $\text{mg/g}$ )*	35 101,14 (29,28- 318,75)	70 30,5 (15,76- 82,89)	212 4,84 (3,57- 6,97)	447 5,88 (3,95- 10,14)	363 6,37 (4,3- 12,84)	P<0,001 H=205,311
$\alpha 1\text{mCR}$ ( $\text{mg/g}$ )*	29 72,83 (31,68- 182,22)	65 19,99 (8,33- 31,92)	198 6,14 (3,58- 8,5)	423 6,16 (3,82- 11,23)	224 7,76 (4,72- 13,88)	P<0,001 H=129,715
$\alpha 1\text{mCR} >15 \text{ mg/g}$ (%)	86,2	64,6	8,6	15,4	22,8	P<0,001 Pearsonov $\chi^2=173,905$
$\alpha 1\text{mCR} >23,5 \text{ mg/g}$ (%)	75,9	40,0	5,1	8,5	7,6	P<0,001 Pearsonov $\chi^2=180,620$
$\alpha 1\text{mCR} >31,5 \text{ mg/g}$ (%)	75,9	26,2	2,5	5,9	3,6	P<0,001 Pearsonov $\chi^2=221,993$
Natrijurija ( $\text{mmol/L}$ )	28 120,11 (41,15)	138,71 (47,42)	156,34 (58,88)	154,78 (55,62)	149,97 (55,58)	P=0,004 F=3,82
Kalijurija ( $\text{mmol/L}$ )	28 25,29 (10,3)	62 35,42 (20,16)	194 50,11 (26,87)	390 46,09 (26,7)	230 47,7 (28,81)	F=8,113 P<0,001
Specifična težina urina	35 1,006 (0,006)	70 1,009 (0,007)	212 1,017 (0,007)	445 1,015 (0,008)	362 1,015 (0,008)	P<0,001 F=23,993



**Slika 8. eGFR prema MDRD jednadžbi po podskupinama iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

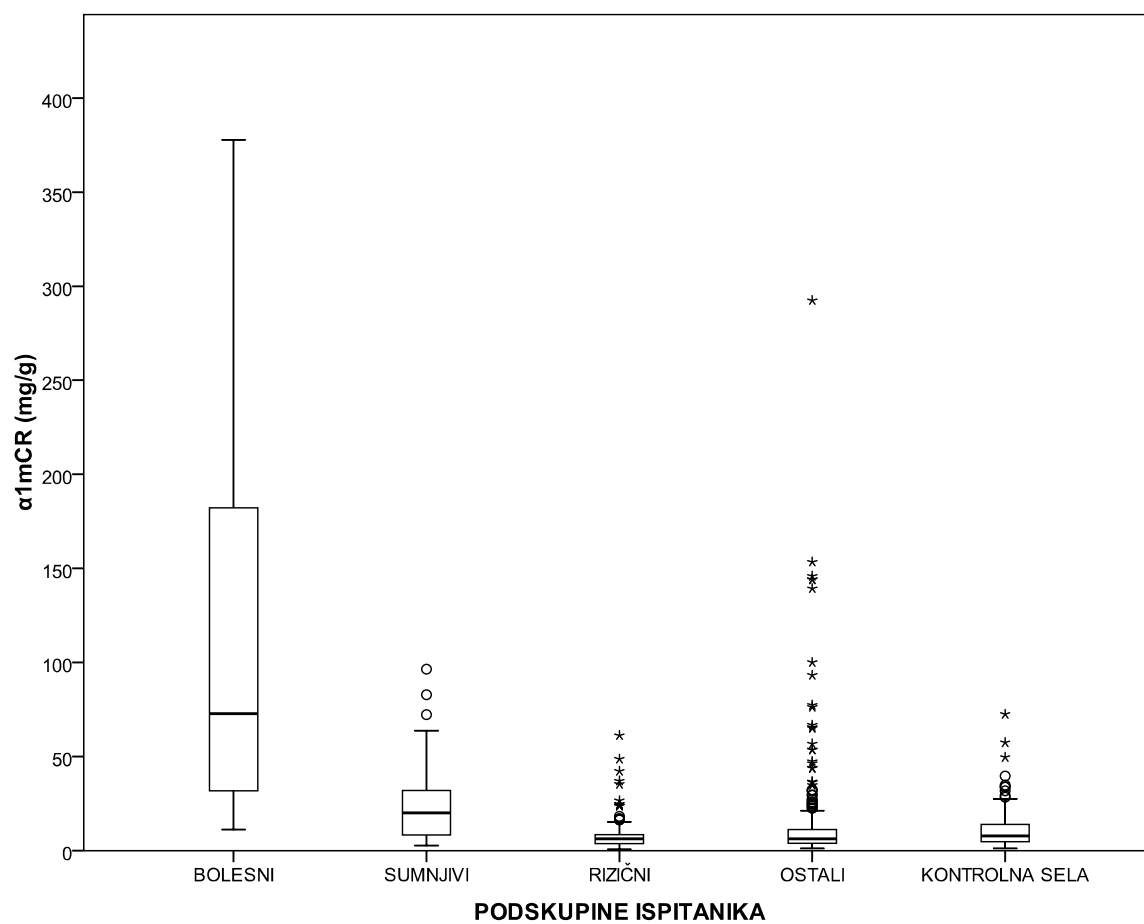


**Slika 9. ACR po podskupinama iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**



**Slika 10. Specifična težina mokraće po podskupinama iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**





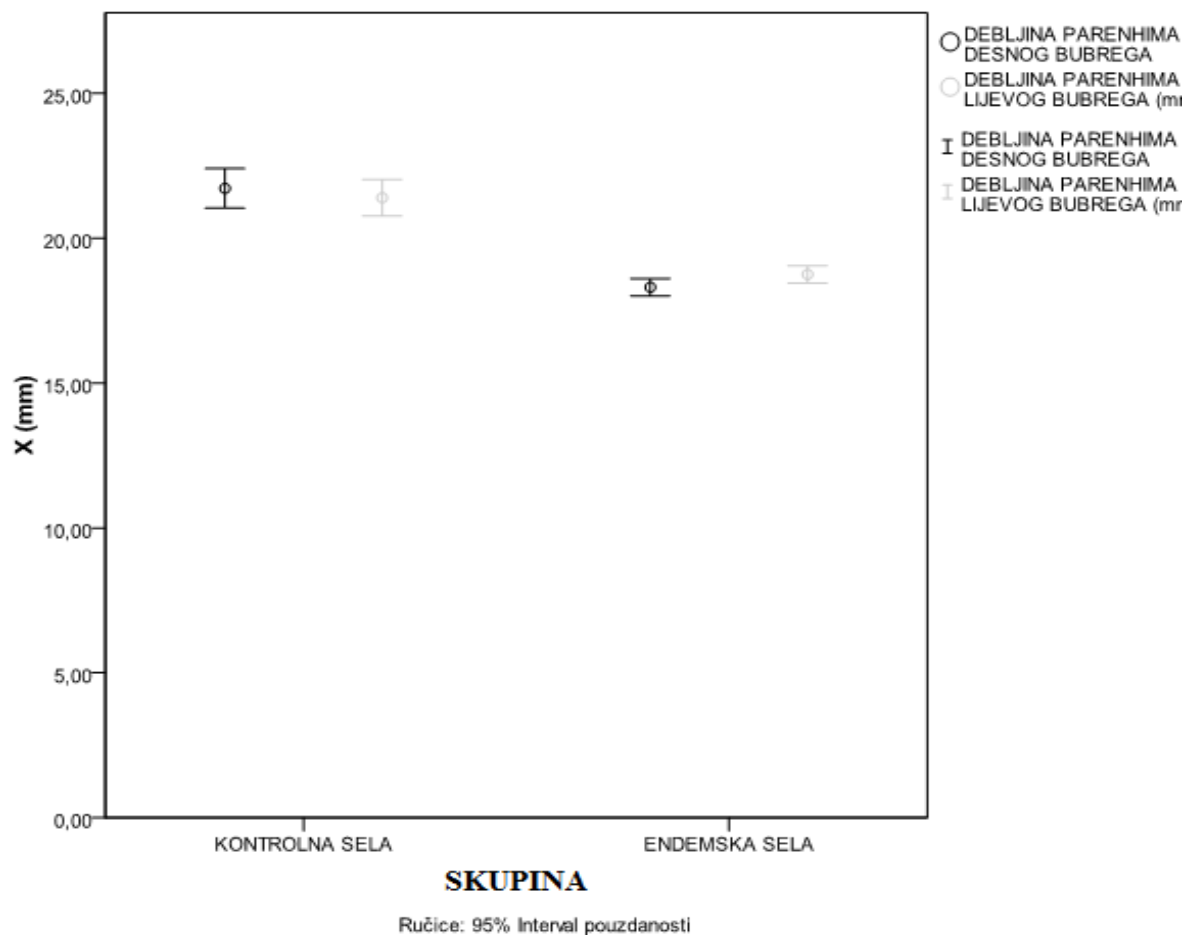
**Slika 11. α1mCR po podskupinama iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

## ULTRAZVUČNA OBILJEŽJA BUBREGA ISPITANIKA

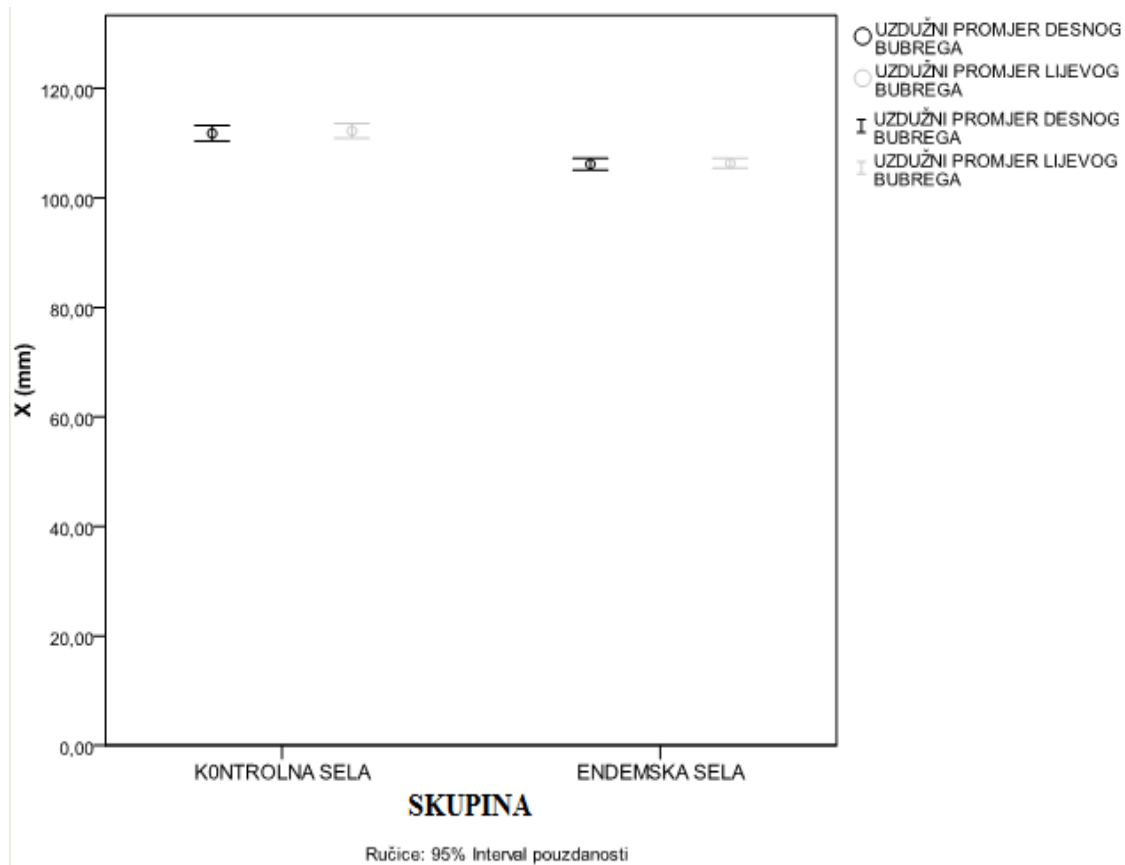
Ispitanici u kontrolnim selima su imali u odnosu na ispitanike u EN selima značajno veću debljinu parenhima (**Slika 12.**) kao i uzdužnih promjera (**Slika 13.**) oba bubrega. (**Tablica 14.**)

Uzdužni promjeri oba bubrega su bili značajno manji u bolesnih u usporedbi sa svim preostalim ispitivanim podskupinama (svi  $P < 0,001$ ). (**Slika 14.**) Sumnjivi su imali manje uzdužne promjere bubrega u odnosu na rizične i ostale ispitanike u EN selima kao i na ispitanike u kontrolnim selima, dok su ispitanici u kontrolnim selima imali značajno veći uzdužni promjer lijevog bubrega u usporedbi s ispitanicima iz podskupine ostali ( $P < 0,001$ ) te rizični ( $P = 0,011$ ). (**Tablica 15.**)

Debljina parenhima oba bubrega je bila manja u bolesnih u odnosu ispitanike iz preostalih ispitivanih podskupina (svi  $P < 0,001$ ). (**Slika 15.**) U sumnjivih debljina parenhima je bila manja od onih u rizičnih, ostalih i ispitanika u kontrolnim selima, Nije bilo razlike u debljini parenhima oba bubrega između rizičnih i ostalih u EN selima (lijevi bubreg  $P = 0,425$ , desni bubreg  $P = 0,108$ ), dok ispitanici u kontrolnim selima su imali značajno veću debljinu parenhima oba bubrega u odnosu na obje spomenute podskupine rizičnih i ostalih u EN selima (svi  $P < 0,001$ ). (**Tablica 15.**)



**Slika 12. Debljina parenhima oba bubrega ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela**



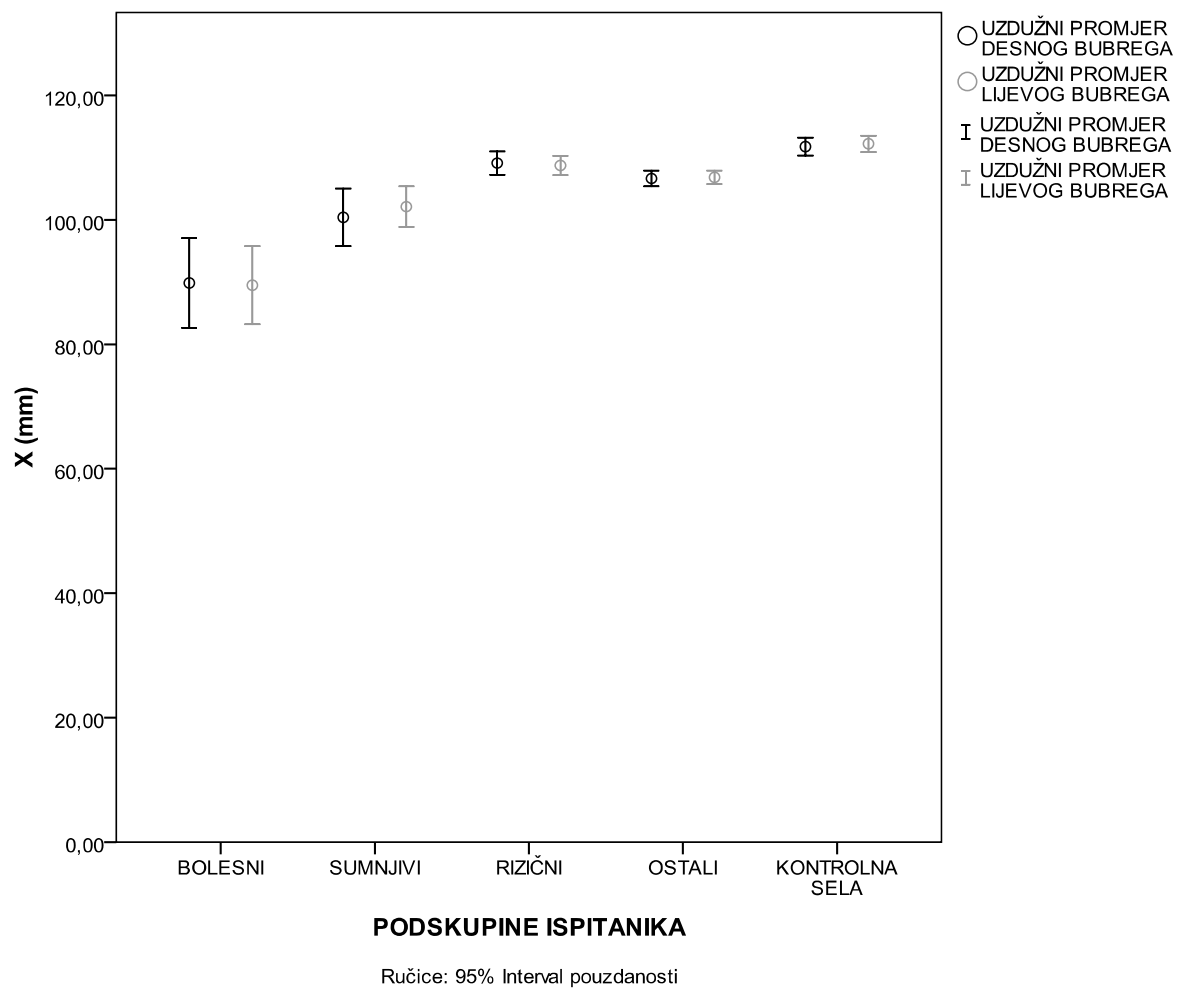
Slika 13. Uzdužni promjeri oba bubrega ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela

**Tablica 14. Ultrazvučna obilježja bubrega ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela**

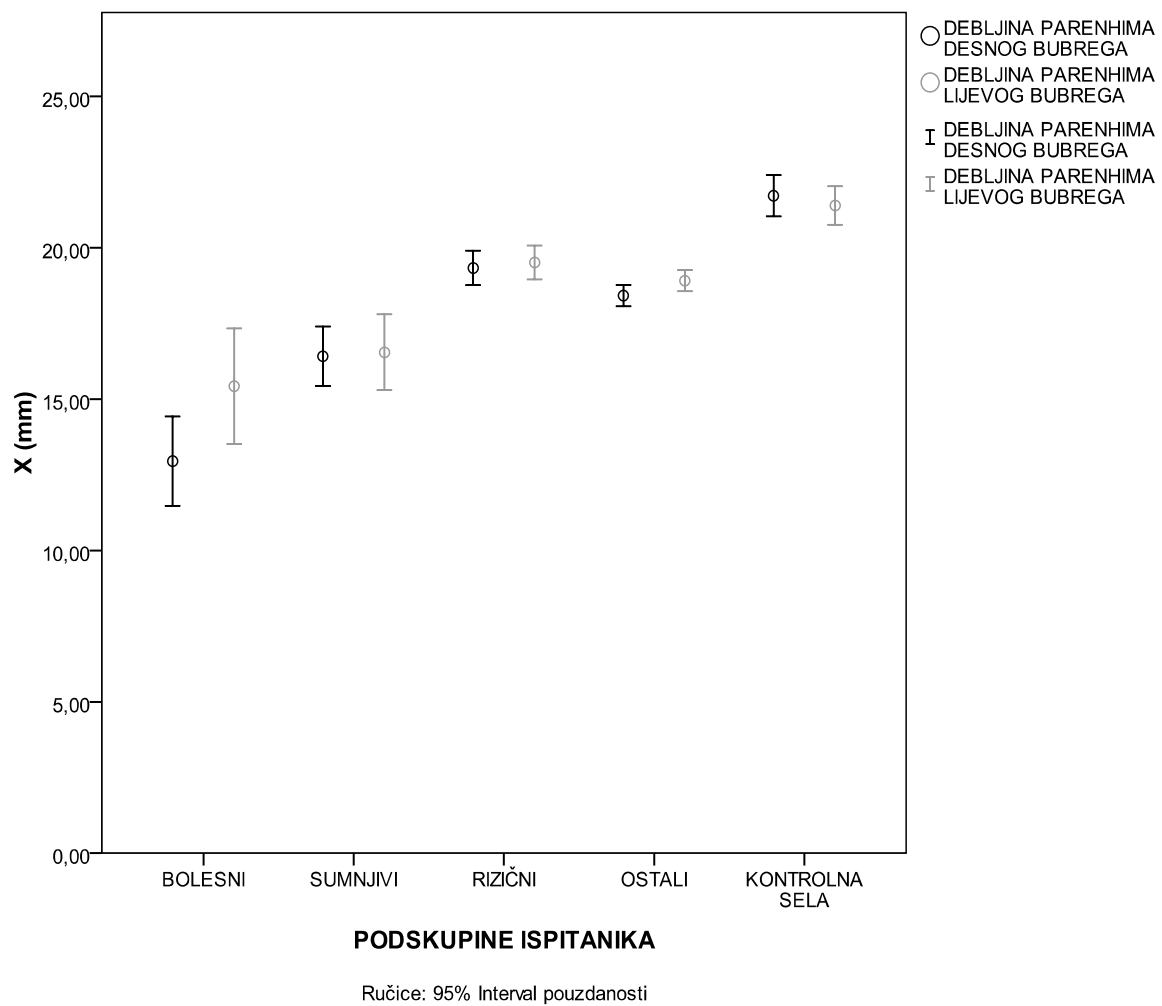
	Endemska sela N X (SD)	Kontrolna sela N X (SD)	Statistika
Debljina parenhim desnog bubrega (mm)	601 18,28 (3,72)	208 21,81 (5,14)	P<0,001 t=9,105
Debljina parenhim lijevog bubrega (mm)	609 18,73 (3,77)	210 21,42 (4,59)	P<0,001 t=7,666
Uzdužni promjer desnog bubrega (mm)	603 106,15 (13,31)	208 111,97 (10,58)	P<0,001 t=5,711
Uzdužni promjer lijevog bubrega (mm)	610 106,21 (11,31)	209 112,22 (9,6)	P<0,001 t=7,449

**15. Ultrazvučna obilježja bubrega ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

	Bolesni N X (SD)	Sumnjivi N X (SD)	Rizični N X (SD)	Ostali N X (SD)	Kontrolna sela N X (SD)	Statistika
Debljina parenhim desnog bubrega (mm)	25 12,92 (3,11)	54 16,5 (3,59)	169 19,33 (3,77)	353 18,43 (3,34)	208 21,81 (5,14)	P<0,001 F=47,628
Debljina parenhim lijevog bubrega (mm)	24 15,54 (4,1)	58 16,78 (4,68)	169 19,51 (3,69)	358 18,89 (3,41)	210 21,42 (4,59)	P<0,001 F=27,934
Uzdužni promjer desnog bubrega (mm)	25 90,24 (15,95)	54 100,61 (16,41)	168 109,14 (12,18)	356 106,69 (12,09)	208 111,97 (10,58)	P<0,001 F=24,835
Uzdužni promjer lijevog bubrega (mm)	26 89,08 (13,04)	57 102,07 (11,74)	169 108,75 (10,12)	358 106,91 (10,43)	209 112,22 (9,6)	P<0,001 F=36,171



**Slika 14. Uzdužni promjeri oba bubrega ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**



**Slika 15. Debljina parenhima oba bubrega ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**



## **TGFβ I LAP U MOKRAĆI ISPITANIKA**

Nije bilo razlike u TGFβ između EN i kontrolnih sela, dok je enzimska aktivnost LAP je bila veća u kontrolnim selima. (**Tablica 16.**)

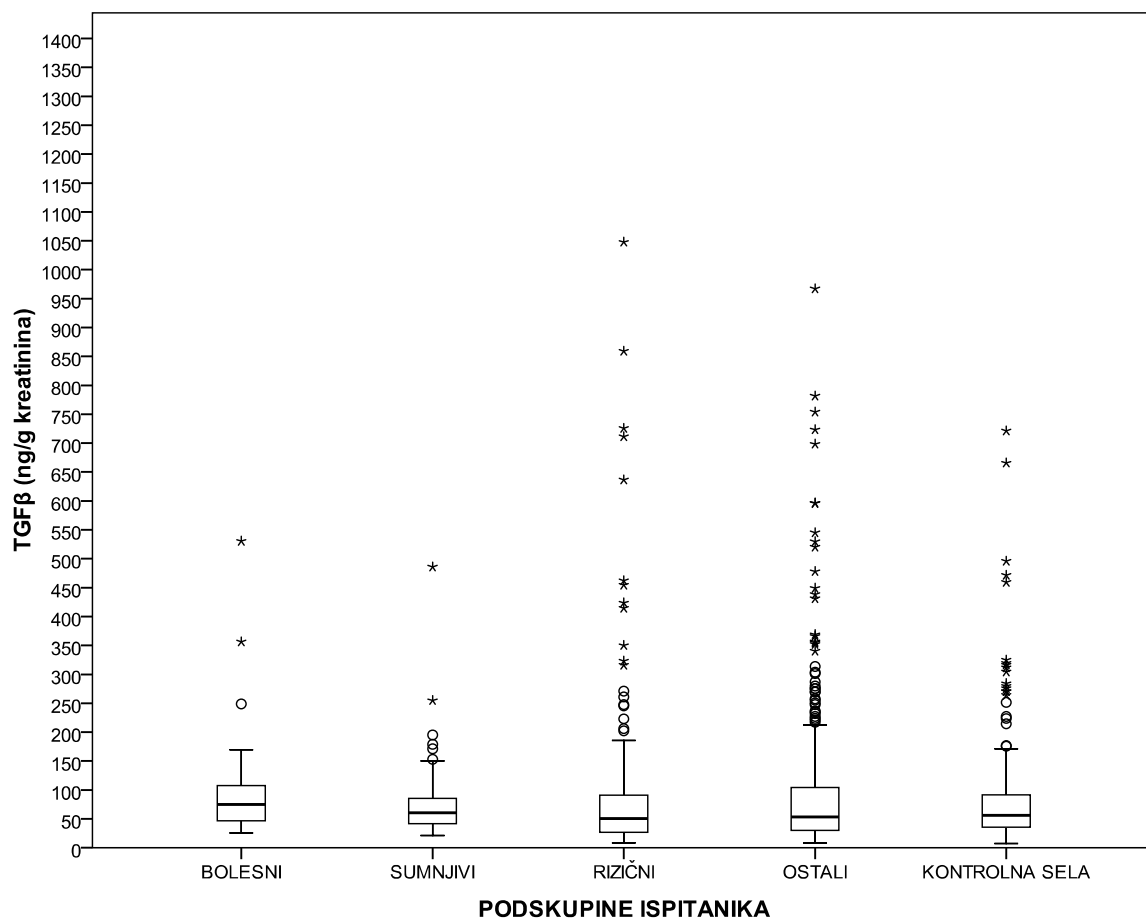
Između ispitivanih podskupina u EN selima te između pojedinih podskupina iz EN sela s ispitanicima iz kontrolnih sela nije bilo statistički značajne razlike u TGFβ, iako je uočen trend snižavanja (pada) količine TGFβ od bolesnih preko sumnjivih u odnosu na preostale podskupine (**Slika 16.**), Bolesni su imali najvišu enzimsku aktivnost LAP u odnosu na ostale ispitivane podskupine (svi  $P < 0,05$ ) (**Slika 17.**). Sumnjivi i ispitanici u kontrolnim selima su imali višu aktivnost LAP od rizičnih i ostalih (svi  $P < 0,05$ ), dok nije bilo razlike u aktivnosti LAP između sumnjivih i ispitanika iz kontrolnih sela s jedne strane te između rizičnih i ostalih s druge strane (svi  $P > 0,05$ ). (**Tablica17.**)

**Tablica 16. TGF $\beta$  i LAP ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela**

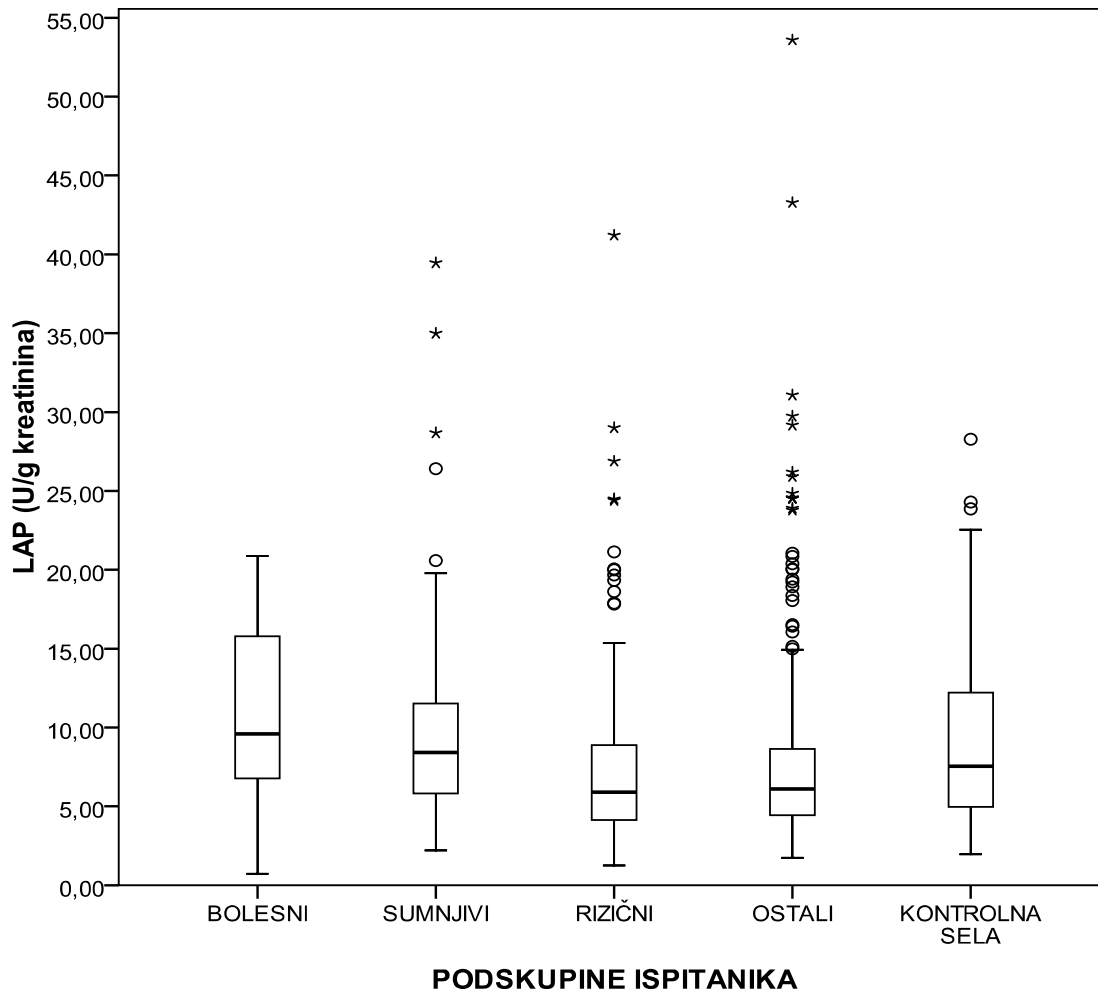
	Endemska sela N C (25.-75. P.)	Kontrolna sela N C (25.-75. P.)	Statistika
TGF $\beta$ (ng/g kreatinina)	680 53,58 (30,95-99,06)	209 56,02 (35,65-91,62)	P=0,648 Z=-0,456
LAP (U/g kreatinina)	667 6,36 (4,43-9,56)	208 7,54 (4,96-12,21)	P=0,001 Z=-3,472

**17. TGFβ i LAP ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

	Bolesni N C (25.-75. P.)	Sumnjivi N C (25.-75. P.)	Rizični N C (25.-75. P.)	Ostali N C (25.-75. P.)	Kontrolna sela N C (25.-75. P.)	Statistika	
TGFβ ng/g kreatinina	28 74,84 (46,74- 107,58)	62 60,5 (41,66- 85,69)	183 50,52 (26,17- 91,79)	407 53,43 (30,03- 104,5)	209 56,02 (35,65- 91,62)	H=7,219	P=0,125
LAP U/g kreatinina	27 9,6 (6,63- 15,99)	60 8,41 (5,83- 11,53)	186 5,9 (4,14- 8,88)	394 6,11 (4,43-8,64)	208 7,54 (4,96- 12,21)	H=39,67	P <0,001



**Slika 16. TGFβ iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**



**Slika 17. LAP iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima**

## PROTEINURIJA, ENZIMURIJA I TGF $\beta$ ISPITANIKA PREMA SPOLU

ACR je u svih ispitivanih SZO podskupina kao i u kontrolnim selima bio viši u žena iako samo statistički značajno u rizičnih, ostalih i ispitanica u kontrolnim selima (rizične  $Z=-3,678$ ,  $P=0,001$ ; ostale  $Z=-4,041$ ,  $P<0,001$ ; kontrolna sela  $Z=-4,909$ ,  $P<0,001$ ). U skupini ispitanika u kontrolnim selima te u podskupinama rizičnih i ostalih svakoj zasebno nije nađena razlika u spolu za  $\alpha 1mCR$ , TGF $\beta$  i LAP (svi  $P>0,05$ ),

I muškaraci i žene u podskupinama rizični, ostali i iz kontrolnih sela su imali medijan i 75 percentilu ACR u granicama referentnih vrijednosti tj.ti su ispitanici bili normoalbuminurični ( $<30$  mg/g kreatinina). Pored toga, isti ti ispitanici su imali medijan i 75 percentilu za  $\alpha 1mCR$  ispod 15mg/g prema Itoh kriterijima za tubularnu proteinuriju (58). U svim ispitivanim podskupinama muškaraci su imali medijan i 75 percentila LAP viši nego li žene iako ta razlika nije bila statistički značajna (svi  $P>0,05$ ), U bolesnih nije bilo razlike u spolu u ACR ( $Z= -0,267, P=0,79$ ),  $\alpha 1mCR$  ( $Z= -1,169, P=0,243$ ), TGF $\beta$  ( $Z= -1,007, P=0,314$ ) i LAP ( $Z= -0,296, P=0,767$ ), dok u sumnjivih je bila jedino značajna spolna razlika u  $\alpha 1mCR$  ( $Z=-2,221, P=0,027$ ) i TGF $\beta$  ( $Z=-2,458, P=0,014$ ) gdje su muškarci imali više vrijednosti  $\alpha 1mCR$ , a niže TGF $\beta$ . (**Tablica 18.**)

**Tablica 18. Proteinurija, enzimurija i TGFβ ispitnika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima i prema spolu**

		Bolesni N C (25.-75. P.)	Sumnjivi N C (25.-75. P.)	Rizični N C (25.-75. P.)	Ostali N C (25.-75. P.)	Kontrolna sela N C (25.-75. P.)	Statistika
ACR (mg/g)	Muškarci	15 99,76 (24,30-216)	16 21,84 (18,40-74,97)	85 4,13 (3-6,3)	179 4,89 (3,51-8,37)	166 5,13 (3,43-9,57)	P<0,001 $\chi^2=71,647$
	Žene	20 116,82 (29,50-367,14)	54 33,48 (14,71-83,75)	127 5,31 (4,04-7,64)	268 6,54 (4,33-11,15)	197 7,69 (5,18-14,79)	P<0,001 $\chi^2=137,168$
α1mCR (mg/g)	Muškarci	11 57,92 (13,21-189,29)	15 36,88 (11,94-48,68)	82 6,17 (3,52-9,32)	170 6,29 (3,72 -12,24)	85 8,11 (4,92-15,19)	P<0,001 $\chi^2=40,279$
	Žene	18 81,24 (34,36-167,75)	50 16,97 (7,72-25,43)	116 5,82 (3,68-8,30)	253 6,15 (3,85-9,54)	139 7,63 (4,53-13,56)	P<0,001 $\chi^2=92,420$
TGFβ (ng/g)	Muškarci	10 101,47 (39,93-119,19)	14 37,66 (26,67-55,33)	75 52,94 (24,89-105,96)	159 52,52 (26,81-122,61)	76 57,50 (36,81-110,16)	P=0,330 $\chi^2=4,610$
	Žene	18 59,57 (46,91-79,61)	48 66,22 (49,24-88,80)	108 48,22 (26,68-83,73)	248 54,29 (32,62-94,94)	133 54,71 (35,21-84,82)	P=0,067 $\chi^2=8,769$
LAP (U/g)	Muškarci	11 7,70 (4,09-12,81)	15 10,33 (6,43-16,93)	80 9,39 (5,84-13,78)	155 8,68 (6,32-12,43)	77 8,98 (6,36-13,06)	P=0,001 $\chi^2=18,899$
	Žene	16 6,49 (4,42-9,14)	45 6,23 (3,42-8,99)	106 6,94 (4,16-10,90)	239 6,08 (3,92-9,79)	131 6,38 (4,13-10,40)	P<0,001 $\chi^2=22,877$

## ANALIZE POVEZANOSTI

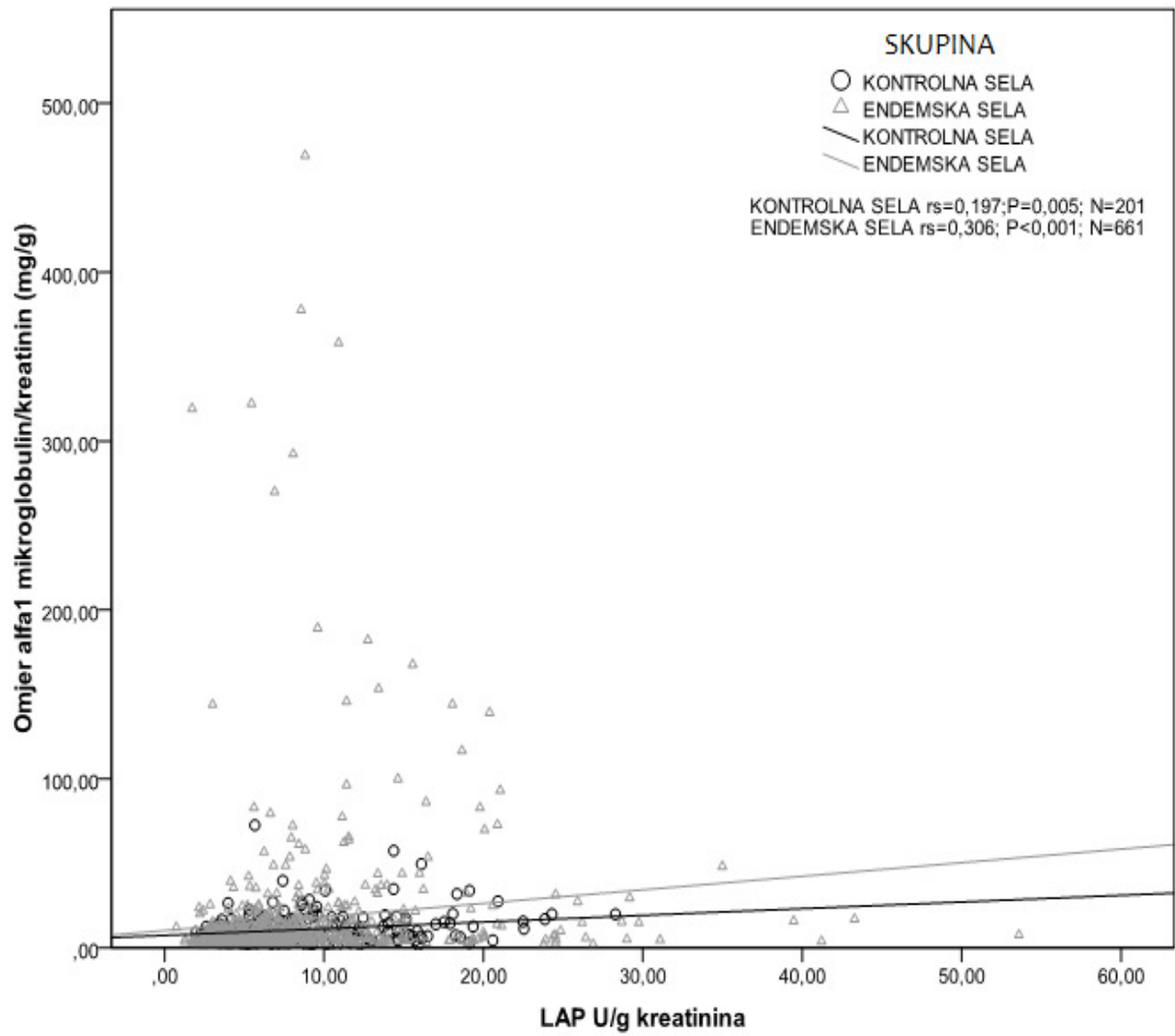
U ovom istraživanju je nađena značajna povezanosti između dobi i  $\alpha$ 1mCR u obje skupine sela (endemskim  $r_{S1}=0,505$ ,  $P<0,001$ ,  $N=715$  i kontrolnim selima  $r_{S2}=0,345$ ,  $P<0,001$ ,  $N=224$ ) pri čemu je povezanost bila statistički značajnija u endemskim selima ( $Z=2,549$ ,  $P=0,011$ ).

U endemskim selima je ova povezanost bila prisutna u podskupini ugroženih ( $r_S=0,388$ ,  $P<0,001$ ,  $N=198$ ) i ostalih ( $r_S=0,472$ ,  $P<0,001$ ,  $N=423$ ), dok nije bilo povezanosti  $\alpha$ 1mCR i dobi u bolesnih ( $r_S=0,073$ ,  $P=0,708$ ,  $N=29$ ) kao niti u sumnjivih ( $r_S=0,236$ ,  $P<0,059$ ,  $N=65$ ). Također značajna povezanost dobi je nađena i s enzimskom aktivnosti LAP u obje grupe sela (endemskim  $r_S=0,300$ ,  $P<0,001$ ,  $N=667$  i kontrolnim selima  $r_S=0,341$ ,  $P<0,001$ ,  $N=208$ ) bez značajne razlike u povezanosti aktivnosti LAP i dobi između ovih dviju ispitivanih grupa ( $Z=-0,572$ ,  $P=0,567$ ) (**Tablica 19.**)

U endemskim selima nije bilo povezanosti između spola i ACR ( $r_S=0,191$ ,  $P<0,001$ ,  $N=764$ ) kao niti između spola i  $\alpha$ 1mCR ( $r_S=-0,009$ ,  $P=0,816$ ,  $N=715$ ). U kontrolnim selima također nije bilo povezanosti između spola i  $\alpha$ 1mCR ( $r_S=-0,032$ ,  $P=0,633$ ,  $N=224$ ), dok je bila prisutna slaba pozitivna povezanost između muškog spola i ACR ( $r_S=0,258$ ,  $P<0,001$ ,  $N=363$ ). Osim toga, u endemskim selima nije bilo povezanosti između spola i LAP ( $r_S=-0,040$ ,  $P=0,308$ ,  $N=667$ ) s jedne strane te spola i TGF $\beta$  ( $r_S=0,013$ ,  $P=0,739$ ,  $N=680$ ) s druge strane. Također u kontrolnim selima nije bilo spomenute povezanosti LAP i spola ( $r_S=-0,050$ ,  $P=0,474$ ,  $N=208$ ) te TGF $\beta$  i spola ( $r_S=-0,081$ ,  $P=0,241$ ,  $N=209$ ).

U kontrolnim selima nije bilo povezanosti između  $\alpha$ 1mCR i enzimске aktivnosti LAP ( $r=0,197$ ,  $P=0,005$ ,  $N=201$ ), dok je u endemskim selima ta povezanost bila značajna ( $r=0,306$ ,  $P<0,001$ ,  $N=661$ ) i prisutna jedino u podskupini ostali ( $r_S=0,299$ ,  $P<0,001$ ,  $N=390$ ), dok nije bilo spomenute povezanosti  $\alpha$ 1mCR i enzimске aktivnosti LAP u podskupinama sumnjivih ( $r_S=0,211$ ,  $P=0,113$ ,  $N=58$ ) i ugroženih ( $r_S=0,193$ ,  $P=0,008$ ,  $N=186$ ). (**Slika 18.**)





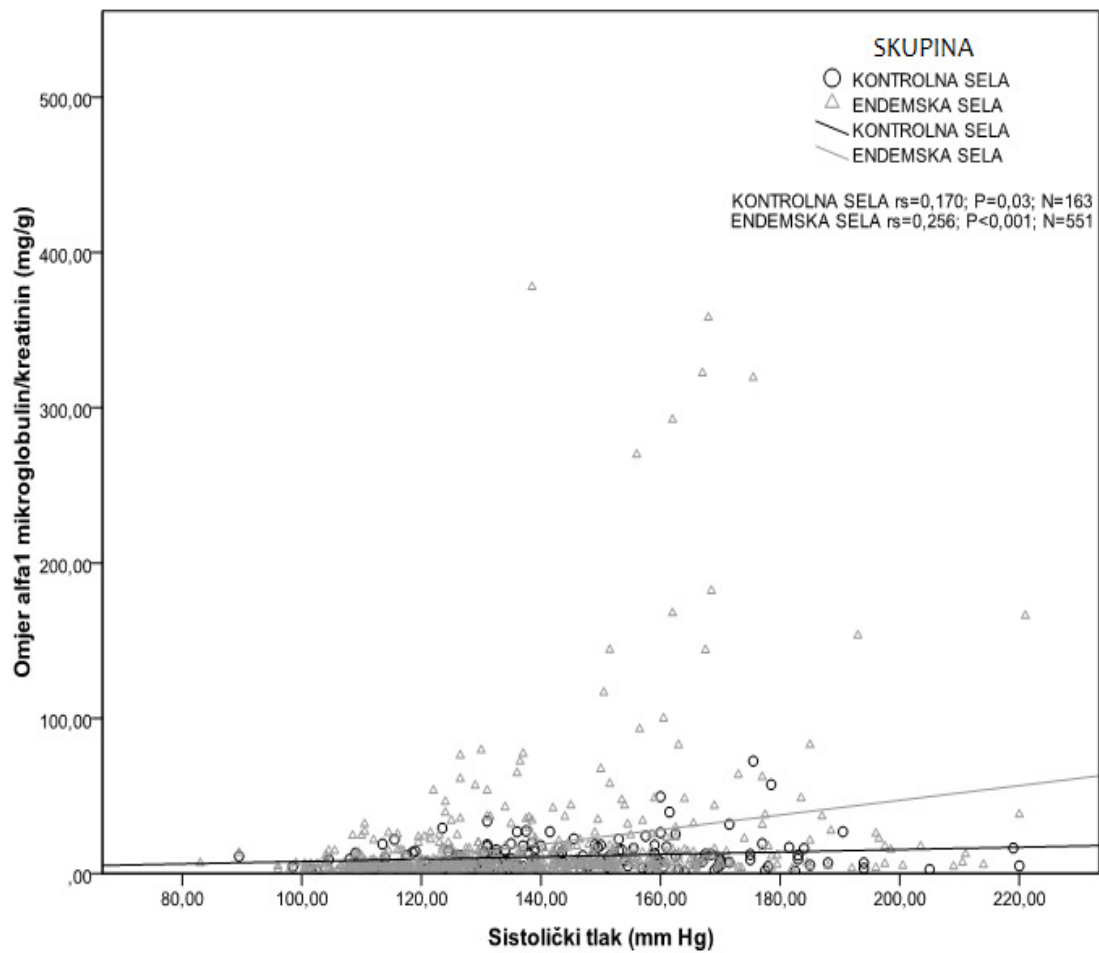
Slika 18. Povezanost  $\alpha$ 1mCR i LAP u endemskim i kontrolnim selima

U kontrolnim selima SAT nije bio povezan s  $\alpha$ 1mCR ( $r_s = 0,170$ ,  $P = 0,03$   $N = 163$ ), dok s druge strane je bila prisutna slaba povezanost između  $\alpha$ 1mCR sa SAT u endemskim selima ( $r_s = 0,335$ ,  $P < 0,001$ ,  $N = 551$ ). (**Slika 19.**),

Osim toga, SAT u endemskim selima je pokazao negativnu povezanost s veličinom glomerularne filtracije izražene pomoću MDRD jednadžbe ( $r_s = -0,307$ ,  $P < 0,001$ ,  $N = 581$ ), dok nije bilo te povezanosti u kontrolnim selima ( $r_s = -0,197$ ,  $P = 0,007$ ,  $N = 186$ ).

U cijelom ispitivanom uzorku je postojala povezanosti između glukoze u serumu i SAT ( $r_s = 0,403$   $P < 0,001$ ,  $N = 767$ ), kao u pojedinim skupinama sela, endemskom ( $r_s = 0,417$   $P < 0,001$   $N = 581$ ) i kontrolnom ( $r_s = 0,331$   $P < 0,001$ ,  $N = 186$ ). Međutim, nije bilo razlike u povezanostima SAT i glukoze između EN sela s jedne strane te kontrolnih sela s druge strane ( $z = 1,180$ ;  $P = 0,238$ ).

Također, u istraživanju bila je prisutna povezanost opsega struka kao i ITM sa SAT kako u svim selima (opseg struka i SAT  $r_s = 0,344$ ,  $P < 0,001$   $N = 759$ ; ITM i SAT  $r_s = 0,286$   $P < 0,001$   $N = 741$ ) tako i u obje skupine sela zasebno (opseg struka kontrolno  $r_s = 0,408$   $P < 0,001$   $N = 178$ , endemsko  $r_s = 0,305$   $P < 0,001$   $N = 581$ ; ITM kontrolno  $r_s = 0,323$   $P < 0,001$   $N = 171$ ; endemsko  $r_s = 0,260$   $P < 0,001$   $N = 570$ ). Međutim, nije bilo razlike u povezanostima SAT i opsega struka između EN sela s jedne strane te kontrolnih sela s druge strane ( $z = 1,370$ ;  $P = 0,171$ ) kao niti SAT i ITM ( $z = 0,784$ ;  $P = 0,433$ ).



**Slika 19.  $\alpha$ 1mCR i SAT u endemskim i kontrolnim selima**

**Tablica 19. Povezanost TGF $\beta$  i LAP s demografskim obilježjima i parametrima bubrežne funkcije u EN i kontrolnim selima**

	TGF $\beta$		LAP	
	EN/kontrolno selo		EN/kontrolno selo	
Dob	$r_s=0,119$ $P=0,002$ $N=680$	$r_s=0,208$ $P=0,002$ $N=209$	<b><math>r_s=0,300</math></b> $P<0,001$ $N=667$	<b><math>r_s=0,341</math></b> $P<0,001$ $N=208$
Spol	$r_s=0,013$ $P=0,739$ $N=680$	$r_s=-0,081$ $P=0,241$ $N=209$	$r_s=-0,040$ $P=0,308$ $N=667$	$r_s=-0,05$ $P=0,474$ $N=208$
$\alpha 1mCR$	$r_s=0,045$ $P=0,242$ $N=673$	$r_s=-0,020$ $P=0,774$ $N=201$	<b><math>r_s=0,306</math></b> $P<0,001$ $N=661$	$r_s=0,197$ $P=0,005$ $N=201$
ACR	$r_s=0,136$ $P<0,001$ $N=680$	$r_s=-0,024$ $P=0,734$ $N=203$	$r_s=0,247$ $P<0,001$ $N=667$	$r_s=0,202$ $P=0,004$ $N=202$
eGFR (MDRD)	$r_s=-0,024$ $P=0,538$ $N=680$	$r_s=0,032$ $P=0,654$ $N=203$	$r_s=-0,173$ $P<0,001$ $N=667$	$r_s=-0,171$ $P=0,015$ $N=203$

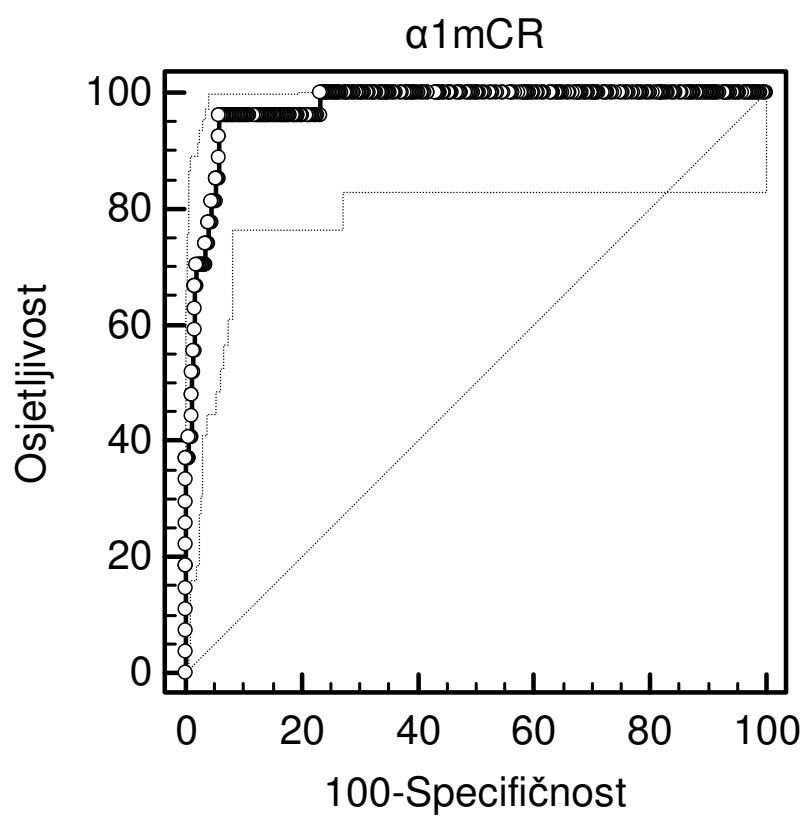
## ROC KRIVULJE – OSJETLJIVOST I SPECIFIČNOST TESTA ZA TGF $\beta$ , LAP i $\alpha$ 1mCR U ENDEMSKOJ NEFROPATJI

Prije izrade ROC krivulje za  $\alpha$ 1mCR, TGF $\beta$  te LAP u jednokratnom uzorku mokraće (druga jutarnja mokraća) za probir i dijagnosticiranje endemske nefropatije s endemskom nefropatijom (bolesnim ispitanicima) kao zavisnom varijablom htjeli smo ispitati ima li poveznosti između  $\alpha$ 1mCR odnosno TGF $\beta$  te LAP s obzirom na adekvatnost mokraće tj. prema specifičnoj težini mokraće, kreatininu u mokraći i kod sumnje na uroinfekciju (leukociti i nitriti u mokraći). Dobili smo da nema povezanosti između specifične težine mokraće odnosno kreatinina u mokraći s leukocitima odnosno s nitritima u mokraći (specifična težina mokraće s leukocitima  $r_s=-0,112$ ,  $P<0,001$ ,  $N=1117$ ; specifična težina mokraće s nitritima  $r_s=-0,096$   $P=0,001$ ,  $N=1117$ ; kreatinin u mokraći s leukocitima  $r_s=-0,109$ ,  $P<0,001$ ,  $N=1118$ ; kreatinin u mokraći s nitritima  $r_s=-0,122$ ,  $P<0,001$ ,  $N=1118$ ), dok postoji značajna pozitivna povezanost između nitrita i leukocita u mokraći ( $r_s=0,303$ ,  $P<0,001$ ,  $N=1118$ ) te su ti parametri uzeti u ovom istraživanju kao parametri uroinfekcije. Nadalje, nije bilo povezanosti između  $\alpha$ 1mCR, odnosno TGF $\beta$  te LAP s leukocitima i nitritima u mokraći ( $\alpha$ 1mCR s leukocitima  $r_s=-0,020$ ,  $P=0,546$ ,  $N=933$ ;  $\alpha$ 1mCR s nitritima  $r_s=0,085$ ,  $P=0,009$ ,  $N=933$ ; TGF $\beta$  s leukocitima  $r_s=0,046$ ,  $P=0,173$ ,  $N=877$ ; TGF $\beta$  s nitritima  $r_s=0,038$ ,  $P=0,256$ ,  $N=877$ ; LAP s leukocitima  $r_s=0,027$ ,  $P=0,432$   $N=864$ ; LAP s nitritima  $r_s=0,105$ ,  $P=0,002$ ,  $N=864$ ) kao niti povezanosti između TGF $\beta$  odnosno LAP-a sa specifičnom težinom mokraće (TGF $\beta$  sa specifičnom težinom mokraće  $r_s=-0,120$ ,  $P<0,001$ ,  $N=880$ ; LAP sa specifičnom težinom mokraće  $r_s=-0,101$ ,  $P=0,003$ ,  $N=866$ ). Na temelju dobivenih rezultata o nepostojanju povezanosti  $\alpha$ 1mCR, TGF $\beta$  i LAP s leukocitima i nitritima u mokraći ne treba isključivati ispitanike s uroinfektom kod određivanja  $\alpha$ 1mCR, TGF $\beta$  i LAP u mokraći. Pored toga ne treba prilagođavati mokraću prema specifičnoj težini kod određivanja TGF $\beta$  odnosno LAP zbog nepostojanja poveznosti specifične težine mokraće s TGF $\beta$  odnosno LAP.

Međutim, kreatinin u mokraći i specifična težina mokraće su u ovom istraživanju bili međusobno povezani ( $r_s=0,868$ ,  $P<0,001$ ,  $N=1124$ ), te oboje su bili povezani s  $\alpha$ 1mCR (kreatinin u mokraći  $r_s=-0,634$ ,  $P<0,001$ ,  $N=939$ ; specifična težina mokraće  $r_s=-0,574$ ,  $P<0,001$ ,  $N=939$ ), Kako je  $\alpha$ 1mCR izvedenica tj. prilagođena je prema kreatininu u mokraći, nema smisla tražiti povezanost ovih varijabli koje su proizašle računanjem jedna iz druge. Napredovanjem bolesti gubi se sposobnost koncentriranja mokraće i mokraća je razrijeđena što znači da je manja specifična težina mokraće. Isto tako progresijom tubularnog oštećenja

sve je veći  $\alpha 1\text{mCR}$ , Ovi parametri su povezani s bolešću, a ne toliko međusobno, što se vidi iz priloženih rezultata. Naime, bez isključivanja utjecaja bolesti (endemske nefropatije)  $\alpha 1\text{mCR}$  i specifična težina mokraće su bili dobro negativno povezani ( $r_s = -0,574$ ;  $p < 0,001$ ), no kada se isključio utjecaj bolesti tj. kada se gledala izravna povezanost  $\alpha 1\text{mCR}$  i specifične težine mokraće onda je postojala značajna nepovezanost ( $r_s = -0,237$ ;  $p < 0,001$ ) (157). Stoga nije potrebno prilagođavanje uzorka mokraće prema specifičnoj težini prilikom određivanja  $\alpha 1\text{mCR}$ .

Ukupno gledajući prema rezultatima ovog istraživanja nije potrebno prilagođavanje uzorka mokraće prilikom određivanja  $\alpha 1\text{mCR}$ ,  $\text{TGF}\beta$  i LAP u mokraći prema specifičnoj težini mokraće te prisutnosti leukociturije s nitritima.



Slika 20. ROC krivulja  $\alpha$ 1mCR za endemsku nefropatiju

Granična vrijednost određivanih varijabli predstavljaju najbolju kombinaciju visoke osjetljivosti i specifičnosti dobivenih ROC analizom (**Tablica 20.**). Rezultati su pokazali da je prediktivna vrijednost  $\alpha$ 1mCR za nefropatiju iznad 31,49 mg/g kreatinina u mokraći bila znakovita (AUC 0,972, SE = 0,010, 95% IP 0,957-0,982,  $z=50,281$ ,  $P<0,001$ ). Test je imao 96,3% osjetljivost (95% IP 81-99,9), 94,05% specifičnost (95% IP 92,2-95,6). Pozitivni omjer vjerojatnosti je bio 16,17 (95% IP 15-17,5), a negativni 0,039 (95% IP 0,006-0,3). Pozitivna prediktivna vrijednost iznosila je 34,7 (95% IP 24-46,5), a negativna 99,9 (95% IP 99,3-100). (**Slika 20.**).

Medijan  $\alpha$ 1mCR za sumnjive je bio 19,99 (25.-75. P. = 8,33-31,91). Uzimajući u obzir ROC krivulju za nefropatiju prema kojoj najniža vrijednost  $\alpha$ 1mCR pri kojoj su bili zadovoljeni uvjeti da bi metodologija bila prihvaćena (158) iznosila je iznad 23,47 mg/g kreatinina. Pri toj je vrijednosti  $\alpha$ 1mCR osjetljivost testa bila 96,3% (95% IP 81-99,9), a specifičnost 90,4% (95% IP 88,2-92,3). Pozitivni omjer vjerojatnosti je bio 10,03 (95% IP 9,3-10,8), a negativni 0,041 (95% IP 0,006-0,3). Pozitivna prediktivna vrijednost je bila 24,8 (95% IP 16,9-34,1), a negativna 99,9 (95% IP 99,3-100). Od ukupno 70 sumnjivih, njih 65 je imalo nalaz  $\alpha$ 1mCR, a 5 nije. Od 65 sumnjivih s nalazom  $\alpha$ 1mCR njih 27 (42%) je imalo  $\alpha$ 1mCR iznad 23,47 mg/g kreatinina. U skupini sumnjivih s nalazom  $\alpha$ 1mCR iznad 23,47 mg/g kreatinina, a temeljem ROC krivulje za nefropatiju, moglo bi se očekivati da će prijeći u populaciju bolesnih tj. da će oboljeti. Osim toga, od tih 27 izdvojenih 21 je imao pozitivnu obiteljsku anamnezu, a 6 negativnu. Metodom binarne logističke regresije istražen je utjecaj obiteljske anamneze za EN u predviđanju oboljenja tj. nefropatije. (**Tablica 21.**) S obzirom na model pokazano je kako obiteljska anamneza velikom značajnošću utječe na činjenicu hoće li netko oboljeti od nefropatije ili ne. Osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom u ovom istraživanju je imala 5,8 puta veću vjerojatnost oboljeti od nefropatiju nego li osoba bez pozitivne obiteljske anamneze. Uzimajući u obzir navedeno sumnjivi s  $\alpha$ 1mCR iznad 23,47 mg/g kreatinina uz pozitivnu obiteljsku anamnezu predstavljaju najznačajniju skupinu ispitanika u endemskim selima kod kojih bi se mogla očekivati pojava nefropatije.

Rezultati su pokazali da je prediktivna vrijednost LAP za nefropatiju iznad 6,46 U/g kreatinina u mokraći bila znakovita (AUC 0,694, SE = 0,0517, 95% IP = 0,662-0,724,  $z=3,745$ ,  $P<0,001$ ). Test je imao 84 % osjetljivost (95% IP 63,9-95,5), 49,88 % specifičnost (95% IP 46,5-53,3). Pozitivni omjer vjerojatnosti je bio 1,68 (95% IP 1,4-2,0), a negativni 0,032 (95% IP 0,1-0,8). Pozitivna prediktivna vrijednost iznosila je 4,7 (95% IP 2,9-7,1), a negativna 99,1 (95% IP 97,6-99,7). (**Slika 21.**)



U istraživanju rezultati su pokazali da je prediktivna vrijednost TGF $\beta$  za nefropatiju iznad 46,44 ng/g kreatinina u mokraći bila znakovita (AUC 0,599, SE = 0,0412, 95% IP = 0,566-0,632, z=2,407, P=0,016). Test je imao 85,19 % osjetljivost (95% IP 66,3-95,8), 42,17 % specifičnost (95% IP 38,8-45,6) Pozitivni omjer vjerojatnosti je bio 1,47 (95% IP 1,2-1,8), a negativni 0,35 (95% IP 0,1-0,9). Pozitivna prediktivna vrijednost iznosila je 4,4 (95% IP 2,9-7,1), a negativna 98,9 (95% IP 97,2-99,7). (**Slika 22.**)

Usporedbom površina ispod ROC krivulja za nefropatiju (de Long, 1988) nađena je statistički značajna razlika u veličini površina ispod krivulja između  $\alpha$ 1mCR s jedne strane te enzimske aktivnosti LAP (razlika između površina ispod krivulje=0,269, SE=0,0531, 95% IP 0,165-0,373, z=5,077, P<0,001) odnosno TGF $\beta$  (razlika između površina ispod krivulje=0,375, SE=0,046, 95% IP 0,285-0,465, z=8,165, P<0,001) s druge strane. Nema razlike u površinama ROC krivulja između LAP i TGF $\beta$  (razlika između površina ispod krivulje=0,106, SE=0,0573, 95% IP -0,00645-0,218, z=1,847, P=0,065). (**Slika 23.**)

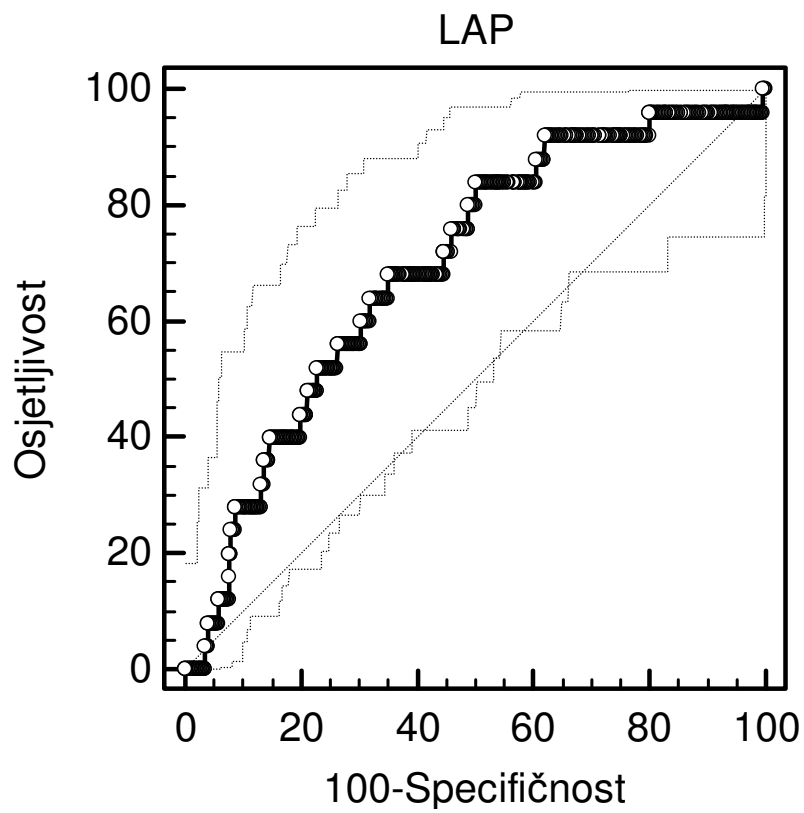
Usporedba pokazuje značajno veću prediktornu vrijednost tj. osjetljiviji i specifičniji test s  $\alpha$ 1mCR za nefropatiju nego li ostalih istraživanih molekula te LAP i TGF $\beta$  nemaju zadovoljene kriterije za probir ili dijagnosticiranje u ovoj bolesti (158).

Koristeći novu vrijednost  $\alpha$ 1mCR 31,5 mg/g kreatinina u mokraći za postavljanje dijagnoze EN između ispitivanih podskupina u EN selima te između pojedinih podskupina iz EN sela s ispitanicima iz kontrolnih sela nije nađena statistički značajna razlike u LAP (svi P>0,05). (**Tablica 22.**) Najniže vrijednosti TGF $\beta$  su imali ispitanici u podskupini ostali. Ispitanici u kontrolnim selima i rizični su imali značajno više vrijednosti TGF $\beta$  od ispitanika u podskupini ostali (svi P<0,05), dok nije bilo razlike između preostalih ispitivanih podskupina (svi P>0,05).

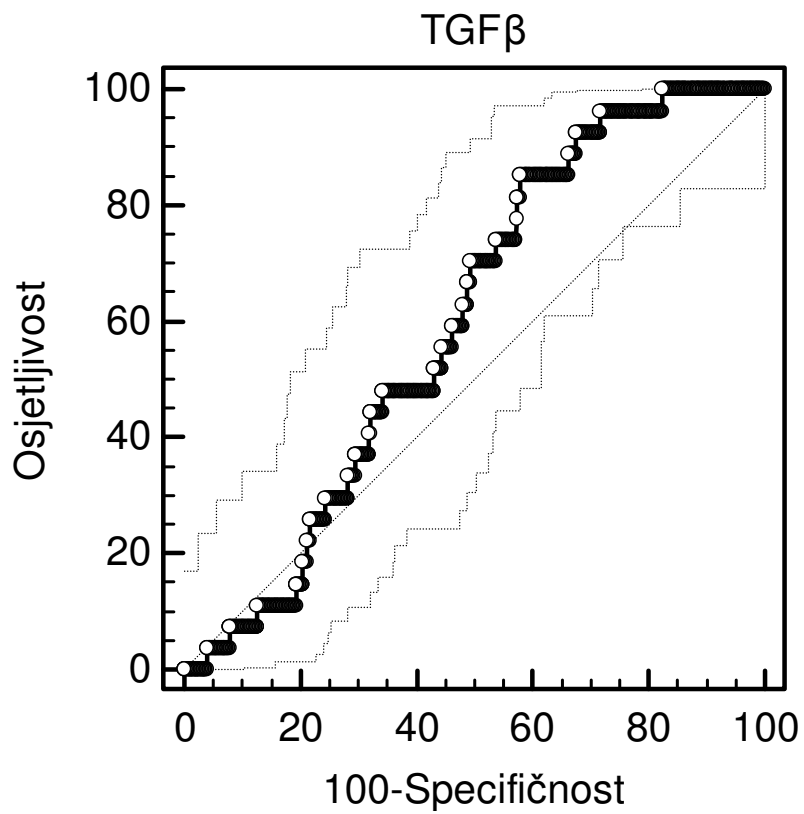
U istraživanju rezultati ROC analize su pokazali da LAP i TGF $\beta$  nemaju zadovoljene kriterije za probir ili dijagnosticiranje EN pri korištenju novog kriterija  $\alpha$ 1mCR >31,5 mg/g kreatinina u urinu (LAP AUC= 0,542, SE=0,074, P=0,569; TGF $\beta$  AUC=0,502 SE=0,062 P=0,971).

Od svih ispitanika vjerojatnost da ispitanik s negativnom obiteljskom anamnezom oboli je 0,014 tj. 1,4% osoba s negativnom obiteljskom anamnezom će oboljeti, te će 7,8% od svih ispitanika s pozitivnom obiteljskom anamnezom oboljeti. (**Tablica 21.**)

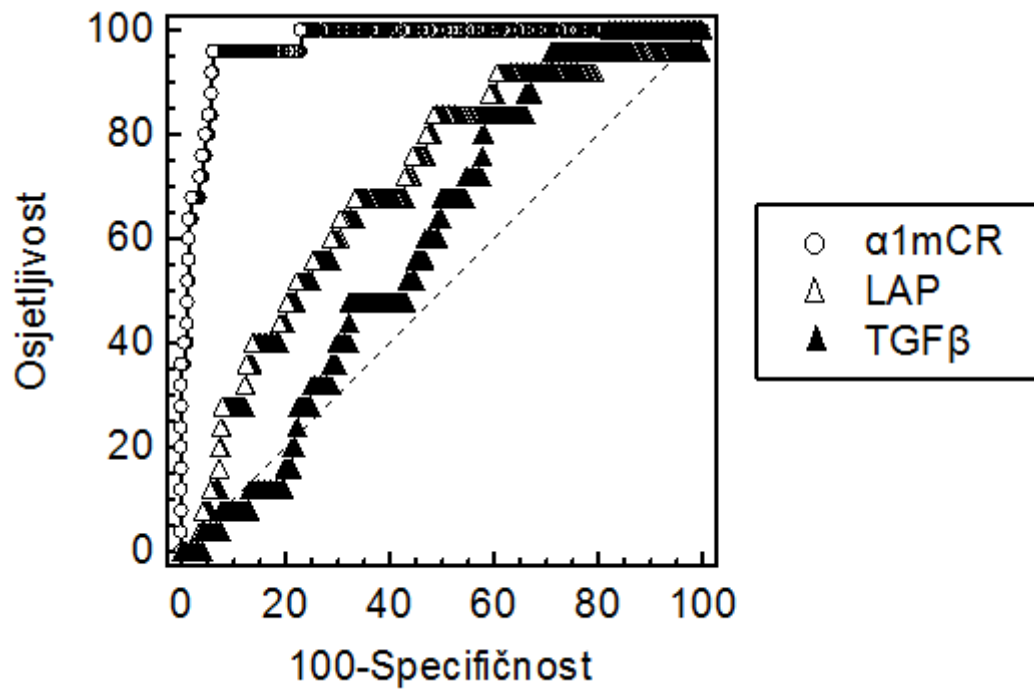
Ukupno u uzorku je 296 osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom (26%), od čega njih 23 (7,8%) je oboljelo.



**Slika 21. ROC krivulja LAP za endemsku nefropatiju**



Slika 22. ROC krivulja TGF $\beta$  za endemsku nefropatiju



Slika 23. Usporedba ROC krivulja  $\alpha 1\text{mCR}$ , LAP i  $\text{TGF}\beta$  za endemsku nefropatiju

**Tablica 20. Osjetljivost i specifičnost graničnih vrijednosti  $\alpha$ 1mCR, LAP i TGF $\beta$  za EN dobivenih ROC analizom**

Varijabla	Granična vrijednost varijable	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)	AUC	SE	P
$\alpha$ 1mCR (mg/g)	31,49	96,3%	94,05	0,972	0,010	<0,001
LAP (U/g)	6,46	84	49,88	0,694	0,0517	<0,001
TGF $\beta$ (ng/g)	46,44	85,19	42,17	0,599	0,0412	0,016

**Tablica 21. Utjecaj obiteljske anamneze za EN u predviđanju oboljenja tj. nefropatije metodom binarne logističke regresije**

	B (SE)	95% IP za OR		
		Donji	OR	Gornji
Konstanta	- 4,239 (0,291)			
Obiteljska anamneza *	1,765 (0,363)	2,868	5,841	11,896

$R^2=0,08$  (Hosmer & Lemeshow); 0,02 (Cox & Snell); 0,09 (Nagelkerke),

Model  $\chi^2(1)=25,160$ ;  $P<0,001$ ; \*  $P<0,001$ .

**Tablica 22. TGF $\beta$  i LAP ispitanika iz kontrolnih i endemskih sela razvrstanih u podskupine prema SZO kriterijima s a1mCR>31,5 mg/g kreatinina u mokraći**

	Bolesni N C (25.-75. P.)	Sumnjivi N C (25.-75. P.)	Rizični N C (25.-75. P.)	Ostali N C (25.-75. P.)	Kontrolna sela N C (25.-75. P.)	Statistika	
						H	P=
TGF $\beta$ ng/g kreatinina	17, 52,65 (35,01 - 79,63)	18 51,72 (36,00 - 76,00)	133 57,83 (37,27 - 100,8)	354 47,15 (26,81 - 85,58)	209 55,74 (37,94 - 122,09)	H=16,437	P= 0,003
LAP U/g kreatinina	17 7,49 (4,6 - 11,13)	18 5,78 (4,03 - 8,59)	132 7,87 (5,07 - 12,21)	343 6,37 (4,28 - 10,3)	207 6,67 (4,93 - 9,5)	H= 8,746	P= 0,068

## **4. RASPRAVA**



U ovom istraživanju učestalost oboljelih od EN, kao i sumnjivih te rizičnih nije se bitnije mijenjala u usporedbi s podacima prije tridesetak godina (2) a slični podaci su dobiveni i u većine drugih endemskih žarišta (6-7). Autori iz južne Srbije i Bugarske (159-160) bilježe pad učestalosti oboljelih od EN pri čemu pad učestalosti u Bugarskoj dijelom objašnjavaju pojavom EN u neendemskim selima najvjerojatnije posljedicom migracije EN populacije, dok u Srbiji to pripisuju mogućem različitom tijeku bolesti u različitim srpskim žarištima budući da u drugim srpskim žarištima nije nađena značajna promjena učestalosti EN posljednjih tridesetak godina (7). Osim toga, autori koji bilježe pad učestalosti EN u spomenutim EN žarištima opisuju s druge strane pojavu proteinurije i manjih bubrega u mladim osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom za EN što bi govorilo u prilog tome da je u tim žarištima EN i dalje prisutna (44,161). Ovi oprečni podaci upućuju na nužnost daljnjih redovitih praćenja populacija u različitim EN žarištima, ali i potrebu za jedinstvenim kriterijima za postavljanje dijagnoze bolesti u svim EN žarištima radi dobivanja prave slike kretanja EN u žarištima, a time i mogućnost stvaranja odgovarajućih mjera ranog otkrivanja i praćenja bolesti.

U endemskim selima u ovom istraživanju nije bilo razlike u dobi između bolesnih i sumnjivih te je prosječna dob bila 68-73 godine. Obje podskupine su bile značajno starije od rizičnih i ostalih u endemskim selima kao i od ispitanika u kontrolnim selima. Osim toga, bolesni i sumnjivi su značajno duže boravili u selima od preostalih podskupina. Prosječna dob postavljanja dijagnoze bolesti prije tridesetak godina je bila 45-50 godina što u ovom istraživanju odgovara prosječnoj dobi rizičnih i ostalih u EN selima kod kojih u ovom istraživanju nisu zabilježeni znakovi bubrežne bolesti čime se postavlja pitanje prisutnosti ali i ranije izloženosti rizičnih i ostalih egzogenom toksinu. Bitan je podatak što je baš u tom razdoblju prije tridesetak godina došlo do značajnije uporabe kombajna u obradi žita što je vjerojatno i utjecalo na smanjenu izloženost toksinu aristolohične kiseline u podskupini rizičnih i ostalih u EN selima (32).

U ovom istraživanju nije bilo značajne razlike u crvenoj krvnoj slici između SZO podskupina kao niti između EN i neendemskih kontrolnih sela. Slične rezultate su dobili i autori u Srbiji koristeći druge kriterije za postavljanje dijagnoze EN (148) s bitnom razlikom što je u njihovom uzorku bila prisutna statistički značajna razlika u koncentraciji hemoglobina kao parametra anemije između bolesnih i sumnjivih s jedne strane s kontrolnim zdravim ispitanicima s druge strane. Naime, ispitanici iz kontrolnih sela u našem istraživanju su uključivali sve punoljetne ispitanike neendemskih sela bez obzira na komorbiditete izuzev

EN, dok su u srpskom uzorku bili uključeni samo zdravi ispitanici iako približno iste dobi kao i u našem istraživanju (kontrola Srbija vs. kontrola Hrvatska 52,9 vs. 50 g) ali bez komorbiditeta čime bi se dijelom mogla objasniti neopažena razlika u anemiji između ispitanika s EN i ispitanika iz kontrolnih sela u ovom istraživanju (Hb kontrola Srbija vs kontrola Hrvatska 142 vs 136). Stoga uzimajući u obzir spomenute rezultate anemija se ne bi trebala koristiti kao dijagnostički parametar u EN.

U našem istraživanju nije bilo razlike u SAT između bolesnih u EN selima i ispitanika u kontrolnim selima bez obzira na prisutnu bubrežnu bolest u oboljelih u EN selima. Ispitanici u kontrolnim selima su imali najviši opseg struka i ITM u cijelom uzorku iako on nije bio statistički značajan u usporedbi s bolesnima u EN selima (svi  $P > 0,05$ ).

U spomenutom uzorku Djukanovic i sur. iz Srbije, uspoređivane su zdrave kontrole bez komorbiditeta s jedne strane, s bolesnima i sumnjivima u EN selima koji su uzeti kao jedna skupina s druge strane, dok su kod nas istoimene skupine (ispitanici iz kontrolnih sela, bolesni i sumnjivi) gledane svaka zasebno uz prethodno spomenutu razliku između njihovih i naših kontrola. Važno je za spomenuti kako u epidemiološkim istraživanjima nema homogenih uzoraka (zdrave kontrole u srpskom uzorku) te da naše kontrole predstavljaju uzorak koji se razlikuje od uzorka u EN selima po odsutnosti EN uz prisutnost drugih komorbiditeta što predstavlja stvarniju sliku promatranih parametara u istraživanju, ali istovremeno otežava dijagnosticiranje bolesti. Naime, treba također uzeti u obzir već spomenuto opažanje pojave EN u neendemskim (kontrolnim) selima u Bugarskoj kao posljedica migracije što je u današnje vrijeme svakidašnja pojava. Ovom opažanju u prilog govori i podatak našeg istraživanja o četiri ispitanika u kontrolnim selima s pozitivnom obiteljskom anamnezom za EN.

Osim toga, prema novijim istraživanjima  $\alpha 1\text{mCR}$  se pokazao kao važan biljeg upale povezane s novom dijagnosticiranom hipertenzijom i to sa SAT ( $R^2=0,363$ ,  $B=0,011$  (95%IP 0,002-0023),  $P < 0,05$ ) ali ne i DAT (162-163). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da postoji značajna povezanost SAT ali ne i DAT s  $\alpha 1\text{mCR}$  (SAT  $r_s=0,304$ ,  $P < 0,001$   $N=714$ ; DAT  $r_s=0,119$   $P=0,001$   $N=714$ ) u cijelom ispitivanom uzorku koji uključuje obje grupe sela tj. endemska i kontrolna sela. Nadalje, interesantan je podatak nepoveznosti SAT s  $\alpha 1\text{mCR}$  u kontrolnim selima s jedne strane, te značajne povezanosti između spomenutih parametara u EN selima. Ovo bi moglo upućivati da je SAT u endemskim selima povezan s tubularnim oštećenjem (**Slika 19.**). Osim toga, SAT u EN selima je pokazao negativnu povezanost s veličinom glomerularne filtracije izražene pomoću MDRD jednadžbe, dok nije bilo te

povezanosti u kontrolnim selima što bi ponovno moglo upućivati na povezanost SAT s bubrežnim oštećenjem u endemskim selima.

Ispitanici u kontrolnim selima u istraživanju su imali više koncentracije glukoze u serumu od ispitanika iz EN sela (**Tablica 8.**), i to značajno više samo u odnosu na podskupine rizičnih i ostalih u EN selima (svi  $P < 0,05$ ). Bolesni i sumnjivi u EN selima kao i ispitanici iz kontrolnih sela su imali značajno više koncentracije glukoze u serumu kao i SAT u odnosu na ispitanike iz podskupina rizičnih i ostalih (svi  $P < 0,05$ ). U cijelom ispitivanom uzorku je postojala povezanosti između glukoze u serumu i SAT ( $r_s = 0,403$   $P < 0,001$ ), kao u pojedinim skupinama sela, endemskom ( $r_s = 0,417$   $P < 0,001$ ) i kontrolnom ( $r_s = 0,331$   $P < 0,001$ ), ali nije bilo razlike u povezanostima SAT i glukoze između EN sela s jedne strane te kontrolnih sela s druge strane ( $P = 0,238$ ).

Osim toga, ispitanici iz kontrolnih sela su jedini imali značajno veći opseg struka u usporedbi s podskupinama rizičnih i ostalih u EN selima ( $P < 0,05$ ), dok nije bilo razlike u opsegu struka kao niti ITM između pojedinim podskupinama u EN (svi  $P > 0,05$ ). U ovom istraživanju prisutna je povezanost opsega struka kao i ITM sa SAT kako u svim selima (opseg struka i SAT  $r_s = 0,344$ ,  $P < 0,001$ ; ITM i SAT  $r_s = 0,286$   $P < 0,001$ ) tako i u obje grupe sela zasebno (opseg struka kontrolno  $r_s = 0,408$   $P < 0,001$ , endemsko  $r_s = 0,305$   $P < 0,001$ ; ITM kontrolno  $r_s = 0,323$   $P < 0,001$ ; endemsko  $r_s = 0,260$   $P < 0,001$ ), dok nema razlike u povezanostima SAT i opsega struka između EN sela s jedne strane te kontrolnih sela s druge strane ( $P = 0,171$ ), kao niti SAT i ITM ( $P = 0,433$ ).

U ispitivanom uzorku nisu nađene razlike u lipidnim parametrima između pojedinih podskupina u EN selima kao niti između pojedinih podskupina u EN selima s jedne strane s ispitanicima u kontrolnim selima s druge strane (**Tablica 10.**).

Spomenuti rezultati bi mogli upućivati na moguću prisutnost metaboličkog sindroma u ispitanika u kontrolnim selima ali su potrebna dodatna istraživanja na većem uzorku koja će to potvrditi ili odbaciti.

Veća učestalost karcinoma prijelaznog epitela gornjeg dijela mokraćnog sustava je jedna od obilježja EN te se obično očituju bezbolnom hematurijom. U ovom istraživanju nije bilo razlike u eritrocituriji test trakom između EN i kontrolnih sela (**Tablica 10.**) kao niti između pojedinih podskupina u EN selima, iako je bio prisutan trend opadanja nalaza eritociturije od bolesnih preko sumnjivih prema rizičnim, ostalim i kontrolnim podskupinama (**Tablica 11.**). Ovaj nalaz upućuje da test trakom za eritocituriju nije dobar u probiru populacije u EN selima kod sumnje na karcinoma gornjeg dijela mokraćnog sustava. U ovih tumora citologija

mokraće je vrlo bitna u probiru populacije iako se pokazala manje osjetljivom metodom nego li u karcinoma mokraćnog mjehura jer je osjetljivost ove metode u otkrivanju lezija niskog stupnja (dobrodiferenciranih tumora) svega 10-40%, dok se u lezija visokog stupnja (slabo diferenciranih) kreće čak do 80% (164-165). Kako se u ovoj populaciji obično radi o dobrodiferenciranim tumorima osjetljivost citologije je mala, potrebne su i druge dodatne metode poput ultrazvuka urotakta (166), ali i osjetljivih metoda kao što su MSCT ili MR urotakta te endoskopske metode u cilju detaljnije dijagnostike tumora (164). Ukupno gledajući, potrebno je redovito praćenje koje bi uključivalo citologiju mokraćne i ultrazvučni pregled urotakta EN populacije s posebnim naglaskom na visoko rizične skupine koje čine ljudi s pozitivnom obiteljskom anamnezom za EN ili karcinom uroepitela gornjeg mokraćnog sustava, oboljeli od EN kao i oni s prisutnom mikro i makrohemiturijom i/ili s anamnezom odstranjenog tumora gornjeg mokraćnog sustava zbog mogućih recidiva tumora (167-169).

Probir osoba u općoj populaciji s rizikom za kroničnu bubrežnu bolest temelji se na procjeni veličine bubrežne funkcije pomoću MDRD jednadžbe određivanjem serumskog kreatinina prema trenutno važećim preporukama NFK (55) budući da samo određivanje serumskog kreatinina može biti u granicama referentnih vrijednosti unatoč značajno reduciranoj bubrežnoj funkciji. U svim postojećim kriterijima za dijagnosticiranje EN procjena bubrežne funkcije se temelji na koncentraciji serumskog kreatinina, a ne na procjeni veličine glomerularne filtracije (eGFR) (51-54). U ovom istraživanju glomerularna filtracija određena pomoću MDRD i Cockcroft-Gaultove jednadžbe bila je značajno niža u EN selima nego li u kontrolnim (**Tablica 12.**). Osim toga, bolesni i sumnjivi su imali značajno niži eGFR od rizičnih i ostalih u EN selima kao i od ispitanika u kontrolnim selima (svi  $P < 0,005$ ), te učestalost osoba s  $eGFR < 60$  ml/min je bila značajno veća u bolesnih i sumnjivih u usporedbi s rizičnim, ostalim te ispitanicima u kontrolnim selima (svi  $P < 0,05$ ). U ispitivanom uzorku nije bilo razlike u eGFR kao niti u učestalosti osoba s  $eGFR < 60$  ml/min između rizičnih, ostalih i ispitanika u kontrolnim selima (svi  $P > 0,05$ ) (**Tablica 13.**). Ovi rezultati upućuju na mogućnost jasnog razlikovanja pojedinih SZO podskupina prema eGFR i to bolesnih i sumnjivih s jedne strane u odnosu na rizične, ostale i ispitanike iz kontrolnih sela s druge strane.

Interesantan je podatak značajne poveznosti eGFR i dijagnoze EN tj. bolesnih definiranih prema SZO kriterijima u EN selima, Naime, određivanja eGFR prema MDRD ( $r_s = -0,298$   $P < 0,001$   $N = 764$ ) je pokazao značajniju poveznost s dijagnozom nefropatije nego li prema

Cockfort-Gaultu ( $r_s = -0,264$   $P < 0,001$   $N = 744$ ). Međutim, spomenutu poveznosti eGFR s dijagnozom EN treba uzeti ipak s rezervom budući da su obje jednadžbe izvedenice koje sadrže kreatinin u serumu koji je jedan od kriterija za postavljanje dijagnoze EN pa bi to zapravo predstavljalo mogući selekcijski otklon. Bez obzira na mogući selekcijski otklon procjena bubrežne funkcije određivanjem glomerularne filtracije pomoću spomenutih jednadžbi je osjetljivija metoda procjene bubrežne funkcije od samog kreatinina u serumu naročito u slučajevima stadija 3 i više kronične bubrežne bolesti (**Tablica 1.**) te bi stoga trebala zamjeniti postojeći kreatinin u serumu u kriterijima za EN.

U ovom istraživanju nije bilo razlike u natrijuriji, kalijuriji, specifičnoj težini mokraće kao niti ACR između EN i kontrolnih sela (**Tablica 12.**). Bolesni i sumnjivi su imali nižu natrijuriju od preostalih ispitivanih podskupina (svi  $P < 0,05$ ), dok nije bilo razlike u natrijuriji između bolesnih i sumnjivih. Također nije bilo razlike u natrijuriju niti između pojedinih podskupina rizičnih, ostalih i kontrolnog sela (svi  $P > 0,05$ ). Spomenute promjene u natrijuriji bi se mogle objasniti time što u ranoj fazi EN postoji oštećenje proksimalnog tubula pa se gubi natrij mokraćom. S druge strane u bolesnih i sumnjivih nema gubitka soli bubrežima jer je već sniženi eGFR pa to nadvlada gubitak soli koja se sada zadržava u tijelu. Osim toga, u sumnjivih i bolesnih je sposobnost koncentriranja mokraće smanjena pa je i mokraća razrjeđenija a time i natrijurija manja zbog dilucije mokraće. Međutim, kako nema razlike između rizičnih i kontrolnog sela kao niti prema podskupini ostalih iz EN sela (svi  $P > 0,05$ ) pitanje je koliko je natrijurija dovoljan biljeg oštećenja tubula između pojedinih SZO podskupina.

U EN tubularna proteinurija je prvi znak oštećenja bubrega i često je udružena s tubularnom enzimurijom, drugim pokazateljem oštećenja proksimalnog tubula inače ciljnog mjesto djelovanja aristolohične kiseline (52; 56-58). U uznapredovalim stadijima bubrežne bolesti proteinurija je obično je manja od 1 g/L. U ovom istraživanju kao biljezi oštećenja proksimalnog tubula korišteni su  $\alpha 1$ mCR i LAP. Bolesni i sumnjivi su imali viši  $\alpha 1$ mCR i ACR u odnosu na preostale ispitivane podskupine (svi  $P < 0,001$ ). Između bolesnih i sumnjivih nije bilo statistički značajne razlike u ACR kao niti između poskupina rizičnih, ostalih i ispitanika iz kontrolnih sela. (**Slika 9.**) Ispitanici u kontrolnim selima su imali značajno viši  $\alpha 1$ mCR nego li ispitanici iz podskupine ostalih te rizičnih u EN selima (svi  $P < 0,05$ ), dok između ostalih i rizičnih nije bilo razlike  $\alpha 1$ mCR (**Tablica 13.**). Međutim, medijan i 75 percentila za  $\alpha 1$ mCR u kontrolnim selima je bila ispod 15 mg/g prema Itoh kriterijima za tubularnu proteinuriju (58) pa je upitno koliko je klinički značajna ova statistička razlika

između opisanih poskupina (podskupina rizičnih, ostalih i kontrolnih sela). Bolesni u istraživanju su imali najvišu količinu LAP u odnosu na ostale ispitivane podskupine (svi  $P < 0,05$ ) (**Slika 17.**). Sumnjivi i ispitanici u kontrolnim selima su imali višu količinu LAP od rizičnih i ostalih (svi  $P < 0,05$ ), dok nije bilo razlike u količini LAP između sumnjivih i ispitanika iz kontrolnih sela s jedne strane te između rizičnih i ostalih s druge strane (svi  $P > 0,05$ ) (**Tablica 17.**). S obzirom na dobivene rezultate značajne razlike u  $\alpha 1\text{mCR}$  te količini LAP u bolesnih u odnosu na preostale ispitivane skupine htjeli smo dalje ispitati imali li povezanosti LAP odnosno  $\alpha 1\text{mCR}$  i dijagnoze nefropatije. U istraživanju nije bilo povezanosti između bolesnih prema SZO kriterijima tj. dijagnoze nefropatije i LAP u EN selima ( $r_s = 0,139$ ,  $P < 0,001$ ,  $N = 667$ ), dok je povezanost nefropatije s  $\alpha 1\text{mCR}$  u EN selima bila značajna ( $r_s = 0,302$ ,  $P < 0,001$ ,  $N = 715$ ). Interesantan je podatak da u kontrolnim selima nije bilo povezanosti između dvaju tubularnih biljega,  $\alpha 1\text{mCR}$  i količine LAP ( $r = 0,197$ ,  $P = 0,005$ ,  $N = 201$ ), dok je u endemskim selima ta povezanost bila značajna ( $r = 0,306$ ,  $P < 0,001$ ,  $N = 661$ ) što je u skladu s tubularnim oštećenjem prisutnim u EN, ali je poveznost bila jedino značajna u podskupini ostali ( $r_s = 0,299$ ,  $P < 0,001$ ,  $N = 390$ ). (**Slika 18**) Budući da nema sličnih rezultata u dostupnoj literaturi potrebna su daljnja istraživanja koja će pokazati značajnost spomenutih odnosa povezanosti  $\alpha 1\text{mCR}$  i količine LAP u EN žarištima.

Dalje smo htjeli ispitati imaju li i koliko ispitivani tubularni biljezi u ovom istraživanju svaki zasebno dijagnostičku značajnost u isključivanju bolesnih tj. onih s EN u odnosu na ostale ispitivane podskupine u ovom istraživanju („rule out“) odnosno imaju li i koliko isti ti biljezi značajnost u otkrivanju („rule in“) stvarno bolesnih u ispitivanom uzorku. ROC analizom točnije usporedbom veličina površina ispod ROC krivulja  $\alpha 1\text{mCR}$  i LAP za nefropatiju smo dobili da je prediktivna vrijednost  $\alpha 1\text{mCR}$  za nefropatiju bila značajnije veća tj. da je  $\alpha 1\text{mCR}$  test osjetljiviji i specifičniji nego li LAP test (razlika između površina ispod krivulje = 0,269,  $SE = 0,0531$ , 95% IP 0,165-0,373,  $z = 5,077$ ,  $P < 0,001$ ) te da LAP za razliku od  $\alpha 1\text{mCR}$  nije zadovoljio kriterije za probir kao niti za dijagnosticiranje u ovoj bolesti (158).

ROC analizom dobivena granična vrijednost  $\alpha 1\text{mCR}$  za nefropatiju je iznosila 31,49 mg/g kreatinina u mokraći pri čemu je osjetljivost testa iznosila 96,3%, a specifičnost 94,05%. U slučaju  $\alpha 1\text{mCR}$  iznad te granične vrijednosti 16,17 puta je vjerojatnije da ćemo u uzorku imati stvarno bolesnog tj. osobu koja boluje od EN nego li zdravu, dok ispod te vrijednosti vjerojatnost da ćemo u uzorku imati stvarno bolesnog je 0,039 puta veća nego li u zdrave osobe.

Djukanović i sur. (170) su također pokazali da je jedino  $\alpha$ 1mCR uz uzdužni promjer bubrega varijabla kojom možemo razlikovati osobe oboljele od EN od onih s drugim bubrežnim bolestima kao i od zdravih kontrola tj. ispitanika bez bubrežnih bolesti. Interesantan je podatak da u tom istraživanju nije bilo razlike u  $\alpha$ 1mCR između oboljelih od EN, osoba s tubulointersticijskim nefritisom druge etiologije kao ni osoba s glomerulonefritisom. Naime, u sve tri opisane bolesti zahvaćen je proksimalni tubul čiji je karakterističan biljeg  $\alpha$ 1m. Dakle, možemo reći da je  $\alpha$ 1m specifičan biljeg proksimalnog tubula, ali ne i specifičan biljeg za EN te su uz  $\alpha$ 1m potrebni i drugi parametri za postavljanje dijagnoze EN.

U istraživanju Djukanovic i sur. kao biljeg oštećenja četkaste prevlake proksimalnog tubula korišten je enzim intestinalne alkalne fosfataze (iAP) koji se nije pokazao dobrim biljekom u razlikovanju od zdravih kontrola (ispitanika bez bubrežnih bolesti). Iako u oba istraživanja (Djukanovic i sur. i naše) su korišteni drugi dijagnostički kriteriji za EN isti se tubularni biljeg  $\alpha$ 1mCR pokazao značajnim u razlikovanju osoba s bubrežnim oštećenjem od onih bez bubrežnog oštećenja,

Prema Itoh kriterijima vrijednosti  $\alpha$ 1mCR iznad 15 mg/g upućuju na tubularnu proteinuriju u općoj populaciji (58), U našem istraživanju medijan  $\alpha$ 1mCR za sumnjive je bio 19,99 (25.-75. P. = 8.33-31.91). Uzimajući u obzir ROC krivulju za nefropatiju prema kojoj najniža vrijednost  $\alpha$ 1mCR pri kojoj su bili zadovoljeni uvjeti da bi metodologija bila prihvaćena (158) je iznosila 23,47 mg/g kreatinina. Pri toj vrijednosti osjetljivost testa bila je 96,3% a specifičnost 90,4%. Iz podskupine sumnjivih u EN selima 42% ih je imalo  $\alpha$ 1mCR iznad 23,47 mg/g kreatinina. U skupini sumnjivih s nalazom iznad 23,47 mg/g kreatinina, a temeljem ROC krivulje za nefropatiju, moglo bi se očekivati da će prijeći u populaciju bolesnih tj. da će oboljeti. Interesantan je podatak da ispitanici iz podskupine sumnjivih koji su imali  $\alpha$ 1mCR iznad 23,47 njih 78% je imalo pozitivnu obiteljsku anamnezu. Metodom binarne logističke regresije je pokazano kako pozitivna obiteljska anamneza za EN velikom značajnošću utječe na činjenicu hoće li netko oboljeti od nefropatije ili ne. Osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom u ovom istraživanju je imala 5,8 puta veću vjerojatnost oboljeti od nefropatiju nego li osoba bez pozitivne obiteljske anamneze. Uzimajući u obzir navedeno, sumnjivi s  $\alpha$ 1mCR iznad 23,47 mg/g kreatinina uz pozitivnu obiteljsku anamnezu, predstavljaju najugroženiju skupinu ispitanika u endemskim selima kod kojih bi se mogla očekivati pojava nefropatije.

TGF $\beta$  je jedan od ključnih čimbenika u bubrežnoj fibrozi a kako je EN bubrežna bolest koju karakterizira nalaz izrazite hipocelularne fibroze intersticija s tubularnom atrofijom (25, 141-

142) za očekivati je da će vrijednosti TGF $\beta$  biti povećane u oboljelih od EN. Međutim, u ovom istraživanju nije bilo razlike između pojedinih SZO podskupina u koncentraciji TGF $\beta$  u mokraći iako je uočen trend snižavanja količine TGF $\beta$  od bolesnih preko sumnjivih u odnosu na preostale podskupine (**Slika 16.**). Djukanović i sur. (148) su na malom uzorku ispitanika u Srbiji pokazali da je medijan koncentracije TGF $\beta$ 1 u mokraći bio značajno viši u oboljelih od EN nego li u zdravih kontrola, dok nije bilo razlike u TGF $\beta$ 1 u odnosu na bolesnike s glomerulonefritisom. Važno je za spomenuti kako su i u ovom istraživanju autori u skupinu oboljelih od EN objedinili bolesne i sumnjive prema Danilovićevim kriterijima, dok u našem istraživanju su oboljeli od EN uključivali samo ispitanike iz podskupine bolesnih prema SZO kriterijima. Osim toga, u našem istraživanju nije korištena ELISA za određivanje TGF $\beta$  u mokraći već biološki test TGF $\beta$ -osjetljivih BL41 stanica s luciferaznom aktivnošću (150). Naime, komercijalnim testovima se određuje samo tip 1 TGF $\beta$  (ELISA), dok primjenjenim testom u ovom istraživanju sva tri tipa TGF $\beta$  vezivanjem na TGF $\beta$  receptore na stanici i aktivacijom TGF $\beta$  Smad signalnog puta. S obzirom na navedeno bilo bi za očekivati da će razlike između SZO podskupina biti značajnije. Međutim, ovim istraživanjem to nije potvrđeno. U našem istraživanju nije bilo povezanosti između TGF $\beta$  i dijagnoze nefropatije ( $r_s=0,072$   $P=0,062$   $N=680$ ), kao niti između TGF $\beta$  i tubularnih biljega LAP ( $r_s=0,224$   $P<0,001$   $N=680$ ) i  $\alpha$ 1mCR, ACR i eGFR. (**Tablica 19.**). Također u istraživanju De Muro i sur. (150) nije bilo povezanosti između pokazatelja bubrežne funkcije i TGF $\beta$ 1 u mokraći u različitim ispitivanim nefropatijama. Naime, postoje oprečni podaci o povezanosti TGF $\beta$  i histoloških promjena u bubregu. U istraživanjima de Muro i Hamarakija (150, 171) nije bilo povezanosti između TGF $\beta$ 1 u mokraći i stupnja fibroze u promatranim tubulointersticijskim bolestima koje nisu uključivale EN. S druge strane, u istraživanjima Murakamija i Yamamote TGF $\beta$ 1 u mokraći je korelirao sa stupnjem intersticijske fibroze u ispitivanim glomerularnim bolestima (122,172). S obzirom da u ovom istraživanju nisu rađene biopsije bubrega iz etičkih razloga, nije moguće potvrditi povezanost TGF $\beta$  u mokraći i stupnja fibroze u oboljelih od EN tj. bolesnih prema SZO kriterijima.

Osim za već spomenute tubularne biljege htjeli smo također ispitati ima li i koliko TGF $\beta$  dijagnostičku značajnost u isključivanju zdravih odnosno dijagnostičku značajnost u otkrivanju bolesnih u ispitivanom uzorku. ROC analizom točnije usporedbom veličina površina ispod ROC krivulja  $\alpha$ 1mCR i TGF $\beta$  za nefropatiju dobili smo da je prediktivna vrijednost  $\alpha$ 1mCR za nefropatiju značajnije veća tj. da je  $\alpha$ 1mCR test osjetljiviji i specifičniji nego li TGF $\beta$  (razlika između površina ispod krivulje= $0,375$ ,  $SE=0,046$ ,  $95\%$   $IP$   $0,285-0,465$ ,



$z=8,165$ ,  $P<0,001$ ) te da TGF $\beta$  ne zadovoljava kriterije za probir kao niti za dijagnosticiranje u ovoj bolesti (158). (**Slika 23.**)

Osim toga, u ovom istraživanju nije nađena razlika u površinama ROC krivulja između LAP i TGF $\beta$  (razlika između površina ispod krivulje= $0,106$ ,  $SE=0,0573$ ,  $95\%$  IP  $-0,00645-0,218$ ,  $z=1,847$ ,  $P=0,065$ ) tj. nije bilo značajne razlike u osjetljivosti i specifičnosti spomenutih biljega. Ovi rezultati upućuju da TGF $\beta$  nije dobar biljeg u razlikovanju pojedinih SZO podskupina kao niti oboljelih od EN (bolesnih prema SZO) u odnosu na ostale ispitivane podskupine u EN selima.

Terminalni stadij EN makroskopski obilježavaju izrazito mali simetrično skvrčeni bubrezi glatkih kontura (46, 49). U ovom istraživanju uzdužni promjeri kao i debljine parenhima oba bubrega su bili značajno manji u bolesnih u usporedbi sa svim preostalim ispitivanim podskupinama (svi  $P<0,001$ ), dok su ispitanici u kontrolnim selima imali značajno veće uzdužne promjere i debljine parenhima oba bubrega u usporedbi sa svim preostalim ispitivanim podskupinama u uzorku (svi  $P<0,05$ ). Sumnjivi su također imali manje uzdužne promjere i debljine parenhima u odnosu na rizične i ostale ispitanike u EN selima kao i na ispitanike u kontrolnim selima, dok nije bilo razlike u uzdužnim promjerima i debljini parenhima između podskupina rizičnih i ostalih u EN selima ( $P>0,05$ ). (**Slika 14.** i **Slika 15.**)  
Opisani rezultati upućuju da su ultrazvučni pokazatelji veličine bubrega i debljine parenhima značajni u razlikovanju pojedinih SZO podskupina, Slične rezultate su dobili Djukanovic i sur. (173) Ovi su autori također pokazali da je uz spomenuti  $\alpha$ 1mCR uzdužni promjer bubrega značajan u razlikovanju oboljelih od EN s jedne strane od zdravih kontrola (ispitanici bez bubrežne bolesti bez obzira na etiologiju) odnosno drugih bubrežnih bolesti s druge strane (170). Ponovno su ovi autori u skupini oboljelih objedinili bolesne i sumnjive prema Danilovićevima kriterijima, dok kod nas svaka podskupina je uzeta zasebno. No bez obzira na različite kriterije rezultati oba istraživanja upućuju da je ultrazvuk urotrakta važan u postavljanju dijagnoze nefropatije kao i probiru rizične populacije u EN selima.

## **6. ZAKLJUČAK**

## Zaključci:

1. Prevalencija bolesnih, sumnjivih, rizičnih i ostalih u EN selima se nije značajnije mijenjala posljednjih tridesetak godina
2. Ostali i rizični u EN selima vjerojatno neće razviti bubrežnu bolest. Naime, prije tridesetak godina u dobi u kojoj se sada nalaze spomentute podskupine (45-50 godina) su bili oboljeli od EN, a u ovom istraživanju ostali i rizični nemaju znakove bubrežne bolesti što govori u prilog mogućeg nestanka endemske nefropatije.
3. Anemija nije dobar niti bitan parametar u razlikovanju pojedinih SZO podskupina pa više ne treba biti uključena u kriterije za EN.
4. Test trakom za eritrocituriju nije dobar test probira za potencijali tumor prijelanog epitela gornjeg mokraćnog sutava u EN selima.
5. Procjena bubrežne funkcije pomoću MDRD jednadžbe je bolja od kreatinina u serumu u razlikovanju bolesnih i sumnjivih u odnosu na preostale SZO podskupine (rizične i ostale) pa stoga treba biti uključena u kriterije za EN.
6. LAP i TGF $\beta$  u mokraći nisu dobri biljezi za dijagnosticiranje EN kao niti za probir populacije u EN selima.
7.  $\alpha$ 1mCR je značajan biljeg u razlikovanju pojedinih SZO podskupina u EN selima te preporučena vrijednost  $\alpha$ 1mCR ne bi trebala više biti dosadašnjih 15 mg/g kreatinina već 23,5 mg/g kreatinina.
8. Uzdužni promjer kao i debljina parenhima bubrega su značajni pokazatelji u razlikovanju pojedinih SZO podskupina pa bi stoga trebali biti uključeni u kriterije za EN.
9. Osobe s pozitivnom anamnezom za EN imaju 5,8 puta veću vjerojatnost oboljeti od EN nego li osobe bez pozitivne anamneze bez obzira u kojoj se SZO podskupini nalazi, osim naravno već onih koji boluju od nefropatije. Stoga bi pozitivna obiteljska anamneza za EN trebala ostati kao jedan od bitnih kriterija za EN.
10. Sumnjivi s pozitivnom anamnezom za EN s  $\alpha$ 1mCR većim od 23,5 mg/g kreatinina predstvaljaju najugroženiju skupinu osoba u EN selima budući da bi se kod njih mogla očekivati pojava EN.

## **7. SAŽETAK**

EN je kronična nefropatija aristolohične kiseline čija se učestalost nije bitnije mijenjala posljednjih tri desetljeća. U EN selima bilježi se pomak u postavljanju dijagnoze EN prema starijoj dobi. Ostali i rizični u EN selima vjerojatno neće razviti nefropatiju budući da su prije tri desetljeća u dobi u kojoj se sada nalaze spomenute SZO podskupine (45-50 godina) bili oboljeli od EN, a rizični i ostali sada nemaju znakove bubrežne bolesti što otvara pitanje ranije izloženosti spomenutih podskupina etiološkom čimbeniku kao i pitanje mogućeg nestanka EN.

Anemija koja je inače obilježje kronične bubrežne bolesti nije se pokazala dobrim biljegom u razlikovanju pojedinih SZO podskupina pa više ne treba biti uključena u dijagnostičke kriterije. Osim toga, nije bilo razlike između kontrolnih i EN sela kao niti između pojedinih SZO podskupina test trakom za eritocituriu, pa time taj test nije dobar test probira za tumor prijelaznog epitela mokraćnog sustava.

Iako ranu fazu EN karakterizira oštećenje proksimalnog tubula određivanje LAP se nije pokazalo korisno u razlikovanju pojedinih SZO podskupina kao niti EN sela od kontrolnih sela. Osim toga, progresijom nefropatije naročito u uznapredovaloj fazi prisutna je intersticijska fibroza a TGF $\beta$  je ključni čimbenik u procesu bubrežne fibroze (99). Prema nekim istraživanjima koncentracija TGF $\beta$  u mokraći ne pokazuje povezanost sa stupnjem bubrežne fibroze (153; 171). U našem istraživanju TGF $\beta$  u mokraći nije se pokazao korisnim kako u razlikovanju pojedinih SZO podskupina tako i u dijagnosticiranju EN.

Procjena bubrežne funkcije prema MDRD jednadžbi kao i uzdužni promjeri i debljina parenhima bubrega su se pokazali kao značajni pokazatelji u razlikovanju pojedinih SZO podskupina u ovom istraživanju te bi ih trebalo uključiti u dijagnostičke kriterije za EN. Također jedan od značajnih biljega u probiru i dijagnosticiranju EN u istraživanju bio je i  $\alpha$ 1mCR. Na temelju naših rezultata granična vrijednost za probir populacije u EN selima bi trebala biti 23,5 mg/g kreatinina, a ne dosadašnjih 15 mg/g, dok za postavljanje dijagnoze EN 31,5 mg/g kreatinina.

Pozitivna obiteljska anamneza za EN za 5,8 puta povećava vjerojatnost oboljenja od EN u odnosu na one bez pozitivne anamneze pa je bitan kriterij u probiru populacije u EN selima ali i u dijagnosticiranju EN.

Ukupno gledajući, osobe s pozitivnom obiteljskom anamnezom za EN što odgovara podskupini rizičnih prema SZO kriterijima kao i onih s  $\alpha$ 1mCR iznad 23,5 mg/g kreatinina koji u ovom istraživanju obuhvaćaju dio podskupine sumnjivih prema SZO kriterijima čine posebno ugrožene skupine za razvoj EN te zahtijevaju redovito medicinsko praćenje.

## **8. SUMMARY**

EN is a chronic aristolochic acid nephropathy whose prevalence has not been changed significantly in the last 3 decades. In EN villages there has been a shift towards an older age in diagnosing EN. We do not expect the development of EN in persons in the WHO subgroups of others and those at risk because at their age (45-50 yrs) 30 years ago there were persons in WHO subgroup of the diseased, but in this study the persons in the subgroups of others and those at risk do not have the signs of kidney disease. The aforementioned data rise the question of the exposure to etiological agent 30 years ago as well as the question of plausible disappearance of EN.

Anemia, a characteristic of a chronic kidney disease, has not shown to be a good marker in differentiating WHO subgroups and therefore should not be used as a diagnostic criterion for EN. Furthermore, there was no difference in blood in urinary dipstick test between EN and control villages as well as among the study subgroups, Therefore, this test is not a good screening tool in detecting those with urothelial tumor among farmers in EN villages.

Although the early phase of EN is characterized by the proximal tubule damage, the proximal tubule enzyme LAP has not shown to be a good marker in differentiating the study subgroups. Moreover, the progression of EN, especially in the advance stage of the disease is characterized by interstitial renal fibrosis and TGF $\beta$  in renal fibrosis plays a central role (99).

Several studies have shown no correlation between urinary TGF $\beta$  and histological findings of renal fibrosis (153, 171). In our study urinary TGF $\beta$  has not shown to be a good marker in differentiating the study subgroups.

In our study the assesment of kidney function by MDRD formula as well as both kidney length and parenchima thickness, have shown to be good markers in differentiating the study subgroups and therefore should be implemented into the diagnostic criteria for EN.

Also,  $\alpha$ 1mCR has shown to be a great marker in screening and diagnosing EN in the study, Based on our results the cut off value of  $\alpha$ 1mCR for screening should be 23,5 mg/g creatinine instead of 15 mg/g creatinine in the present criteria, while for making a diagnosis of EN 31,5 mg/g creatinine.

Positive family history for EN increases 5,8 times the risk for developing EN compared to a negative one. Therefore, positive family history for EN is an important criterion for screening and diagnosing EN.

Taken together, persons with positive family history for EN, i.e WHO subgroup of those at risk as well as those with  $\alpha$ 1mCR greater than 23,5 mg/g creatinine who in our study partly

represent persons in the WHO subgroup of suspected of having EN, are persons with greater risk for developing EN and therefore should be regularly followed up by their GPs.



## **9. POPIS LITERATURE**

1. Čeović S, Miletić Medved M. Epidemiological features of endemic nephropathy in focal area of Brodska Posavina, Croatia. U: Čvorišćec, Čeović, Stavljenić-Rukavina, ur. Endemic nephropathy in Croatia, Zagreb: Academia Croatica scientiarum medicarum; 1996, str. 7-23.
2. Miletić-Medved M, Prevalence of endemic nephropathy and urothelial cancers in Croatia. Coll Antropol 2006; 30 Suppl1:43.
3. Tanchev Y, Evstatiev Z, Dorosiev G i sur. Studies on nephritis in the region of Vratza. Svr Med 1956;7:14-29.
4. Danilovic V. Chronic nephritis due to ingestion of lead contaminated flour. Brit Med J 1958;1:27-8.
5. Pichler O, Bobinac E, Miljuš B, Sindik A. Growing occurrence of kidney injuries in the district of Slavonski Brod. Liječ Vjesn 1959;81:295-306,
6. Imamović G, Trnančević S, Mesić E, Stipančić Ž. Endemic (Balkan) nephropathy in Bosnia and Herzegovina: current status. Coll Antropol 2006; 30 Suppl1:41.
7. Bukvić D, Marić I, Arsenović A, Janković S, Djukanović L. Prevalence of Balkan endemic nephropathy has not changed since 1971 in the Kolubara region in Serbia. Kidney Blood Press Res 2007; 30 Suppl2:117-23.
8. Čeović S, Pleština R, Miletić-Medved M, Stavljenić A, Mitar J, Vukelić M. Epidemiological aspects of Balkan endemic nephropathy in a typical focus in Yugoslavia, IARC Sci Publ1991;115:5-10.
9. Petronić VJ, Bukurov NS, Djokić MR i sur. Balkan endemic nephropathy and papillary transitional cell tumors of the renal pelvis and ureters, Kidney Int Suppl 1991;34:S77-9
10. Belicza M, Dubravić A, Leniček T i sur. Comparison of upper urinary tract carcinomas in Brodsko-posavska endemic nephropathy region with those in the pathoanatomical registry of Sestre milosrdnice University hospital in Zagreb. Coll Antropol 2006; 30 Suppl1:68.
11. 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.
12. Voice TC, Long DT, Radanović Z i sur. Critical evaluation of environmental exposure agents suspected in the etiology of Balkan endemic nephropathy. Int J Occup Environ Health 2006;12:369–76.

13. Tatu CA, Orem WH, Finkelman RB, Feder GL. The Etiology of Balkan Endemic Nephropathy: Still More Questions than Answers, *Environ Health Perspect* 1998; 106:689-700.
14. Stefanovic V, Toncheva D, Atanasova S, Polenakovic M. Etiology of Balkan Endemic Nephropathy and Associated Urothelial Cancer. *Am J Nephrol* 2006;26:1-11.
15. O'Brien E, Dietrich DR. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit Rev Toxicol* 2005;35:33-60.
16. Clark HA, Snedeker SM. Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2006;9:265-96.
17. Mantle PG. Minimum tolerable exposure period and maximum threshold dietary intake of ochratoxin A for causing renal cancer in male Dark Agouti rats. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:2419-24.
18. Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. U: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Some Naturally Occurring Substances. Lyon: IRAC; 1993, str.489-521.
19. 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.
20. Turesky RJ. Perspective: Ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1082-90.
21. Mally A, Zepnik H, Wanek P i sur. Ochratoxin A: Lack of Formation of Covalent DNA Adducts. *Chem Res Toxicol*.2004;17:234-42.
22. Mally A, Hard GC, Dekant W. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: Lessons from toxicity studies in rats. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:2254-60.
23. Notier JL, Vanherweghem. For patients taking herbal therapy – lessons from aristolochic acid nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:1512-17,
24. Yang CS, Lin CH, Chang SH, Hsu HC. Rapidly progressive fibrosing interstitial nephritis associated with Chinese herbal drugs. *Am J Kidney Dis* 2000;35:313-8.
25. Debelle FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem. *Kidney International* 2008;74:158-69.
26. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, Wese FX, van Ypersele de Strihou C. Urothelial lesions in Chinese-herb nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1999;33:1011-7.

27. Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH i sur. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*) *N Engl J Med* 2000; 342:1686-92.
28. 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 International* 1994;45:1680-8.
29. Jonge H, Vanrenterghem Y. Aristolochic acid: common culprit of Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:39-41.
30. Schmeiser HH, Arlt VM, Ferluga D i sur. Aristolochic acid as a risk factor for Balkan endemic nephropathy. *Facta Universitatis Medicine and Biology* 2002;9:53-9.
31. Ivić M. The problem of etiology of endemic nephropathy. *Liječ Vjes* 1969; 91:1278-81.
32. Hranjec T, Kovač A, Kos J i sur. The case for chronic poisoning by *Aristolochia*. *Croat Med J* 2005;46:116–25.
33. Grollman AP, Scarborough J, Jelaković B. Aristolochic acid nephropathy: an environmental and iatrogenic disease. *Adv Mol Tox* 2009;3:211-27.
34. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M i sur. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:12129–34.
35. Jelaković B, Karanović S, Vuković-Lela I i sur. Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney International* 2012;81:559-67.
36. Wu MJ, Lian JD, Yang CR i sur. High cumulative incidence of urinary tract transitional cell carcinoma after kidney transplantation in Taiwan. *Am J Kidney Dis* 2004; 43:1091-7.
37. Report on Carcinogens. 12th ed, US: Department of Health and Human Services Public Health Service National Toxicology Program; 2011, str.45-9.
38. Cvitković A, Vuković Lela I, Edwards K i sur. Could disappearance of endemic (Balkan) nephropathy be expected in forthcoming decades. *Kidney Blood Press Res* 2011;23;35:147-52.
39. Radonić M, Radošević Z, Clinical features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol* 1992;30:189-92.
40. Pleština R. Some features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol* 1992;30:177-81.

41. Tanchev Y, Dorossiev D. The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. U: Castegnaro M, Pleština R, Dirheimer G, Cherozemsky IN, Bartsch H, ur. Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. Lyon: IRAC; 1991, str. 21-8.
42. Pleština S, Stavljenić A, Čević S, Fuchs R. Haematological features of the population of the area of Croatia, Yugoslavia, endemic for Balkan nephropathy. U: Castegnaro M, Pleština R, Dirheimer G, Cherozemsky IN, Bartsch H, ur. Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. Lyon: IRAC; 1991, str. 43-6.
43. Pavlovic-Kentera V, Clemons GK, Trbojevic S, Dirnkovic N, Djukanovic LJ. Erythropoietin and anaemia in the progression of Balkan endemic nephropathy and other renal disease. *Nephron* 1990;54:139-43.
44. Dimitrov PS, Simeonov VA, Tsoleva SD, Bonev AG, Georgieva RB, Karmaus WJ. Increased blood pressure in adult offspring of families with Balkan endemic nephropathy: a prospective study. *BMC Nephrol* 2006;23:7-12.
45. Medverec Z, Lučić Đ, Martinović M, Dittrich D, Perković A, Endemic nephropathy – the urologists' point of view. *Coll Antropol* 2006; 30 Suppl1:70.
46. Vukelić M, Šoštrić B, Belicza M. Pathomorphology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxic* 1992;30:193-200.
47. Ferluga D, Hvala A, Vizjak A, Trmačević S, Halilbašić A. Renal function, protein excretion, and pathology of Balkan endemic nephropathy, III. Light and electron microscopic studies. *Kidney International* 1991;40Suppl34: S57-S67.
48. Ferluga D. Balkan endemic nephropathy. U: Vizjak A, Ferluga D, Bussolati G, ur. Update in Pathology, Proceedings of the Nineteenth European Congress of Pathology 2003 Sep 6-11; Ljubljana, Slovenia: University of Ljubljana; 2003, str. 244-7.
49. Stefanović V, Cosyns JP, Balkan Nephropathy. U: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Ponticelli C, Ritz E, Winearls CG, van Ypersele C, ur. Oxford Textbook of Clinical Nephrology. New York: Oxford University Press; 2005, str.1095-1101.
50. Cosyns JP, van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs (and other rare causes of interstitial nephropathy). U: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Ponticelli C, Ritz E, Winearls CG, van Ypersele C, ur. Oxford Textbook of Clinical Nephrology. New York: Oxford University Press; 2005, str. 1103-8.
51. WHO: The "Endemic Nephropathy" of South-Eastern Europe, *Bull World Health Organ* 1965;32:441-8.

52. Čvorišćec D. Early diagnosis of endemic nephropathy. *Clin Chim Acta* 2000; 297:85-91.
53. Danilović V: Diagnosis of endemic nephropathy, *Radovi XLVII AN BiH* 1973;17:53-64.
54. Stefanović V. Diagnostic criteria for endemic (Balkan) nephropathy. U: Strahinjić S, Stefanović V, ur. *Current Research in Endemic (Balkan) Nephropathy*. Niš: University Press; 1983, str. 351-63.
55. National Kidney Foundation: K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification, *Kidney Disease Outcome Quality Initiative*. *Am J Kidney Dis* 2002; 39Suppl1:1-266.
56. Čvorišćec D, Čeović S, Boršo G, Stavljenić Rukavina A. Endemic nephropathy in Croatia. *Clin Chem Lab Med*. 1998;36:271-7.
57. Čvorišćec D, Stavljenić Rukavina A. Laboratory diagnosis of endemic nephropathy, U: Čvorišćec, Čeović, Stavljenić-Rukavina, ur. *Endemic nephropathy in Croatia*, Zagreb: Academia Croatica scientiarum medicarum; 1996, str. 77-87.
58. Itoh Y, Cooper EH, Stavljenić Rukavina A, Čvorišćec D. Urinary alpha 1 microglobulin levels in surveys of Balkan endemic nephropathy. *Biomed Pharmacother* 1986;40:341-4.
59. Christensen EI, Birn H, Verroust P, Moestrup SK. Membrane receptors for endocytosis in renal proximal tubule. *Int Rev Cytol* 1998;180: 237-84.
60. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280: 562-73.
61. Burton CJ, Walls J. Proximal tubular cell, proteinuria and tubulo-interstitial scarring. *Nephron* 1994;68:287-93.
62. Remuzzi G, Ruggenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney International* 1997;51:2-15.
63. R, Lauwerys, Bernard A. Preclinical detection of nephrotoxicity: description of the tests and appraisal of their health significance. *Toxicology Letters* 1989;46:13-29.
64. Finn WF, Porter GA. Urinary biomarkers: Recommendations of the joint European/Unites Sates Workshop for future reseaech. *Renal Failure*1999;21:445-51.
65. Nortier JL, Deschodt-Lanckman MM, Simon S i sur. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring neural endopeptidase enzymuria. *Kidney International*1997;51:288-93

66. Debelle FD, Nortier JL, De Prez EG i sur. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:431-6.
67. Raab W. Experimentelle Untersuchungen über Veränderungen der "Leucinaminopeptidase"-Aktivität des Harnes. *Wien Klin Wochenschr* 1966;78:364-9.
68. Scheler F, Bergmann H. Elevated aminopeptidase activity in the urine in acute renal failure. *Proc Eur DialysisTransplant Ass.* 1964;1:129-131.
69. Raab W. Renal effects of antituberculous antibiotics. *Pathol Microbiol* 1970; 36:73-80.
70. Raab W. The effect of tritoqualine in anaphylactic and anaphylactoid shock in rats, evaluated by renal enzyme excretion studies. *Med Exp* 1969;19:301-11.
71. Innerfield I, Harvey B, Luongo F, Blincoe E. Urine peptidase activity following single and multiple doses of streptokinase. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964;116:573-9.
72. Donaldson MDC, Chambers RE, Woolridge MW, Whicher JT. Stability of alpha 1-microglobulin, beta 2- microglobulin and retinol binding protein in urine. *Clin Chim Acta* 1989;179:73-8.
73. Schardijn G, van Eps LWS, Swaak AJG, Kager JCGM, Persijn JP. Urinary  $\beta$ 2-microglobulin in upper and lower urinary tract infections. *Lancet* 1979;1:805-7.
74. Penders J, Delanghe JR. Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications. *Clinica Chimica Acta* 2004;346:107–18.
75. Payn MM, Webb MC, Lawrence D, Lamb EJ.  $\alpha$ 1-microglobulin is stable in human urine ex vivo. *Clin Chem* 2002;48:1136-8.
76. Honkanen E, Pettersson T, Teppo AM. Urinary  $\alpha$ 1m- and beta2-microglobulin in light chain proteinuria. *Clin Nephrol* 1995;44:22–7.
77. Grundy JE, McKeating JA, Sanderson AR, Griffiths PD. Cytomegalovirus and  $\beta$ 2 microglobulin in urine specimens, Reciprocal interference in their detection is responsible for artifactually high levels of urinary  $\beta$ 2 microglobulin in infected transplant recipients. *Transplantation* 1988;45:1075-9.
78. 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;23:1252-6.
79. Yu H, Yanagisawa Y, Forbes MA, Cooper EH, Crockson RA, MacLennan ICM: alfa 1-Microglobulin: an indicator protein for renal tubular function. *J Clin Pathol* 1983;36: 253–9.

80. 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;24:195–201.
81. Chia KS, Tan AL, Chia SE, Ong CN, Jeyaratnam J. Renal tubular function of cadmium exposed workers. *Ann Acad Med Singapore* 1992;216:756–9.
82. Endo G, Konishi Y, Kiyota A, Horiguchi S. Urinary  $\alpha$ 1m-microglobulin in lead workers. *Bull Environ Contam Toxicol* 1993;50:744–9.
83. 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;45:136–7.
84. Campanello M, Herlitz H, Hultberg B, Zachrisson BF, Akerlund S, Jonsson O. Serum levels of IgG antibodies against Tamm-Horsfall protein and urinary excretion of NAG and  $\alpha$ 1m-microglobulin as possible markers for tubular damage in patients with a continent ileal reservoir for urinary diversion. *Scand J Urol Nephrol.* 1997;31:237–43.
85. Duraj FF, Backman L, Dati F, Ringden O. Serum levels of  $\alpha$ 1m-microglobulin and beta 2-microglobulin in bone marrow transplant recipients treated with cyclosporin A. *Transpl Int* 1991;4:146–50.
86. Pflaiderer 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  $\alpha$ 1m-microglobulin and Tamm-Horsfall protein. *Clin Investig* 1993;71:972–7.
87. Brocco E, Fioretto P, Mauer M i sur. Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Kidney International*1997;63: 40–44.
88. Walton C, Bodansky HJ, Wales JK, Forbes MA, Cooper EH. Tubular dysfunction and microalbuminuria in insulin dependent diabetes. *Arch Dis Child* 1988;63:244–9.
89. 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;33:169–72.
90. Hong CY, Hughes K, Chia KS, Ng V, Ling SL. Urinary  $\alpha$ 1-microglobulin as a marker of nephropathy in type 2 diabetic Asian subjects in Singapore. *Diabetes Care* 2003;26:338-42.



91. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann Intern Med* 1999;130:461-70.
92. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31-41.
93. Richards N, Harris K, Whitfield M i sur. The impact of population – based identification of chronic kidney disease using estimated glomerular filtration rate (eGFR) reporting. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:556-61.
94. Quinn MP, Rainey A, Cairns KJ, Marshall AH, Savage G, Kee F. The practical implications of using standardized estimation equations in calculating the prevalence of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:542-8.
95. Rule AD, Larson TS, Bergstrahl EJ, Slezak JM, Jacobsen SJ, Cosio FG. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2004;141:929-37.
96. Ravitz MJ, Wenner CE. Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv Cancer Res* 1997;71:165-207.
97. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8:21-43.
98. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738-46.
99. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-92.
100. Barnard JA, Lyons RM, and Moses HL. The cell biology of transforming growth factor  $\beta$ . *Biochim Biophys Acta* 1990;1032:79-87.
101. Massague J. The transforming growth factor-beta family., *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.
102. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE i sur. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 1998;93:1159-70.
103. Blobe GD, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transformin Growth Factor  $\beta$  in Human Disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-8.
104. Taipale J, Saharinen J, Keski-Oja J. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res* 1998; 75:87-134.

105. Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 1999;13:2105-24.
106. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 1994;370:341-7.
107. Yu L, Hebert MC, Zhang YE. TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad independent TGF- $\beta$  responses. *EMBO J* 2002;21:3749-59.
108. Yue J, Mulder KM. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta. *Methods Mol Biol.* 2000;142:125-31.
109. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM i sur. Transforming growth factor type B induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Nati Acad Sci USA* 1987;84:5788-92.
110. Gold LI, Lee TC, Reibman J, Cronstien R, Weissmann G. TGF- $\beta$  selectively induces neutrophil chemotaxis. *J Cell Biochem* 1990;14:294.
111. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor  $\beta$ . *J Exp Med* 1987;165:251-6.
112. Kim SJ, Jeang KT, Glick AB, Sporn MB, Roberts AB. Promoter sequences of the human transforming growth factor-beta 1 gene responsive to transforming growth factor-beta 1 autoinduction. *J Biol Chem* 1989;264:7041-5
113. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK i sur. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:4167-71.
114. Sporn MB, Roberts AB, Shull J, Smith J M, Ward JM. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science (Wash, DC)* 1983;219:1329-30.
115. Massague J. The TGF $\beta$  family of growth and differentiation factors. *Cell* 1987; 49:437-8.
116. Ignatz, RA, Massague J. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Bio Chem* 1986;261:4337-45.
117. Bassols, A, Massague J. Transforming growth factor  $\beta$  regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1988;263:3039-45.

118. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ i sur. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* 1987;6:1899-1904.
119. Laiho M, Saksela O, Keski-Oja J. Transforming growth factor- $\beta$  induction of type-plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem* 1987;262:17467-74.
120. Igotz RA, Massague J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- $\beta$  action. *Cell* 1987;51:189-97.
121. Border WA, Ruoslahti E. Transforming Growth Factor- $\beta$  in Disease: The Dark Side of Tissue Repair. *J Clin Invest* 1992;90:1-7.
122. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA. Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1814-8.
123. Yoshioka K, Takemura T, Murakami K i sur. Transforming growth factor-beta protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest* 1993;68:154-63.
124. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE i sur. Increased levels of transforming growth factor-beta in HIV-associated nephropathy. *Kidney International* 1999; 55:579-92.
125. Bottinger EP, Bitzer M, TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 2002;13:2600–10.
126. Hirschberg R. Wound healing in the kidney: complex interactions in renal interstitial fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2005;16: 9–11.
127. Zeisberg M, Strutz F, Müller GA. Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:315-20.
128. Iwano M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13:279-84.
129. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial–mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1776–84.
130. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1–12.
131. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation, *J Invest Dermatol* 2002;118:211-5.

132. Lan HY. Diverse roles of TGF- $\beta$ /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci.* 2011;7:1056-67.
133. Zhou L, Fu P, Huang XR i sur. Mechanism of chronic aristolochic acid nephropathy: role of Smad3. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298:1006-17.
134. Yang J, Zhang X, Li Y i sur. Downregulation of Smad transcriptional corepressors SnoN and Ski in the fibrotic kidney: an amplification mechanism for TGF-beta1 signaling. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:3167-77.
135. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:96-107.
136. Yang J, Dai C, Liu Y. A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:68-78.
137. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H i sur. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003;9:964-8.
138. Edgton KL, Gow RM, Kelly DJ i sur. Plasmin is not protective in experimental renal interstitial fibrosis. *Kidney International* 2004;66:68-76.
139. Yang J, Shultz RW, Mars WM i sur. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 2002;110:1525-38.
140. Cheng S, Lovett DH. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol* 2003;162:1937-49.
141. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C i sur. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993;341:387-91.
142. Yang CS, Lin CH, Chang SH, Hsu HC. Rapidly progressive fibrosing interstitial nephritis associated with Chinese herbal drugs. *Am J Kidney Dis* 2000;35: 313-18.
143. Pozdzik AA, Salmon IJ, Debelle FD i sur. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney International* 2008;73:595-607.
144. Hsin YH, Cheng CH, Tzen JT, Wu MJ, Shu KH, Chen HC, Effect of aristolochic acid on intracellular calcium concentration and its links with apoptosis in renal tubular cells. *Apoptosis* 2006;11:2167-77.

145. Yang L, Li X, Wang H. Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:445–56.
146. Li J, Zhang Z, Wang D, Wang Y, Li Y, Wu G. TGF-beta 1/Smads signaling stimulates renal interstitial fibrosis in experimental AAN. *J Recept Signal Transduct Res* 2009;29:280-5,
147. Wang Y, Zhang Z, Shen H i sur, TGF-beta1/Smad7 signaling stimulates renal tubulointerstitial fibrosis induced by AAI. *J Recept Signal Transduct Res* 2008; 28:413-28.
148. Đjukanović Lj, Ležaić V, Momčilović M i sur. Transforming growth factor-beta 1 in Balkan endemic nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2009;111:127-32.
149. Hirschberg R, Wang S. Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005;14:43-52.
150. De Muro P, Faedda R, Fresu P i sur. Urinary transforming growth factor-beta1 in various types of nephropathy. *Pharmacol Res* 2004;49:293-8.
151. Song JH, Cha SH, Lee HJ i sur. Effect of low-dose dual blockade of rennin-angiotensin system on urinary TGF- $\beta$  in typ 2 diabetic patients with advanced kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:683-9.
152. 2007 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). *Eur Heart J* 2007;28:1462-536.
153. Rogier E, Durrbach A, Abecassis L i sur. A novel biological assay to detect the active form of TGF-beta in urine to monitor renal allograft rejection. *Kidney International* 2005;68:1875-83.
154. National Kidney Disease Education Program, Laboratory professionals: Creatinine Standardization Program, <http://www.nkdep.nih.gov/labprofessionals/index.htm> Pristupljeno 20. listopada 2011.
155. Uslu S, Efe B, Alatas O i sur. Serum Cystatin C and urinary enzymes screening markers of renal dysfunction in diabetic patients, *J Nephrol* 2005;18:559-67.
156. Toncheva D, Dimitrov T, Stojanova J. Etiology of Balkan endemic nephropathy: multifactorial disease? *Eur J Epidemiol* 1998;14:389-94.

157. Colton T, Regression and correlation, U: T, Colton, ur, Statistics in medicine, Boston: Little, Brown &Co; 1974, str. 189-217.
158. Guyatt G, Rennie D, Jaeschke R, Guyatt G, Lijmer J, Diagnostic tests, U: Guyatt G, Rennie D, ur, Users' guides to the medical literature, Chicago: AMA Press; 2002, str. 121-40.
159. Cukuranovic R, Petrovic B, Cukuranovic Z, Stefanovic V. Balkan endemic nephropathy: a decreasing incidence of the disease, Pathol Biol 2000;48:558-61.
160. Dimitrov PS, Simeonov VA, Ganev VS, Karmaus WJ. Is the incidence of Balkan endemic nephropathy decreasing? Pathol Biol 2002;50:38-41.
161. Stefanović V, Mitić-Zlatković M, Cukuranović R, Vlahović P. Increased urinary protein excretion in children from families with balkan endemic nephropathy. Nephron Clin Pract 2003;95:116-20.
162. 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;20:1016-21.
163. Karthikeyan VJ, Lip GY. Alpha 1-microglobulin: a further insight into inflammation in hypertension? Am J Hypertens 2007;20:1022-3.
164. Pleština S. Diagnosis and treatment of patients with upper urothelial cancers. Coll Antropol 2006; 30 Suppl1:64.
165. Bistorović D, Čeović S, Čeović J, Leko N, Mitar J, Miletić-Medved M, The role of cytology in early diagnosis of epithelial tumours in endemic population. U: Čvorišćec, Čeović, Stavljenić-Rukavina, ur. Endemic nephropathy in Croatia, Zagreb: Academia Croatica scientiarum medicarum; 1996, str. 87-95.
166. Škegro D, Sabljarić-Matovinović M, Miletić-Medved M i sur. Renal tumors in population exposed to endemic nephropathy: an ultrasound follow-up study. Coll Antropol 2006; 30 Suppl1:73.
167. Kovač-Peić A-M, Miletić-Medved M, Kos J i sur. Carcinoma frequency in Croatian endemic focus. Coll Antropol 2006; 30 Suppl1:69.
168. Bukvić D, Janković S, Arsenović A, Marić I, Djukanović Lj. Urinary tract tumors in an endemic region. Coll Antropol 2006; 30 Suppl1:65.
169. Mokos I, Pasini J, Štern-Padovan R, Mrsić S, Ries S. Renal allograft-preserving surgery in a patient with endemic nephropathy and urothelial carcinoma in the transplanted kidney. Coll Antropol 2006; 30 Suppl1:71.

170. Djukanović L, Marinković J, Marić I i sur, Contribution to the definition of diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 2008; 23:3932-8.
171. Haramaki R, Tamaki K, Fujisawa M, Ikedo H, Haramaki N, Okuda S. Steroid therapy and urinary transforming growth factor-beta1 in IgA nephropathy. *Kidney Dis* 2001;38:1191-8.
172. Murakami K, Takemura T, Hino S, Yoshioka K. Urinary transforming growth factor-beta in patients with glomerular diseases, *Pediatr Nephrol*, 1997;11:334-6.
173. Djukanovic L, Bukvic D, Maric I. Creatinine clearance and kidney size in Balkan endemic nephropathy patients. *Clin Nephrol* 2004;61:384-6.

## **10. ŽIVOTOPIS**



Rođena sam 1979, godine u Zagrebu gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Nakon mature u zagrebačkoj Gimnaziji „Lucijan Vranjanin“ 1998. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje sam i diplomirala 2004. godine. Obavezni pripravnički staž obavila sam u Kliničkoj bolnici za plućane bolesti „Jordanovac“ u Zagrebu. 2006, godine sam položila državni ispit. Od rujna 2005. godine radim kao znanstveni novak – asistent Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na istraživačkom projektu prof. dr. Bojana Jelakovića. 2005. godine upisala sam znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U ožujku 2007. godine započela sam specijalizaciju iz interne medicine. Tijekom 2008. i 2009. godine boravila sam u Zavodu za eksperimentalnu nefrologiju u laboratoriju za eksperimentalnu hormonologiju Medicinskog fakulteta Slobodnog sveučilišta u Briselu u Belgiji, gdje sam se bavila istraživačkim radom u području eksperimentalne proteomike pod vodstvom profesorice Joelle L, Nortier.

Dobitnica sam i međunarodnih nagrada (2007. godine ISH – ESH „Jiri Widimsky, sr.“ za mlade istraživače za značajan znanstveni doprinos iz područja hipertenzije, Milano, Italija; 2009, godine druga nagrada na 5. Srednjoeuropskom kongresu o hipertenziji u Zagrebu).

Autor sam ukupno 18 znanstvenih radova od kojih su 3 publicirana u časopisima koji se citiraju u Current Contents.