

Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula u endemskoj nefropatiji

Kos, Jelena

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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:105:362748>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Jelena Kos

**Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula
u endemskoj nefropatiji**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.

Doktorski rad je izrađen u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Klinike za unutrašnje bolesti Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb te u Zavodu za nefrologiju Brigham and Women's Hospital u Bostonu, SAD.

Doktorski rad je nastao u sklopu znanstveno-istraživačkih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta br. 108-0000000-0329 "Endemska nefropatija u Hrvatskoj - epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza" i Hrvatske zaklade za znanost br. 04-38 „Molekulsko profiliranje i proteomika karcinoma urotela“. Voditelj oba projekta je prof. dr. sc. Bojan Jelaković.

Mentor: prof. dr. sc. Bojan Jelaković

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Bojanu Jelakoviću na podršci, strpljenju i savjetima oko osmišljavanja, provođenja i pisanja doktorskoga rada. Također, zahvaljujem se dr. sc. Josipu Jurasu na pomoći oko statističke obrade podataka.

Hvala kolegama iz Zavoda za nefrologiju KBC Zagreb na pomoći, potpori i razumijevanju.

Hvala mojoj obitelji čija mi je podrška i motivacija tijekom svih ovih godina neizmjereno značila.

Hvala svima koji su na bilo koji način pridonijeli nastanku ovoga doktorskog rada.

SADRŽAJ

Popis kratica i oznaka

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija endemske nefropatije u Hrvatskoj	2
1.2. Etiologija endemske nefropatije.....	5
1.2.1. Nefropatija kineskih trava - nefropatija aristolohične kiseline (AAN).....	6
1.2.2. Povezanost endemske nefropatije i nefropatije kineskih trava	7
1.2.3. Genotoksičnost i karcinogenost aristolohične kiseline	9
1.2.4. Nefrotoksičnost aristolohične kiseline	11
1.3. Klinička slika endemske nefropatije	12
1.4. Laboratorijski, radiološki i patohistološki nalaz u endemskoj nefropatiji	13
1.5. Dijagnostički kriteriji	14
1.6. Oštećenje proksimalnoga tubula	17
1.6.1. <i>Kidney injury molecule-1</i> (KIM-1)	18
1.6.2. Faktor rasta hepatocita (HGF)	20
1.6.3. Interferonom gama induciran protein 10 (IP-10/CXCL10).....	22
2. HIPOTEZA	24
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	26
4. ISPITANICI I METODE.....	28
4.1. Ispitanici	29
4.1.1. Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula i endemska nefropatija.....	29
4.1.2. Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula i pogoršanje bubrežne funkcije.....	31
4.2. Metode.....	33
4.3. Statistička analiza.....	34
5. REZULTATI.....	36
5.1. Rezultati za ispitanike endemskih i kontrolnih sela te za endemske podskupine klasificirane prema „Bračkoj“ klasifikaciji	37
5.1.1. Demografski podatci	38
5.1.2. Kliničke osobitosti ispitanika.....	40
5.1.3. Laboratorijski pokazatelji	41
5.2. Rezultati za ispitanike klasificirane u endemske podskupine prema modificiranoj SZO klasifikaciji i kontrolne ispitanike	48
5.2.1. Demografski podatci	48

5.2.2.	Kliničke osobitosti ispitanika.....	50
5.2.3.	Laboratorijski pokazatelji	51
5.3.	Usporedba novih biljega tubularnoga oštećenja s dosadašnjim biljegom tubularnoga oštećenja omjerom alfa-1 mikroglobulina i kreatina u urinu	55
5.4.	Usporedba novih biljega tubularnoga oštećenja u ispitanika koji u endemskim selima žive dulje odnosno kraće od 20 godina.....	56
5.5.	Analize povezanosti	57
5.6.	ROC analize	68
5.7.	Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula i pogoršanje bubrežne funkcije	70
5.7.1.	Novonastala kronična bubrežna bolest u sedmogodišnjem periodu	73
5.7.2.	Pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu.....	79
6.	RASPRAVA	84
7.	ZAKLJUČAK.....	95
8.	SAŽETAK.....	98
9.	SUMMARY	100
10.	POPIS LITERATURE	103
11.	ŽIVOTOPIS	117

Popis kratica i oznaka

25.-75. P. – 25.-75. percentila

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

AA – aristolohična kiselina (engl. aristolochic acid)

AA – I – aristolohična kiselina 1

AA – II – aristolohična kiselina 2

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

AL – aristolaktam

ACR – omjer koncentracije albumina i kreatinina u urinu (engl. albumin-creatinine ratio)

ANOVA – analiza varijance (engl. analysis of variance)

AUC – površina ispod krivulje (engl. area under the curve)

C – medijan

CXCR – receptor CXC citokina

CKD – kronična bubrežna bolest (engl. chronic kidney disease)

dA – deoksiadenozin

dG - deoksigvanozin

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

EMA – engl. European Medicines Agency

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija

EN – endemska nefropatija

F – vrijednost testa analize varijance

FDA – engl. Food and Drug Administration

GUP – glukoza u plazmi

H – vrijednost Kruskal-Wallis testa

Hb - hemoglobin

HGF – faktor rasta hepatocita (engl. hepatocyte growth factor)

IP-10/CXCL-10 – interferonom gama induciran protein 10 (engl. Interferon gamma inducible protein 10)

ITM – indeks tjelesne mase

KDIGO – engl. Kidney Disease Improving Global Outcome

KIM-1 – engl. kidney injury molecule 1

MCP-1- engl. monocyte chemotactic protein-1

NAG - N-acetil- β -D-glukozaminidaza

NF- κ B – engl. nuclear factor kappa B

NGAL – engl. neutrofil gelatinase-associated lipocalin

OAT – organski anionski transporteri

OR – omjer šansi (engl. odds ratio)

P – statistička vjerojatnost (engl. probability)

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

rS – Spearmanov koeficijent povezanosti

SD – standardna devijacija

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

t – vrijednost Studentova testa

TGF- α – transformirajući faktor rasta α

TGF- β - transformirajući faktor rasta β

U – vrijednost Mann - Whitneyevog testa

UAE – izlučivanje albumina urinom (engl. urinary albumin excretion)

VEGF – engl. vascular endothelial growth factor

X – aritmetička sredina (engl. mean)

α -GST - α -glutathion-S-transferaza

α 1M – alfa-1mikroglobulin u urinu

α 1MCR – omjer alfa-1mikroglobulina i kreatinina u urinu (engl. alfa1mikroglobulin – creatinine ratio)

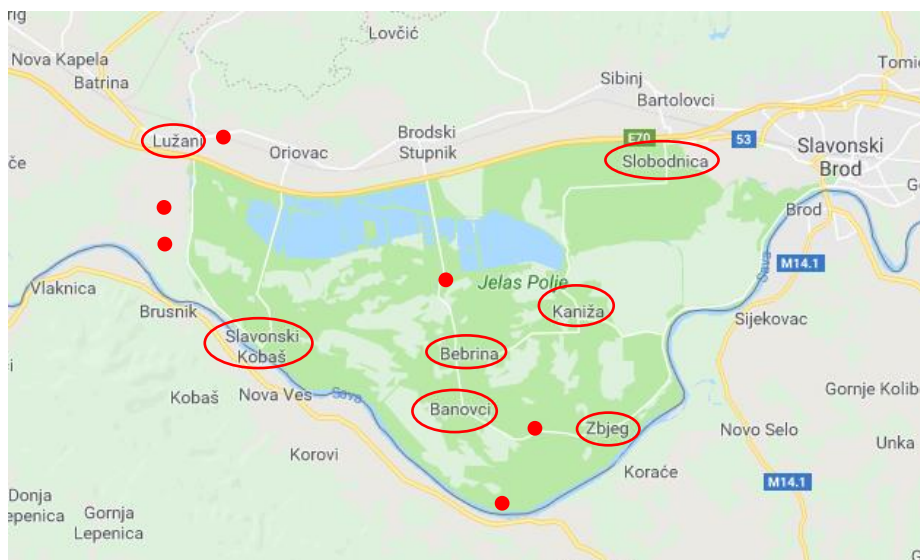
χ^2 – vrijednost testa proporcija (engl. chi square test)

1. UVOD

1.1. Epidemiologija endemske nefropatije u Hrvatskoj

Endemska nefropatija (EN) je kronična tubulointersticijska bolest bubrega, sporo progresivnoga tijeka, koja u konačnici dovodi do terminalnoga bubrežnog zatajenja. Povezana je s karcinomima prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava. Kao klinički entitet prepoznata je sredinom prošlog stoljeća. Bugarski su autori 1956. godine opisali prve slučajeve endemske nefropatije (1), a nedugo zatim slijede izvještaji o EN u Hrvatskoj (2), Srbiji (3) i Rumunjskoj (4). U slavonskobrodskoj bolnici registriran je tijekom 1956. i 1957. godine veći broj bolesnika iz Brodske Posavine s kroničnom bubrežnom bolesti te je posljedično tomu 1957. i 1958. godine provedeno prvo epidemiološko terensko istraživanje (tzv. perlustracija) u selima Bebrina i Pričac (2). Prema crkvenim zapisima o umrlima bolest je postojala i desetljećima ranije (2). Prvi dokumentirani slučaj endemske nefropatije u Hrvatskoj je obdukcijски nalaz kronične intersticijske nefropatije u bolesnika iz Slavnskoga Kobaša preminuloga na internom odjelu Kliničkoga bolničkog centra Zagreb 1949. godine (5). Slavonski Kobaš bio je jedno od sela s najvećim brojem oboljelih u našem endemskom žarištu te se bolest u narodu zvala „Kobaška bolest“. Odmah nakon prvih opisa bolesti u svim su endemskim regijama počela opsežna istraživanja s ciljem otkrivanja uzroka bolesti, epidemioloških i kliničkih karakteristika kao i dijagnostičkoga algoritma te preventivnih mjera i liječenja. Na temelju provedenih istraživanja (1-13) utvrđene su karakteristike bolesti: a) specifična geografska distribucija – endemska nefropatija zahvaća jasno definirana područja uz velike pritoke Dunava u Hrvatskoj, Srbiji, Bosni i Hercegovini, Bugarskoj i Rumunjskoj i ta se distribucija nije promijenila do danas (14), b) zahvaćeno je isključivo ruralno stanovništvo endemskoga kraja u odrasloj dobi, a mlađi od 18 godina ne obolijevaju, c) mozaička distribucija - uz endemska sela u neposrednoj blizini nalaze se nezahvaćena neendemska sela, d) u endemskom selu zahvaćena su samo određena kućanstva, u pravilu <10% kućanstava (tzv. “crne kuće”), e) obiteljska zahvaćenost, ali ne po nasljednom tipu (obolijevaju i članovi kućanstva koji nisu krvni srodnici), f) povezanost s većom učestalošću karcinoma prijelaznog epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava. Sve navedeno sugeriralo je da se radi o okolišnom uzročniku bolesti koji ima nefrotoksično i karcinogeno djelovanje u predisponiranih osoba. Velika učestalost dvije inače rijetke bolesti, kronične intersticijske nefropatije i karcinoma prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava, u usko ograničenom geografskom prostoru ukazivala je kako je riječ o zajedničkom okolišnom uzročniku. S obzirom da bolest nije nikada opisana kod djece za razvoj manifestne bolesti potreban je dug period izloženosti.

U Hrvatskoj endemsko žarište zahvaća četrnaest sela uz rijeku Savu zapadno od Slavanskoga Broda u ranije često plavljenom Jelas Polju. To su Banovci, Bebrina, Brodski Varoš, Dubočac, Kaniža, Lužani, Malino, Pričac, Slavonski Kobaš, Slobodnica, Stupnički Kut, Šumeće, Zbjeg i Živike (slika 1). U tim selima danas živi oko 10 000 stanovnika (15).



Slika 1. Hrvatsko endemsko žarište (karta preuzeta s *google maps*)

Istraživanja provedena u hrvatskome endemskom žarištu na ukrajinskim doseljenicima koji su se krajem 19. i početkom 20. stoljeća naselili u endemskim selima pokazala su da nakon perioda boravka u endemskom selu od 15 do 20 godina doseljenici obolijevaju od EN u jednakoj mjeri kao i autohtono stanovništvo (16). S druge strane ukrajinski doseljenici koji su se nastanili u susjednim neendemskim selima nisu obolijevali od EN. I na koncu, endemska nefropatija nije nikada opisana u Ukrajini. Taj „prirodni pokus“ pokazao je kako se zaista radi o okolišnom čimbeniku kao uzročniku endemske nefropatije. Ta misteriozna bolest koja se javljala u zemljama jugoistočne Europe zaintrigirala je svjetsku znanstvenu zajednicu te je 1964. godine u Dubrovniku pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) održana konferencija o endemskoj nefropatiji (17) na kojoj je usvojen naziv endemska nefropatija, jasno je definirana bolest te su usvojeni prvi kriteriji za dijagnosticiranje bolesti. U tom ranom periodu još je jedna međunarodna konferencija u organizaciji CIBA fondacije održana 1967. godine u Londonu (18).

Prije nego što je održana SZO konferencija o endemskoj nefropatiji na kojoj su usvojeni prvi dijagnostički kriteriji, prevalencija bolesti bila je prema izvještajima iz različitih endemskih žarišta vrlo različita i kretala se od 3,9 do 23,8%, a prevalencija osoba sumnjivih

da boluju od EN od 4,2 do 36,7% (6) što je odraz primjene različite metodologije istraživanja i neujednačene definicije bolesti.

Prema prvim izvještajima zamijećeno je da žene obolijevaju dva puta češće nego muškarci (2) što se u zadnjim istraživanjima gubi i taj se omjer kreće oko 1:1,2 (19). Prevalencija endemske nefropatije u našem endemskom žarištu u razdoblju 1975-1991. godine iznosila je prosječno 4,4% (0,7% Šumeće, 8,3% Pričac), a ako se bolesnima pridruže i sumnjivi da boluju od EN prevalencija je iznosila do 20% (20,21). Sveobuhvatnim epidemiološkim terenskim istraživanjima (tzv. perlustracije) provedenim u Brodskoj Posavini 2005., 2008. i 2010. godine u devet 9 endemskih sela utvrđen je pad prevalencije bolesti koja se sada prosječno kreće oko 1% (0,0 do 2,3% ovisno o endemskom selu), a sumnjivih da boluju od EN 3,9% (0,9 do 6,5%) (19). Prevalencija od 0% registrirana je u selu Dubočac u kojemu nije utvrđen nijedan oboljeli od endemske nefropatije, a također nije bilo nijednog bolesnika s karakterističnim karcinomom prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava. Pad prevalencije zapažen je i u većini drugih endemskih žarišta (22,23), no izvještaj iz jednoga žarišta u Srbiji navodi nepromijenjenu prevalenciju EN (24). Međutim, dodatnom analizom metodologije korištene u tom radu može se razabrati kako je i tu riječ o istom trendu. U svim je recentnim istraživanjima utvrđen pomak dobi u kojoj se javlja klinički razvijena slika endemske nefropatije prema starijim dobnim skupinama (19,22,23,24) što ukazuje na smanjenu izloženost stanovnika uzročnom čimbeniku. U našem je endemskom žarištu prosječna dob bolesnih sada 74 godine, a sumnjivih 60 godina (19). I u srpskom endemskom fokusu oko Kolubare, u kojem je zabilježena nepromijenjena prevalencija EN, bolesnici su značajno stariji nego ranije što sve ukazuje na smanjenu izloženost okolišnom faktoru. Pomak prema starijim dobnim skupinama jasno je vidljiv i prema dobi bolesnika koji zadnjih desetak godina započinju s liječenjem kroničnom hemodijalizom u slavonskobrodskoj bolnici, ali i u Lazarevcu, dok u Nišu zadnjih godina i nema više novih bolesnika s EN koji se počinju liječiti ovom metodom nadomještanja bubrežne funkcije. Sedamdesetih godina prošloga stoljeća u endemskom kraju provedene su mnoge mjere s ciljem eliminacije inkriminiranih čimbenika koji bi mogli biti uzročnici endemske nefropatije. Među njima bili su izgradnja savskoga nasipa, drenažnih sustava na poljima – kanala i crpnih stanica, izgradnja dubokih arteških bunara, a potom i priključivanje na vodovodnu mrežu, poboljšanje sanitarnih uvjeta i unaprjeđenje poljoprivredne tehnologije. Uz to, promijenio se način života stanovnika endemskih sela koji sve više nalikuje onom u gradovima, a sve se manje seljaka bavi poljoprivredom. Sve navedeno pridonijelo je smanjenoj izloženosti uzročnom čimbeniku i

posljedično smanjenju incidencije bolesti, ali zasigurno najveću ulogu igra upotreba zajedničkih velikih zadrugnih mlinova i poboljšanje tehnologije žetve, tj. bolja separacija sjemenki pšenice od raznih korova, pa tako i sjemenki biljke *Aristolochiae clematidis*. Kako bi ispitali tu hipotezu Jelaković i suradnici proveli su istraživanje na doseljenicima iz neendemskih područja Bosne i Hercegovine koji su se početkom devedesetih godina prošlog stoljeća, dakle nakon što je došlo do znatnih i važnih promjena tehnologije žetve, doselili u endemski kraj (25). Istraživanje je pokazalo kako u bosanskih imigranata koji u endemskom kraju borave 15-30 godina nema oboljelih od endemske nefropatije. Naročito je važno što je utvrđeno da je učestalost tubularne proteinurije značajno manja nego u autohtonog stanovništva endemskog kraja, a bez razlika prema stanovnicima neendemskih sela (25).

Važna karakteristika bolesti je i njena povezanost sa značajno višom incidencijom karcinoma prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava (26-29). Ovaj inače rijedak tip tumora javlja se značajno češće u endemskim selima, i za razliku od ostatka Hrvatske, javlja se češće u žena (27). Specifični mortalitet od karcinoma prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava 14 je puta veći u endemskim selima, nego u ostatku Brodsko-Posavske županije, a 55 puta veći nego u drugim dijelovima Hrvatske (27). U oboljelih od EN karcinom prijelaznoga epitela javlja se 40-45% slučajeva (25,27).

1.2. Etiologija endemske nefropatije

Među potencijalnim uzročnicima endemske nefropatije ispitivani su teški metali, mikotoksini, fitotoksini, elementi u tragovima, virusi, genski čimbenici i dr. (3,30-34). Za nijedan od navedenih potencijalnih uzročnika nije utvrđena jasna uzročno-posljedična veza s endemskom nefropatijom, niti je do sada utvrđena genska podloga koja bi objasnila zbog čega se bolest javlja samo u dijela izloženih stanovnika endemskih sela. Koncem prošloga i početkom ovoga stoljeća najviše se istraživao okratoksin A kao potencijalni uzročnik endemske nefropatije (35-37) što je temeljeno na opažanjima o nefrotoksičnosti ovoga okolišnog mikotoksina za životinje, poglavito svinje. No ovu je hipotezu konačno odbacila Europska agencija za sigurnost hrane zbog nedostatka dokaza o uzročnoj povezanosti okratoksina A i endemske nefropatije (38). O okratoskinu A i aristolohičnoj kiselini kao potencijalnim uzročnicima EN raspravljalo se na velikom međunarodnom simpoziju održanom u Zagrebu 2005. godine čiji su zaključci pridonijeli ovakvom stavu o okratoskinu A i bili su

nagovještaj svih ostvarenih rezultata naših istraživanja o aristolohičnoj kiselini kao uzročniku EN (39).

Proteklo desetljeće provedena su brojna istraživanja o uzročnoj povezanosti aristolohične kiseline i endemske nefropatije. Opažanja o povezanosti aristolohične kiseline i bubrežne bolesti na ovim prostorima znatno su starija. Još je davne 1954. godine Dumić objavio svoja zapažanja o pojavi nefropatije s proteinurijom u konja uzrokovanoj trovanjem korovom Vučja stopa (*Aristolochia clematitis*) (40), a Martinčić je na temelju kliničke slike i patohistološkoga nalaza bubrega uginulih konja posumnjao da bi ista biljka mogla biti povezana s razvojem endemske nefropatije u ljudi (41). Ivić je 1969. godine objavio svoja zapažanja o pojavi *A. clematitis* u poljima oboljelih od endemske nefropatije te sjemenki tog korova među sjemenkama žita, a na animalnom je modelu dokazao nefrotoksičnost navedene biljke kao i znakove tubularnoga oštećenja uz očuvane glomerule na patohistološkom nalazu bubrega intoksiciranih kunića (13). Također, dokazao je karcinogenost *A. clematitis* pojavom sarkoma na mjestu injiciranja ekstrakta navedene biljke (42). Nažalost ti njegovi vrijedni rezultati nisu prihvaćeni od tadašnjih znanstvenika i stručnjaka. Takvom stavu pridonijeli su i rezultati Čeovića i suradnika (6) koji nisu uočili povezanost *A. clematitis* i EN, no u to vrijeme povezanost nisu ni mogli dokazati zbog tada nedostupnih sofisticiranih metoda kojima danas raspolažemo. Stoga je hipoteza o *A. clematitis* kao potencijalnom uzročniku EN bila posve zanemarena sljedećih tridesetak godina.

1.2.1. Nefropatija kineskih trava - nefropatija aristolohične kiseline (AAN)

Početkom devedesetih godina prošloga stoljeća opisani su slučajevi akutnoga bubrežnog oštećenja koje je vrlo brzo progrediralo u terminalni stadij kronične bubrežne bolesti u stotinjak mladih, do tada zdravih, belgijskih žena koje su u jednoj eminentnoj belgijskoj klinici uzimale preparate za mršavljenje (43). Sastavni elementi tih pripravaka godinama su bili ekstrakti korijena tradicionalnih kineskih biljaka. Međutim, 1991. godine netko je sa željom da poboljša do tada korištenu formulu dodao u „koktel“ biljke *Stephania tetrandra* i *Magnolia officinalis* koje imaju diuretska svojstva. Može se pretpostaviti kako je cilj bio da diuretski učinak *S. tetrandre*, uz dodatni gubitak nekoliko kilograma zbog izmokravanja, pridonese dojmu boljega učinka na tijek liječenja pretilosti. Nažalost, osoba koja je pokušala unaprijediti „koktel“ nije bila dovoljno upućena u kinesku farmakopeju te je ubrzo dokazano kako je došlo do zamjene biljke *S. tetrandra* biljkom *Aristolochia fangchi* koja u kineskoj farmakopeji

pripada istoj Fang Ji terapijskoj obitelji. Procijenjeno je da je izloženih žena bilo oko 1000, a od nefropatije kineskih trava, kako je nazvana ta bolest, oboljelo je njih 5%. U onih bolesnica u kojih je bubrežno zatajenje progrediralo u terminalnu fazu preko 40% imalo je i pridruženi karcinom prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava (44). Ta je hipoteza o *Aristolochia spp.* kao uzročnom nefrotoksinu i karcinogenu u ovih bolesnica definitivno potvrđena fitokemijskom analizom i dokazom aristolohične kiseline u uzorcima praha „*Stephania tetrandra*“ u belgijskim ljekarnama (45), potom dokazom aristolaktam DNA adukata u tkivu bubrega (46) i karcinomima urotela u izloženih bolesnica (44) te konačno na eksperimentalnom animalnom modelu (47,48). Cosyns i suradnici su prvi uočili podudarnost patohistološkoga nalaza bolesnica oboljelih od nefropatije kineskih trava i bolesnika s EN (49). Slično bubrežno oštećenje tubularnoga tipa, sličan patohistološki nalaz tkiva bubrega te povezanost s inače rijetkim karcinomom prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava pobudili su sumnju da su nefropatija kineskih trava i endemska nefropatija uzrokovane istim uzročnikom (49-52).

1.2.2. Povezanost endemske nefropatije i nefropatije kineskih trava

Ova su belgijska istraživanja ponovo oživjela staru i ranije neopravdano odbačenu Ivićevu hipotezu o *A. clematidis* kao uzročniku endemske nefropatije. U posljednjih petnaestak godina provedena su ekstenzivna istraživanja u hrvatskom endemskom žarištu pod vodstvom profesora Bojana Jelakovića u suradnji s velikim međunarodnim timom stručnjaka koje je predvodio profesor Arthur P. Grollman kojima je dokazano kako je aristolohična kiselina uzročnik EN.

Rezultati prvoga istraživanja provedenoga 2005. godine u sklopu ovoga velikog i dugotrajnog projekta (53) potvrdili su veću izloženost *A. clematidis* oboljelih od endemske nefropatije. Oboljeli su češće viđali biljku *A. clematidis* u svojim poljima te sjemenke *A. clematidis* među sjemenkama pšenice tijekom žetve. Kontaminacija pšenice sjemenkama *A. clematidis* te posljedično brašna korištenoga za izradu kruha, nekada glavne prehrambene namirnice u endemskom kraju, pretpostavljeni je put unosa aristolohične kiseline u organizam. Analizom sjemenki *A. clematidis* iz endemskoga kraja izračunato je da bi dnevni unos 1/2 kg kruha pripremljenoga od brašna kontaminiranoga samo jednom sjemenkom *A. clematidis* kroz 10 godina bio dovoljan da se dosegne kumulativna doza aristolohične kiseline poput one kojoj su bile izložene žene u belgijskoj kohorti (53). Nakon ovih zapažanja, uslijedila su daljnja

istraživanja koja su dokazala neupitnu uzročno-posljedičnu vezu između aristolohične kiseline i endemske nefropatije (39,53-56). Dokazani su aristolaktamski DNA adukti u tkivu bubrega bolesnika s EN i u tkivu karcinoma prijelaznoga epitela bolesnika iz endemskog kraja što je bila potvrda ranije izloženosti aristolohičnoj kiselini (54). Osim toga, u desetine bolesnika s endemskom nefropatijom i karcinomom prijelaznog epitela utvrđeno je da je dominantna mutacija u spektru mutacija p53 gena transverzija A:T → T:A (56) što je karakteristična tzv. „*fingerprint*“ mutacija za karcinome prijelaznoga epitela uzrokovane aristolohičnom kiselinom (57,58). Ta mutacija inače je rijetka u karcinomima prijelaznog epitela u općoj populaciji. Dok se u belgijskoj kohorti radilo o relativno kratkotrajnoj ingestiji (nekoliko mjeseci) visokih doza aristolohične kiseline kroz biljne pripravke za mršavljenje što je dovelo do bržeg razvoja bubrežnoga zatajenja, u endemskoj nefropatiji radi se o dugotrajnom unosu malih količina aristolohične kiseline koji polagano, ali progresivno dovode do bubrežnoga zatajenja nakon perioda od minimalno 15 do 20 godina izloženosti (39). Vrlo je važno napomenuti kako smo u našoj kohorti bolesnika imali i skupinu bolesnika iz bosanskoga žarišta oko Odžaka i Orašja te smo time dokazali kako je aristolohična kiselina uzročnik EN ne samo u hrvatskom nego i bosanskom žarištu. Naš dugogodišnji suradnik profesor Jovan Nikolić poslao nam je uzorke svojih bolesnika iz srpskoga žarišta oko Lazarevca tako da smo dokazali kako je aristolohična kiselina uzročnik endemske nefropatije i u Srbiji (56). I na koncu, ono što nas posebno raduje jest podatak kako su naši znanstveni takmaci, skupina znanstvenika iz Njemačke, Velike Britanije i Rumunjske dokazali prisutnost aristolaktamskih adukata i tipične mutacije u rumunjskih bolesnika s EN (59). Time je potvrđeno kako je s jedne strane EN zaista identična bolest u svim balkanskim zemljama, a s druge strane nepobitno je potvrđeno kako je aristolohična kiselina njezin uzročnik.

Genska istraživanja koja su u tijeku nastoje odgovoriti zbog čega se tek u manjega broja izloženih bolesnika javlja nefropatija i/ili karcinom prijelaznoga epitela, dok drugi izloženi ostaju nezahvaćeni. Podudarnost između belgijskih i balkanskih bolesnika očituje se i u jednakoj učestalosti obolijevanja izloženih osoba koja iznosi oko 5% i u belgijskoj kohorti i ranije u endemskom kraju. To ukazuje kako su isti polimorfizmi i/ili mutacije bilo na genima za metabolizam aristolohične kiseline, bilo uključenih u reparaciju DNA prisutni u obje kohorte bolesnika. Ti rezultati potvrđeni su i kod bolesnika s Tajvana liječenih pripravcima tradicionalne kineske medicine koji su sadržavali aristolohičnu kiselinu (60). Danas je prihvaćeno i usvojeno kako su nefropatija kineskih trava i endemska nefropatija zapravo jedan entitet - nefropatije uzrokovane aristolohičnom kiselinom, a razlikuju se kliničkim tijekom

ovisno o trajanju, dozi i načinu ekspozicije aristolohičnoj kiselini (61,62). Opisno se može reći kako je EN okolišni oblik, a nefropatija kineskih trava jatrogeni oblik nefropatije aristolohične kiseline. Karakteristike EN i nefropatije kineskih trava prikazane su u tablici 1.

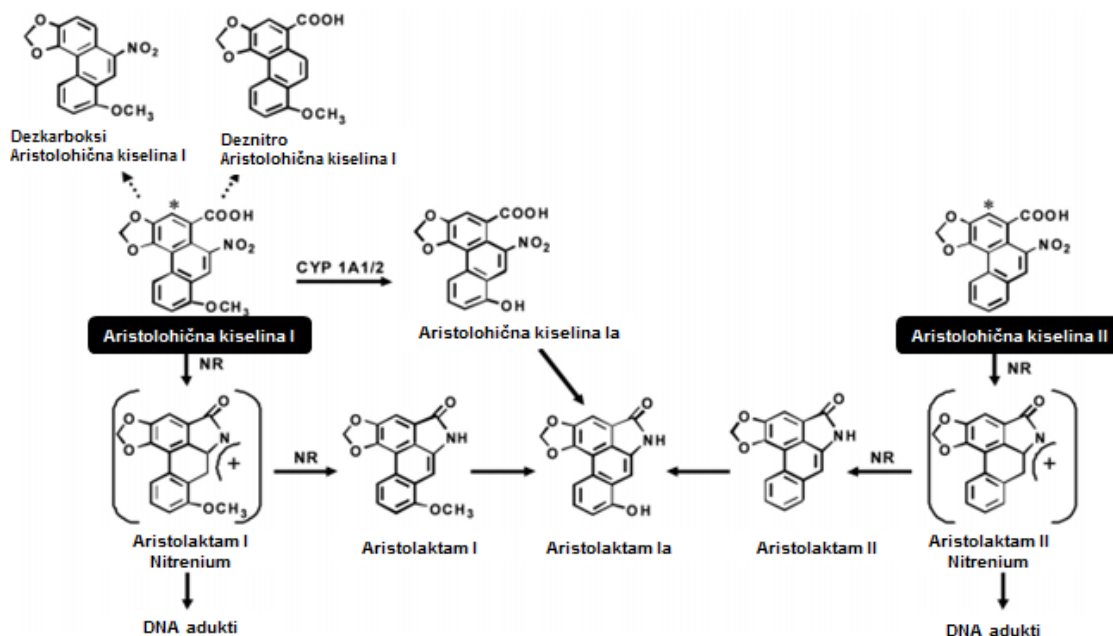
Tablica 1. Karakteristike nefropatije kineskih trava i endemske nefropatije

	Nefropatija kineskih trava	Endemska nefropatija
Etiologija	Aristolohična kiselina	Aristolohična kiselina
Vrijeme do razvoja terminalnog bubrežnog zatajenja	6 mjeseci do 2 godine	15 do 20 godina
Izgled bubrega	Smanjeni, nepravilnih kontura, bez kalcifikata	Smanjeni, glatke površine, bez kalcifikata
Histologija:		
• Stanična infiltracija	+	+
• Fibroza	++	++
• Atrofija	++	+++
Kapilaroskleroza	+	+
Apoptoza	++	++
Karcinom prijelaznog epitela	+ (gornji dio mokraćnog sustava)	+ (gornji dio mokraćnog sustava)
Obiteljsko pojavljivanje	-	+

Prema De Broe ME. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney Int.* 2012; 81: 513-15.

1.2.3. Genotoksičnost i karcinogenost aristolohične kiseline

Sve biljke porodice *Aristolochia* sadrže aristolohičnu kiselinu I (8-metoksi-6-nitro-fenantro (3,4-d)-1,3-dioksolo-5-karboksilna kiselina, AAI) i aristolohičnu kiselinu II (6-nitro-fenantro (3,4-d)-1,3-dioksolo-5-karboksilna kiselina, AAI), nitrofenantrenske karboksilne kiseline čijom nitroredukcijom u stanicama nastaju reaktivni intermedijarni metaboliti aristolaktam I i aristolaktam II. Aristolaktami (AL) se kovalentno vežu za egzociklične amino skupine na deoksiadenozinu (dA) i deoksigvanozinu (dG) tvoreći aristolaktamske DNA adukte (63) (slika 2).



Slika 2. Metabolizam aristolohične kiseline i stvaranje adukata

Prilagođeno prema Dickman K, Sweet D, Bonala R i sur. *Physiological and Molecular Characterization of Aristolochic Acid Transport by the Kidney*. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338:588-597.

Nortier i sur. su pokazali da AL-dA adukti perzistiraju godinama nakon prestanka izloženosti aristolohičnoj kiselini te služe kao dugotrajni (doživotni) biljeg ranije izloženosti *Aristolochia* sp. (44). Takve rezultate uočili smo i mi u naših endemskih bolesnika, i onih s nefropatijom i onih s karcinomom prijelaznoga epitela. Još su istraživanja u ranim 80-im godinama prošloga stoljeća pokazala da aristolohična kiselina ostvaruje svoje mutagene učinke vezanjem njenih metabolita na DNA te je već tada svrstana kao genotoksični karcinogen (64,65). Kasnija su istraživanja pokazala da AL- DNA adukti aktiviraju *ras* onkogen u tumorskim stanicama miševa uzrokujući specifičnu mutaciju – transverziju A→T u kodonu 61 *ras* gena (CAA→CTA) (66,67). Istraživanja na staničnim kulturama i na tumorima prijelaznoga epitela bolesnika s AAN opetovano su pokazala karakterističnu mutaciju u p53 genu (tzv. „fingerprint“ ili „signature“ mutaciju), a to je transverzija A→T na neprepisujućem lancu DNA (57,58). Važno je odmah ukazati na činjenicu da se mutacija događa na neprepisujućem lancu, a to znači na dijelu DNA koji se ne može reparirati.

Na temelju tih i drugih istraživanja o karcinogenosti aristolohične kiseline, Međunarodna agencija za istraživanja raka (IARC) 2002. godine svrstala je *Aristolochia* sp. među dokazane humane karcinogene (68). Sasvim suprotno od zaključka i stava prema okratoksinu A.

1.2.4. Nefrotoksičnost aristolohične kiseline

Aristolohična kiselina (AA) odgovorna je za nefrotoksični učinak *Aristolochia spp.* Prema kliničkoj slici, laboratorijskom i patohistološkom nalazu, mjesto toksičnoga bubrežnog oštećenja su proksimalni tubuli što je i potvrđeno na animalnim modelima (69-71). Kao što je već rečeno, AA označava skupinu strukturno sličnih fenantrenskih karboksilnih kiselina među kojima su dominantne aristolohična kiselina I i aristolohična kiselina II. Ove dvije kiseline međusobno se razlikuju po jednoj O-metoksi skupini u položaju 8 koja je prisutna u AA-I, a nije prisutna u AA-II. S obzirom da su istraživanja na animalnim modelima pokazala toksičnost AA-I, ali ne i AA-II (69,70), čini se da je ova funkcionalna skupina kritična za nefrotoksičnost *Aristolochia spp.* AA se *in vivo* metabolizira na više načina. CYP1A1/2 katalizira demetilaciju AA-I čime nastaje netoksična AA-Ia (72). Enzimskom nitroredukcijom (NAD(P)H:kinon oksidoreduktaza (NQO1), citokrom P450 CYP 1A1/2, NAD(P)H:CYP reduktaza) nastaju aristolaktami (AL) koji nisu toksični (69), ali kao intermedijarni metabolit nastaje reaktivni aristolaktam-nitrenium ion koji se kovalentno veže za purinske baze DNA i tvori AL-DNA adukte (63). AL-DNA adukti predstavljaju premutagenu leziju odgovornu za karcinogenost AA, no s obzirom da AA-I i AA-II u podjednako mjeri tvore adukte, a samo je AA-I nefrotoksična, smatra se da nisu odgovorni za toksičnost AA (69,70). Nefrotoksičnost AA nije do danas u potpunosti razjašnjena. Dickman i suradnici pokazali su da se AA u velikoj mjeri veže za proteine plazme te da stoga ne prolazi glomerularnu filtracijsku barijeru, ali pokazuje izraziti afinitet za organske anionske transportere (OAT) na bazolateralnoj membrani proksimalnoga tubula i na taj način ulazi u stanicu proksimalnoga tubula čime se može objasniti primarno mjesto oštećenja u proksimalnom tubulu (73). Ovo je važan podatak kada se zna da je rana karakteristika EN upravo oštećenje proksimalnoga tubula što je dokazano određivanjima tubularne proteinurije i enzimurije (26,74,75), te je prema svim dosadašnjim dijagnostičkim kriterijima tubularna proteinurija jedan od ključnih dijagnostičkih elemenata za EN (76,77).

Oštećene stanice proksimalnoga tubula ulaze u proces epitelno-mezenhimalne transformacije, migriraju u intersticij što je početak procesa fibroze. Izrazita fibroza bez upalnoga infiltrata jedno je od patohistoloških obilježja EN. Na animalnim modelima dokazana je uloga oksidativnoga stresa u AAN. Nakon izlaganja AA dolazi do stvaranja značajnih količina reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala, deplecije glutaciona, neadekvatne aktivacije antioksidativnih enzima te mitohondrijskih oštećenja (78). Danas se zna da je apoptoza glavni mehanizam stanične smrti u AAN, a intersticijska upalna infiltracija odgovorna za prijelaz iz

akutnoga u kronično bubrežno zatajenje (78). Iako se smatra da je inicijalno mjesto bubrežnoga oštećenja proksimalni tubul, neka su istraživanja pokazala značajne promjene i na krvožilju. U bioptičkim uzorcima tkiva bubrega bolesnika s AAN, kao i na animalnim modelima, dokazana je značajna redukcija peritubularne kapilarne mreže te značajan nerazmjer između vazoaktivnih tvari, snižena razina dušikova oksida te povišena ekspresija endotelina 1. Iz toga proizlazi da ishemija i hipoksija dodatno doprinose progresiji u kroničnu bubrežnu bolest (78).

1.3. Klinička slika endemske nefropatije

Endemska nefropatija je sporo progresivna bolest bubrega koja se u pravilu prezentira u uznapredovalom stadiju bubrežne bolesti simptomima preterminalnoga bubrežnog zatajenja. Ti simptomi obuhvaćaju slabost i bljedilo kože kao posljedicu anemije, mršavljenje, glavobolju, poliuriju i nikturiju kao posljedicu tubularnoga oštećenja, a tek u terminalnom stadiju javljaju se edemi i arterijska hipertenzija (12,21,79). Nespecifično je, ali karakteristično za endemsku nefropatiju da je anemija (normocitna i normokromna) izraženija nego što bi to odgovaralo stupnju kronične bubrežne bolesti. Također, karakterističan je izostanak arterijske hipertenzije i edema u ranim fazama bolesti. Kao znak tubularnoga oštećenja, prvo se javlja poremećaj koncentriranja mokraće u vidu učestaloga mokrenja, ali on uglavnom ostaje neprepoznat. Bolest se dobro podnosi, ne utječe na radnu sposobnost bolesnika praktički do terminalnoga stadija (12,79). U vrijeme kada je bolest opisana, manifestna endemska nefropatija javljala se u bolesnika u dobi od 45 do 50 godina, a od dijagnosticiranja bolesti do smrti prošlo bi manje od 5 godina (6). U terminalnoj fazi bolesti su prisutni uobičajeni simptomi uremije.

Drugi aspekt kliničke slike je učestala pojava karcinoma prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava (pijelon i ureter) u endemskom kraju. Karcinomi se javljaju 10-ak godina nakon postavljanja dijagnoze EN, ali mogu joj u manjem broju slučajeva i prethoditi ili mogu biti dijagnosticirani u isto vrijeme (80,81). Najčešće se javljaju unilateralno, a prezentiraju se kao i u općoj populaciji bezbolnom hematurijom. Česti su recidivi. Znakovi uznapredovale maligne bolesti javljaju se u manjeg broja bolesnika u vidu bolova u lumbalnoj regiji, mršavljenja, palpabilne tumorske mase u abdomenu i bolova u kostima. Zbog velike učestalosti karcinoma danas je prema konsenzus dokumentu stav da bolesnicima s endemskom nefropatijom prije transplantacije bubrega mora biti učinjena binefrektomija (77).

1.4. Laboratorijski, radiološki i patohistološki nalaz u endemskoj nefropatiji

S obzirom da je u endemskoj nefropatiji, kao nefropatiji aristolohične kiseline, toksičnim djelovanjem prvenstveno zahvaćen proksimalni tubul, tubularna proteinurija rani je znak endemske nefropatije što je opaženo već od prvih istraživanja bolesti. U početku je proteinurija blaga i može biti intermitentna, a karakterizirana je ekskrecijom proteina niske molekulske mase poput $\beta 2$ -mikroglobulina, $\alpha 1$ -mikroglobulina, lakih lanaca imunoglobulina, retinol-vezujućeg proteina, lizozima, dok je ekskrecija albumina normalna ili tek blago povećana (21,75,82-84). U ovih bolesnika utvrđena je i enzimurija – povećana ekskrecija alanin-aminopeptidaze i laktat-dehidrogenaze te N-acetil- α -D-glukozaminidaze, no povišene vrijednosti navedenih enzima nalazile su se i u nezahvaćenih bolesnika endemskog kraja (21,74) tako da nisu bili korisni u dijagnostičkom algoritmu. U kasnoj fazi bolesti, kad su sekundarno zahvaćeni i glomeruli, javlja se miješana tubularna i glomerularna proteinurija. Za utvrđivanje tubularne proteinurije isprva se u endemskoj nefropatiji koristio $\beta 2$ -mikroglobulin (12,75), no kasnije se kao bolji biljeg tubularne proteinurije pokazao $\alpha 1$ -mikroglobulin (21,74). Nalaz sedimenta urina je nespecifičan, u bolesnika se može naći aseptička leukociturija, eritrociturija i cilindrija (12,21). Relativna volumna masa urina je snižena što ukazuje na smanjenu sposobnost koncentriranja urina uslijed tubularnoga oštećenja. Urinokultura je sterilna. U citologiji urina mogu se naći atipične stanice ukoliko je nefropatiji pridružen karcinom prijelaznoga epitela (85). Glomerularna filtracija ostaje dugo očuvana. U uznapredovaloj fazi deprimirane su sve bubrežne funkcije. Normocitna i normokromna anemija se javlja relativno rano u tijeku bolesti i obično je izraženija nego što bi odgovaralo stupnju bubrežnoga zatajenja. (12,21)

Ultrazvučni prikaz bubrega je normalan u ranoj fazi bolesti, a u uznapredovaloj fazi bubrezi su mali i odgovaraju kroničnom bubrežnom zatajenju.

Patohistološki nalaz nije patognomoničan za endemsku nefropatiju, ali je karakterističan i razlikuje EN od drugih najčešćih bubrežnih bolesti kao što su glomerulonefritisi, pijelonefritis, refluksna nefropatija, tubularna nekroza i dr. (86). U ranoj fazi bolesti javljaju se u površnim dijelovima korteksa multifokalna područja edema intersticija, proliferacije intersticijskog matriksa s hipocelularnim upalnim infiltratima i degeneracijom epitelnih stanica bubrežnih kanalića uz praktički intaktne glomerule (12). Napredovanjem bolesti javlja se karakteristična patohistološka slika endemske nefropatije - hipocelularna intersticijska fibroza s atrofijom bubrežnih kanalića koja je izraženija u površnim dijelovima korteksa, a manje izražena u unutarnjim dijelovima korteksa i meduli tzv.

kortikomedularni gradijent (6,12,21). U uznapredovaloj fazi javlja se periglomerularna fibroza i sekundarna skleroza glomerula, a te su promjene također izraženije u površnim dijelovima korteksa. Promjene na vaskulaturi uključuju hijalinozu arteriola i fibrozu hiperplaziju intime. Makroskopski su bubrezi u terminalnoj fazi bolesti izrazito mali, simetrično skvrčeni, glatkih kontura, težine < 50 grama (6,12,21).

Iako karakteristične, patohistološke promjene same za sebe nisu dostatne za postavljanje dijagnoze endemske nefropatije jer se slične promjene mogu uočiti i kod intoksikacije olovom, kadmijem, litijem, pamindronatom, ciklosporinom, ifosfamidom te je anamnestički važno isključiti izlaganje ovim tvarima (86).

U 40-50% bolesnika s endemskom nefropatijom odnosno nefropatijom aristolohične kiseline javlja se pridruženi karcinom prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava (pijelon i ureter) (27,29). Najčešći karcinom je neinvazivni papilarni karcinom prijelaznoga epitela. Zbog učestaloga javljanja karcinoma prijelaznog epitela u ovih bolesnika, potrebno je isključiti i abusus analgetika, iako patohistološki nalaz analgetske nefropatije uključuje intersticijske infiltrate te papilarnu nekrozu bez kortikomedularnoga gradijenta fibroze karakterističnoga za endemsku nefropatiju.

1.5. Dijagnostički kriteriji

Budući da se endemska nefropatija neovisno pojavila u nekoliko različitih geografski nepovezanih i udaljenih žarišta, u prošlosti su u svakom od njih istraživači koristili svoje improvizirane kriterije za dijagnosticiranje bolesti. To je dovelo do vrlo različitih i neusporedivih epidemioloških podataka o incidenciji i prevalenciji bolesti, a 1964. godine na sastanku u Dubrovniku pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije usvojeni su prvi dijagnostički kriteriji (17). Ti kriteriji razlikovali su tri skupine: skupina A – vjerojatno oboljeli od endemske nefropatije (pozitivna proteinurija određena dva puta pomoću sulfosalicilne kiseline, snižena relativna volumna masa jutarnjega urina, povišen serumski kreatinin, snižen hemoglobin i izostanak edema); skupina B - vjerojatno oboljeli od EN u kojih bolest napreduje (porast serumskoga kreatinina koji progredira, sniženje hemoglobina osobito ako je < 50% normalne vrijednosti); skupina C – sumnjivi da boluju od EN (osobe iz okolice oboljelih s opetovanom proteinurijom kojoj uzrok nije neka druga bubrežna bolest).

Kasnije su ti tzv. SZO kriteriji modificirani s obzirom na razvoj novih biokemijskih testova koji su mogli razlikovati tubularnu od glomerularne proteinurije, ali opet nisu bili usklađeni

između različitih endemskih centara niti po tipu biljega tubularnoga oštećenja ($\beta 2$ mikroglobulin ili $\alpha 1$ mikroglobulin), niti prema graničnim (*cut off*) vrijednostima.

U našem endemskom žarištu od 1980. godine koristili smo modificiranu SZO klasifikaciju, prema sljedećim kriterijima: a) pozitivna obiteljska anamneza odnosno pozitivna anamneza kućanstva, b) tubularna proteinurija ($\alpha 1$ mCR >14 mg/g kreatinina ili $\alpha 1$ M > 10 mg/L), c) anemija (Hb < 120 g/L u muškaraca odnosno < 113 g/L u žena), d) azotemija (serumski kreatinin $> 132,6$ μ mol/L). Uz obavezno prethodno isključenje drugih bubrežnih bolesti osoba je bila proglašena bolesnom ukoliko su prisutni a+b+c+d ili a+b+c ili b+c+d. Sumnjivi da boluju od EN bili su oni kod kojih su prisutni kriteriji a+b ili b+c. Rizični su bili oni koji su imali samo pozitivnu obiteljsku anamnezu odnosno živjeli u kućanstvu gdje je bilo oboljelih od EN. Pod ostale spadali su svi stanovnici endemskog sela u kojih nije prisutan niti jedan od navedenih kriterija. Ova klasifikacija omogućila je da rezultati epidemioloških terenskih istraživanja u našem žarištu budu međusobno usporedivi. No kako su u drugim endemskim žarištima korišteni različiti kriteriji, u Bosni i Srbiji uglavnom tzv. Danilovićevi kriteriji (87), rezultati iz različitih endemskih žarišta i dalje nisu mogli biti međusobno usporedivi što je značajno otežavalo procjenu stvarnog stanja te procjenu kretanja bolesti u budućnosti (77). Iz tih je razloga tijekom Međunarodnoga simpozija o endemskoj nefropatiji održanog na otoku Braču 2008. godine osnovana radna skupina sačinjena od vodećih stručnjaka koji se bave EN/AAN čiji je cilj bio donijeti smjernice za probir, dijagnostiku i liječenje endemske nefropatije. Konsenzus je uzeo u obzir sve recentne spoznaje i nove smjernice su objavljene 2015.godine (77). Prema tzv. „Bračkoj“ klasifikaciji koristimo drukčije kriterije i granične vrijednosti nego ranije (tablica 1). Tubularna proteinurija definirana je kao $\alpha 1$ MCR > 31.5 mg/g uz omjer alfa-1 mikroglobulina i albumina u urinu ($\alpha 1$ m/UAC) ≥ 0.91 u bolesnika s prisutnom albuminurijom. Anemija je definirana kao Hb < 120 g/L u muškaraca i žena starijih od 50 godina odnosno < 110 g/L u žena mlađih od 50 godina. Za procjenu bubrežne funkcije ne koriste se više vrijednosti serumskoga kreatinina, nego procijenjena glomerularna filtracija (eGFR) pomoću CKD EPI formule sukladno KDIGO smjernicama iz 2012. godine (88). „Bolesnima“ od endemske nefropatije smatraju se: a) osobe s dokazanom endemskom nefropatijom na temelju biopsije (karakterističan patohistološki nalaz tkiva bubrega, dokazani AA-DNA adukti u tkivu bubrega ili dokazana karakteristična mutacija p53 gena u tumorskim stanicama), b) osobe koje u endemskom *kućanstvu* borave dulje od 20 godina uz prisutnu tubularnu proteinuriju, sniženu eGFR < 60 ml/min/1,73m² i anemiju, c) bolesnici koji u endemskom *selu* borave dulje od 20 godina s dijagnosticiranim

karcinomom prijelaznoga epitela i tubularnom proteinurijom. „Sumnjivima“ se smatraju osobe koje a) žive u endemskom *kućanstvu* dulje od 20 godina s $eGFR < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ i anemijom, b) žive u endemskom *kućanstvu* dulje od 20 godina s tubularnom proteinurijom, c) žive dulje od 20 godina u endemskom *selu* i boluju od karcinoma prijelaznoga epitela. „Rizičnima“ se smatraju osobe koje a) žive u endemskom *kućanstvu* dulje od 20 godina, b) žive dulje od 20 godina u *kućanstvu* sa sumnjivima od EN ili osobama s dokazanom sporadičnom EN. U ovoj klasifikaciji pojavljuje se skupina koja ranije nije postojala, a to je „Sporadična“ EN u koju spadaju a) osobe koje boluju od karcinoma prijelaznoga epitela, a ne žive u endemskom kraju i čiji nalaz biopsije govori za endemsku nefropatiju, b) biopsija bubrega u skladu s patohistološkim karakteristikama EN u članova obitelji oboljelih od karcinoma prijelaznoga epitela izvan endemskog sela (tablica 2).

Tablica 2. „Bračka“ klasifikacija endemske nefropatije

1. BOLESNI • Patohistološki nalaz bioptata bubrega sugestivan za endemsku nefropatiju¹ • Boravak u endemskom kućanstvu > 20 godina + tubularna proteinurija² + snižena $eGFR$³ + anemija⁴ • Boravak u endemskom selu > 20 godina + karcinom urotela gornjega dijela mokraćnog sustava + tubularna proteinurija	2. SUMNJIVI • Boravak u endemskom kućanstvu > 20 godina + snižena $eGFR$³ + anemija⁴ • Boravak u endemskom kućanstvu > 20 godina + tubularna proteinurija² • Boravak u endemskom selu > 20 godina + karcinom urotela gornjeg dijela mokraćnog sustava
3. RIZIČNI • Boravak u endemskom kućanstvu > 20 godina • Boravak u kućanstvu sa sporadičnom endemskom nefropatijom > 20 godina	4. SPORADIČNA EN⁵ • Patohistološki nalaz bioptata bubrega sugestivan za EN u bolesnika s karcinomom urotela izvan endemskog sela ili u članova njegova kućanstva

¹nema patognomoničnih patohistoloških karakteristika za EN, ali karakteristična patohistološka slika u odsustvu druge bubrežne bolesti je visoko sugestivna za EN; prisutnost AA-DNA adukata i karakteristične p53 mutacije su dijagnostičke

² α -1MCR>31,5mg/g i α -1/UAC $\geq 0,91$

³ $eGFR$ (CKD EPI 2009) < 60 ml/min/1,73m²

⁴Hb < 120 g/L za muškarce i žene starije od 50 g odnosno < 110 g/L za žene < 50 godina

⁵bolesnici s kroničnom tubulointersticijskom nefropatijom u kojih su isključeni drugi mogući uzroci (refluksna nefropatija, kronični pijelonefritis, rekurentni pijelonefritis, hipertenzivna nefroskleroza, izloženost olovu, kadmiju, biljnim pripravcima u kojima ima AA, ifosfamid, ciklosporinu, pamindronatu, litiju, nitrozureji, abuzus nesteroidnih antireumatika)

(Prema Jelaković B i sur. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2014; 29: 2020-27)

1.6. Oštećenje proksimalnoga tubula

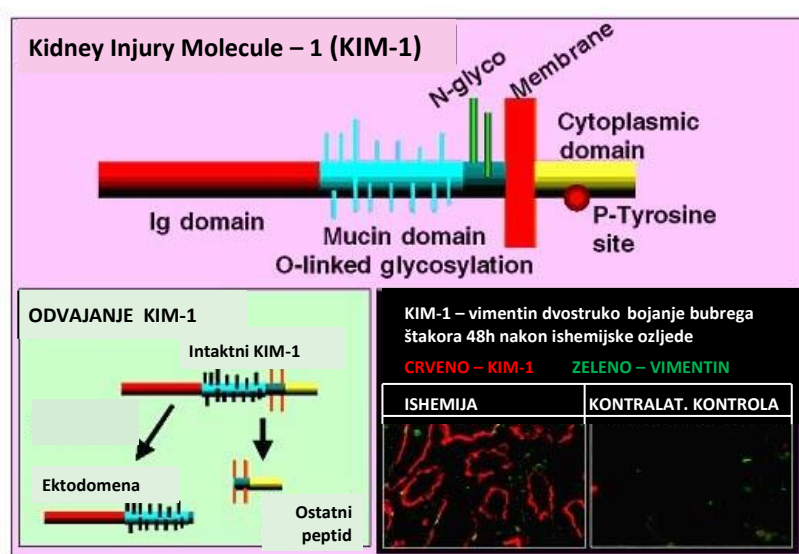
Proksimalni tubul često je primarno mjesto bubrežnoga oštećenja bilo toksičnoga, bilo ishemijskoga uzroka. Serumski kreatinin i ureja kao najčešće upotrebljavani klinički pokazatelji bubrežne funkcije pokazuju porast vrijednosti tek u uznapredovaloj fazi bubrežnoga oštećenja. Na njihove vrijednosti utječu brojni faktori kao npr. tjelesna masa, stupanj hidracije, komorbiditeti itd. zbog čega pokazuju značajne interindividualne i intraindividualne varijacije. Zbog svega navedenoga neprecizni su u ranoj detekciji bubrežnoga oštećenja, razlikovanju uzroka i sijela bubrežnoga oštećenja, kao i procjeni napredovanja bubrežne bolesti. Stoga su u zadnja dva desetljeća provedena brojna istraživanja s ciljem pronalaska osjetljivijeg i specifičnijeg biljega bubrežnoga oštećenja od dosadašnjih tradicionalnih biljega – ureje i kreatinina.

Nakon oštećenja proksimalnoga tubula u urinu se mogu detektirati različiti proteini i enzimi. Do njihove ekskrecije u urinu može doći na dva načina. Jedan je neadekvatna apsorpcija slobodno filtriranih proteina niske molekulske mase kao npr. cistatin C (Cys C), β 2 mikroglobulin, α -mikroglobulin, retinol-vezujući proteini, *clara cell protein* i dr. Drugi način je oštećenje epitelne stanice proksimalnoga tubula s posljedičnom pojavom proteina u urinu – npr. lizosomski enzimi (N-acetil- β -D-glukozaminidaza - NAG), enzimi četkaste prevlake (gama-glutamil transferaza, alkalna fosfataza, neutralna endopeptidaza) i citosolni proteini (npr. α -glutation-S-transferaza - α -GST). Proteini koji se pojavljuju u urinu mogu biti konstitutivni – proteini/enzimi koji su normalno prisutni u tubularnim epitelnim stanicama ili lumenu tubula nakon filtracije, ali se normalno ne izlučuju urinom u značajnim koncentracijama (α -GST, cistatin C) i inducibilni – proteini i enzimi koji se inače ne nalaze u tubularnim epitelnim stanicama i urinu, ali je njihovo stvaranje inducirano tubularnim oštećenjem (npr. *kidney injury molecule -1* - KIM-1).

Među proteinima koji su se ekstenzivno istraživali kao biljezi bubrežnoga, primarno akutnoga, oštećenja su *kidney injury molecule-1* (KIM-1), faktor rasta hepatocita (*hepatocyte growth factor* - HGF), *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), N-acetil- β -D-glukozaminidaza (NAG), α -glutation-S-transferaza (α -GST), π -glutation-S-transferaza (π -GST), cistatin C, interleukin 18, interferonom gama inducirani protein 10 (*interferon- γ -inducible protein-10* - IP-10) i dr. KIM-1 je visoko specifičan biljeg oštećenja proksimalnoga tubula, HGF je involviran u prevenciju fibroze nakon bubrežnog oštećenja, a IP-10 je biljeg intersticijske upale nakon bubrežnoga oštećenja. Navedena tri biljega bili su predmetom ovoga istraživanja s ciljem određivanja njihove moguće uloge u dijagnostici endemske nefropatije.

1.6.1. *Kidney injury molecule-1 (KIM-1)*

Kidney injury molecule - 1 (KIM-1) je transmembranski glikoprotein tip 1 koji se dominantno nalazi na apikalnoj membrani epitelnih stanica proksimalnoga tubula (89). Ekstracelularna komponenta sadrži domenu nalik imunoglobulinu i mucinsku domenu, dok je intracelularna komponenta vrlo kratka i sadrži mjesta za tirozin fosforilaciju. Normalno nije prisutan u epitelnim tubularnim stanicama, ali odmah nakon tubularnoga oštećenja dolazi do pojačane ekspresije KIM-1 gena te se vrlo brzo nakon oštećenja mogu detektirati KIM-1 mRNA i KIM-1 protein, i to više od bilo kojeg drugog proteina nakon akutnoga oštećenja (89) (slika 3).



Slika 3. *Kidney injury molecule-1*. Gore: struktura KIM-1. Dolje lijevo: ektodomena KIM-1 izlučuje se u urinu. Dolje desno: imunofluorescencija KIM-1 i vimentina u štakora 48h nakon ishemijske ozljede

Prema: Ichimura T, Mou S. *Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. J Chin Integr Med.* 2008; 6(5): 533-38.

KIM-1 je selektivno eksprimiran u dediferenciranim, regenerirajućim stanicama proksimalnoga tubula i ne nalazi se u drugim tkivima (89). Ektodomena KIM-1 proteina može se naći u urinu unutar 24 sata nakon oštećenja epitelnih stanica proksimalnoga tubula (90). KIM-1 je fosfatidil-serin receptor koji prepoznaje apoptotične stanice i usmjerava ih prema lizosomima te na taj način transformira tubularne epitelne stanice u poluprofesionalne fagocite (91). U akutnom oštećenju KIM-1 štiti bubreg facilitirajući proces unosa i razgradnje apoptotičnih stanica u preostalim epitelnim stanicama proksimalnih tubula te na taj način ograničava upalni odgovor (92). Na animalnim modelima KIM-1 se pokazao kao vrlo osjetljiv

i specifičan biljeg akutnoga bubrežnog oštećenja (93-95). Vaidya i sur. su analizom 17 multicentričnih pretkliničkih istraživanja na raznim animalnim modelima toksičnoga (cisplatina, gentamicin, vankomicin, takrolimus, ciklosporin A, tioacetamid) i ishemijskoga akutnog oštećenja bubrega pokazali da je KIM-1 značajno bolji prediktor i rani detektor akutnoga bubrežnog oštećenja u odnosu na tradicionalne biljege (ureja i kreatinin) (96). Također, nakon primjene hepatotoksina (bromotriklormetan) i kardiotoxina (izoproterenol) vrijednosti KIM-1 ostale su niske jer nije došlo do tubularnoga oštećenja, što ukazuje da je KIM-1 specifičan biljeg bubrežnoga oštećenja. I u brojnim kliničkim studijama KIM-1 se pokazao kao superioran biljeg akutnoga tubularnog bubrežnog oštećenja. U bolesnika nakon kardiokirurške operacije KIM-1 je dobar prediktor razvoja akutnoga bubrežnog zatajenja (97). Kao biljeg tubularnoga oštećenja, KIM-1 uz NAG pokazao se kao prognostički faktor neovisan o GFR u bolesnika s kongestivnim srčanim zatajenjem (98). U studiji koja je uspoređivala devet biljega bubrežnoga oštećenja (KIM-1, HGF, IP-10, NGAL, NAG, IL-18, VEGF, cistatin C, ukupni proteini) KIM-1 je bio najbolji prognostički čimbenik za bubrežno nadomjesno liječenje ili smrt (AUC-ROC 0.93) (99). KIM-1 je koristan i kao biljeg karcinoma bubrega što ne iznenađuje imajući na umu njegovu pojačanu ekspresiju u dediferenciranim stanicama proksimalnoga tubula (100). Ekspresija KIM-1 mRNA u bioptičkom materijalu transplantiranoga bubrega pozitivno korelira s padom bubrežne funkcije bubrežnog presatka u 40-mjesečnom praćenju (101).

Za razliku od adaptivne uloge u akutnom bubrežnom oštećenju, kontinuirana ekspresija KIM-1 u kroničnoj bubrežnoj bolesti je maladaptivna i vodi fibrozi i progresiji kronične bubrežne bolesti (92). Humphreys i sur. su na mišjem modelu i u staničnoj kulturi immortaliziranih stanica proksimalnoga tubula pokazali da trajna ekspresija KIM-1, čak i u odsutnosti tubularnoga oštećenja, dovodi do razvoja progresivne intersticijske upale s fibrozom te posljedično razvojem bubrežnoga zatajenja (102). Utvrdili su da trajna ekspresija KIM-1 korelira s vrijednostima proupalnog citokina MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*). Na animalnom modelu ishemijskoga oštećenja bubrega ekspresija KIM-1 gena bila je značajno povišena i u akutnoj i u kroničnoj fazi, i to značajno više od drugih gena što upućuje da bi KIM-1 mogao biti biljeg protražiranoga tubularnog oštećenja i progresije akutnoga u kronično bubrežno oštećenje (103). U istraživanju o subkroničnoj kadmijskoj nefrotoksičnosti povišene vrijednosti KIM-1 mogle su se detektirati znatno ranije od beta-2 mikroglobulina i metalotioneina, a vrijednosti su bile to više što je ekspozicijska doza bila veća (104). Wanders i suradnici registrirali su povišene vrijednosti KIM-1 u bolesnika s nedijabetičkom kroničnom

bubrežnom bolesti i proteinurijom (105). Smatra se da u ovih bolesnika povišena albuminurija uzrokuje tubularno oštećenje. U skladu s tom hipotezom, isti su autori uočili pad vrijednosti KIM-1 i proteinurije nakon liječenja ACE-inhibitorom i restrikcijom unosa kuhinjske soli. U bolesnika sa šećernom bolesti tip 1 i proteinurijom bazalne serumske vrijednosti KIM-1 pokazale su se kao snažan prediktor gubitka bubrežne funkcije i razvoja terminalne bubrežne bolesti u periodu praćenja 5-15 godina (106).

Prema dosadašnjim istraživanjima KIM-1 se jasno nametnuo kao biljeg toksičnoga akutnog bubrežnog oštećenja te su ga FDA i EMA uvrstile kao biljeg bubrežnoga oštećenja u pretkliničkim istraživanjima razvoja lijekova (92). Sve se više razjašnjava njegova uloga kao biljega, ali i potencijalnoga terapijskog mjesta djelovanja u kroničnim bubrežnim bolestima (107-112).

Ono što KIM-1 čini izvrsnim biljegom bubrežnoga oštećenja jest sljedeće: nije eksprimiran u zdravom tkivu bubrega, vrijednosti su značajno povišene brzo nakon tubularnoga oštećenja, perzistira u tubularnim stanicama do potpunog oporavka, ektodomena se nalazi otpuštena u urin te stabilnost u urinu na sobnoj temperaturi (113).

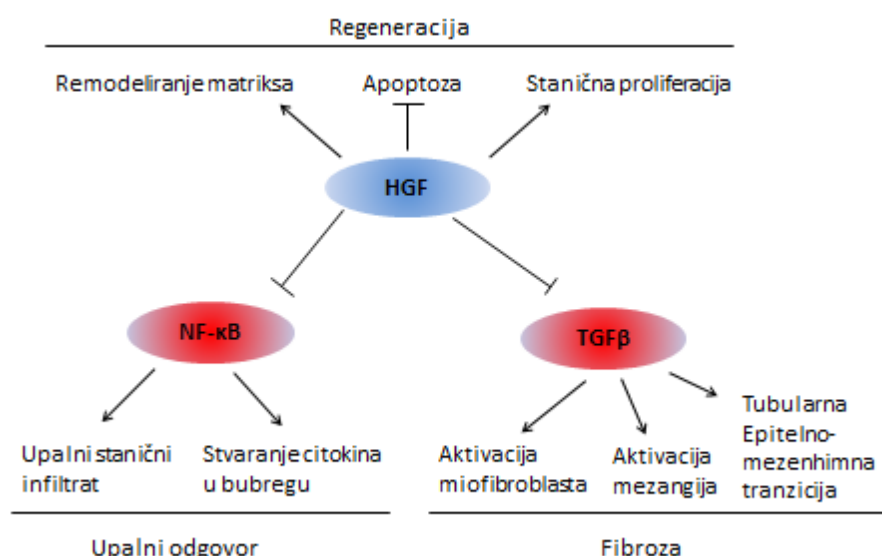
1.6.2. Faktor rasta hepatocita (HGF)

Faktor rasta hepatocita (*hepatocyte growth factor* –HGF) otkriven je kao protein s mitogenim svojstvima za diferencirane hepatocyte (114). To je heterodimer sastavljen od 69 kD velikog α -lanca i 34 kD velikog β -lanca. HGF se sintetizira u inaktivnom jednolančanom obliku i aktivira se nakon proteolize specifičnom serinskom proteazom u aktivni dvolančani oblik (115). HGF posjeduje mitogena, motogena, morfogenetska i antiapoptotička svojstva u raznim tkivima (116,117). Receptor za HGF otkriven 1991. godine je produkt c-met protoonkogen (118). HGF je eksprimiran u tkivima mezodermalnoga porijekla (119), dok je njegov receptor c-met eksprimiran u epitelnim stanicama uključujući jetru i bubrež (120). Steroidni hormoni, citokini (faktor nekroze tumora alfa (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) i faktora rasta fibroblasta (FGF)) reguliraju ekspresiju HGF i c-met (121,122). Na animalnom modelu utvrđen je djelomični inhibitorni učinak HGF-a na hepatocelularnu karcinogenezu induciranu transformirajućim faktorom rasta α (TGF- α) (123). Nadalje, HGF može oponirati inhibirajući učinak transformirajućega faktora rasta β (TGF- β) na stanični rast (124). HGF je potentni mitogen za hepatocyte te je važan u embrionalnom razvoju jetre (125). Fibroblasti s eksprimiranim HGF-om transplantirani u mišju slezenu

sprečavaju akutno jetreno oštećenje uzrokovano bakterijskim liposaharidima ili ugljikovim tetrakloridom (126).

Istraživanja na staničnim kulturama, animalnim modelima, kao i istraživanja bubrežnih bolesti u ljudi pokazala su da bi HGF mogao biti značajan faktor rasta i u bubregu. Tijekom embrionalnoga razvoja bubrega HGF je eksprimiran prvenstveno u mezenhimu, dok je c-met eksprimiran i u mokraćovodnom pupoljku (127). HGF stimulira epitelnu diferencijaciju mezenhimnih stanica metanefrosa (128). Na staničnim kulturama dokazano je da HGF proizveden u mezangijskim stanicama stimulira endotelni stanični rast, a taj učinak negativno moduliraju TGF- β i angiotenzin 2 (129). Autori smatraju da negativna regulacija lokalnoga renalnog HGF-a posredovana TGF- β i angiotenzinom 2 može imati značajnu ulogu u patogenezi bubrežnih bolesti. Igawa i suradnici pokazali su kako su mitogeni učinci HGF-a u epitelnim stanicama bubrežnih tubula regulirani međustaničnom interakcijom (130). U tom istraživanju sinteza DNA potaknuta HGF-om bila je povećana na mjestima male stanične gustoće, dok je na mjestima velike stanične gustoće bila suprimirana. Prema ovim rezultatima HGF bi mogao djelovati kao regulator bubrežne regeneracije (slika 4). U eksperimentalnom modelu akutnoga bubrežnog oštećenja sinteza HGF mRNA je bila povećana u bubregu i jetri, dok je sinteza c-met m-RNA bila selektivno povećana na mjestu najjačega tubularnoga oštećenja ili hipertrofije (131). Kawaida i suradnici uočili su povišenu razinu HGF i HGF mRNA u bubregu miša nakon ishemijskoga oštećenja ili nefrotoksičnog učinka živinog klorida, a povišene razine perzistirale su tijekom cijelog perioda regeneracije bubrežnih tubula (132). Nadalje, ekspresija c-met u bubregu miša raste nakon ishemije, unilateralne nefrektomije i oštećenja folnom kiselinom (133). Na mišjem modelu kronične bubrežne bolesti (glomerulonefritis posredovan imunim kompleksima) Liu i suradnici istraživali su bi li HGF mogao inhibirati tubulointersticijsku fibrozu (134). Prema njihovim rezultatima, nakon injekcije HGF-a došlo je do više od četverostrukog porasta sinteze DNA u tubularnim epitelnim stanicama u odnosu na miševe kojima nije bio injiciran HGF. Nadalje, HGF je suprimirao ekspresiju TGF- β i faktora rasta porijekla trombocita (PDGF), kao i proliferaciju miofibroblasta u oštećenom bubregu. Posljedično tomu, u navedenom je istraživanju HGF inhibirao početak tubulointersticijske fibroze i usporio progresiju glomeruloskleroze. U akutnome bubrežnom oštećenju povišene vrijednosti HGF u urinu u skladu su s njegovom ulogom u stimulaciji proliferacije tubularnih epitelnih stanica (135). S druge strane, u kroničnim glomerularnim bolestima, policističnoj bolesti bubrega, kao i u uznapredovaloj fazi kroničnog bubrežnog zatajenja u urinu je prisutan HGF, ali u niskim koncentracijama

(135,136). Na temelju rezultata navedenih, kao i brojnih drugih, istraživanja Vargas u svom preglednom članku zaključuje da HGF u akutnome bubrežnom oštećenju stimulira regenerativne procese, dok bi u kroničnoj bubrežnoj bolesti mogao biti vezan uz histološke promjene koje vode do bubrežne insuficijencije (137).



Slika 4. Protuupalno, antifibrotičko i proregenerativno djelovanje HGF u kroničnim bubrežnim bolestima

HGF – faktor rasta hepatocita; NF-κB – nuklearni faktor κB; TGF-β – transformirajući faktor rasta β.

Prilagođeno prema Liu Y, Yang J. Hepatocyte growth factor: New arsenal in the fights against renal fibrosis? Kidney Int. 2006; 70: 238–240.

1.6.3. Interferonom gama induciran protein 10 (IP-10/CXCL10)

Ovisno o poziciji cisteinskih ostataka na N-terminalnom kraju, citokini se dijele u 4 skupine – C, CC, CXC i CX3C kemokine koji privlače različite podtipove leukocita na mjesto inflamacije (138). Nakon stimulacije proinflamatornim citokinima dolazi do ekspresije kemokina u različitim tipovima bubrežnih stanica – tubularnim epitelnim, intersticijskim, endotelnim i mezangijskim stanicama (139). U različitim bubrežnim bolestima kemokini imaju vodeću ulogu u privlačenju cirkulirajućih leukocita na mjesto inflamacije (139). Ključna uloga kemokina u upalnim bubrežnim procesima potvrđena je u istraživanjima u kojima je blokiran učinak kemokina neutralizirajućim protutijelima, antagonistima njihovih receptora, ili disrupcijom gena ciljnog kemokina (139-141).

Interferonom gama induciran protein od 10 kD (IP-10/CXCL10) član je obitelji CXC kemokina i ekspiriran je u različitim tipovima stanica (142). Njegov receptor CXCR

ekspirimiran je dominantno na Th1 stanicama, stoga IP-10 djeluje kemotaktično na Th1 stanice. IP-10 utječe na ekspresiju adhezijskih molekula te može inhibirati staničnu proliferaciju i angiogenezu (143). IP-10 secerniraju aktivirane inflamatorne stanice, renalne tubularne stanice i mezangijske stanice, a kod akutnoga odbacivanja bubrežnoga presatka posreduju nakupljanje leukocita i Th1 upalni odgovor (144,145). Urinarni IP-10 korelira sa supkliničkim i kliničkim tubulitisom na protokolarnim i indiciranim biopsijama bubrežnog presatka (146). Na mišjem modelu akutnoga ishemijsko/reperfuzijskog oštećenja bubrega detektirana je povišena razina IP-10 mRNA u tkivu bubrega (147). U istraživanju Vaidye i suradnika devet biljega tubularnoga oštećenja, među kojima je i IP-10, izlučivali su se urinom u značajno većim koncentracijama u bolesnika s akutnim bubrežnim oštećenjem (uzrokovanom različitim uzrocima poput ishemije, sepse, izloženosti nefrotoksinima, iv kontrastu i dr.) u odnosu na zdrave bolesnike, kao i hospitalizirane bolesnike bez elemenata akutnoga bubrežnog oštećenja (99). Povećana ekspresija IP-10 u tubulointersticiju te povišena razina urinarnoga IP-10 utvrđene su i u bolesnika s dijabetičkom nefropatijom (148). Nadalje, povećana ekspresija IP-10 u tubulointersticiju dokazana je na animalnom modelu tubulointersticijskog nefritisa (149) te opstruktivne nefropatije (150). IP-10 i njegov receptor CXCR3 ekspimirani su u glomerularnim viscelarnim epitelnim stanicama (151). Na mišjem modelu oštećenja endotela bubrega Panzer i sur. pokazali su pojačanu ekspresiju IP-10 mRNA selektivno u endotelnim stanicama tubulointersticija što je bilo praćeno infiltracijom T limfocita, dok je navedena ekspresija izostala u glomerularnim endotelnim stanicama (152).

Kako je apoptoza glavni mehanizam stanične smrti u AAN, a intersticijska je upalna infiltracija odgovorna za prijelaz iz akutnoga u kronično bubrežno zatajenje (78), IP-10 mogao bi se naći u povišenim koncentracijama u urinu bolesnika oboljelih od endemske nefropatije.

Iako novi biljezi bubrežne bolesti mnogo obećavaju, većina je istraživanja provedena na relativno malom broju ispitanika i najčešće vezano za akutno bubrežno oštećenje. Prije nego bilo koji od tih biljega uđe u rutinsku kliničku praksu potrebna je potvrda dosadašnjih rezultata u brojčano većim istraživanjima, kao i njihova uloga u kroničnim bubrežnim bolestima. S obzirom na niz još nerazjašnjenih pitanja u endemskoj nefropatiji ovi bi biljezi mogli biti od kliničke koristi. Ukoliko su povišeni u ispitanika iz endemskoga kraja mogli bi imati značenje u dijagnostičkom algoritmu. Ukoliko nema razlike prema neendemskim ispitanicima, to bi bio još jedan od pokazatelja inaktivnosti žarišta te očekivanoga iščezavanja endemske nefropatije u godinama koje slijede.

2. HIPOTEZA

Hipoteze ovoga istraživanja su:

- Akutno tubularno oštećenje određeno novim biljezima bubrežnoga oštećenja (KIM-1, HGF i IP-10) zbog smanjene izloženosti okolišnom toksinu tj. aristolohičnoj kiselini više nije prisutno u „Bolesnih i sumnjivih“ od endemske nefropatije.
- Nema razlika u navedenim biljezima između „Bolesnih i sumnjivih“, „Rizičnih“ te „Ostalih“, kao niti između ispitanika iz endemskih sela i kontrolnoga neendemskog sela.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja

- Utvrditi dijagnostičku ulogu novih biljega tubularnoga oštećenja (KIM-1, HGF i IP-10) usporedbom vrijednosti između ispitanika iz endemskoga i neendemskoga područja, a potom i između pojedinih podskupina ispitanika unutar EN kraja – „Bolesnih i sumnjivih“, „Rizičnih“ i „Ostalih“. Novi biljezi bubrežnoga tubularnog oštećenja usporedit će se s dosadašnjim biljegom bubrežnoga oštećenja alfa1-mikroglobulinom.
- Usporediti vrijednosti navedenih biljega između starosjedilačkog stanovništva i stanovništva koje u endemskom kraju živi kraće od 20 godina.
- Utvrditi aktivnost žarišta u endemskom kraju, tj. ocijeniti može li se očekivati pad prevalencije bolesti.
- Utvrditi prognostičku vrijednost pojedinog biljega za progresiju bubrežnoga oštećenja i klinički tijek nakon perioda praćenja od sedam godina.

4. ISPITANICI I METODE

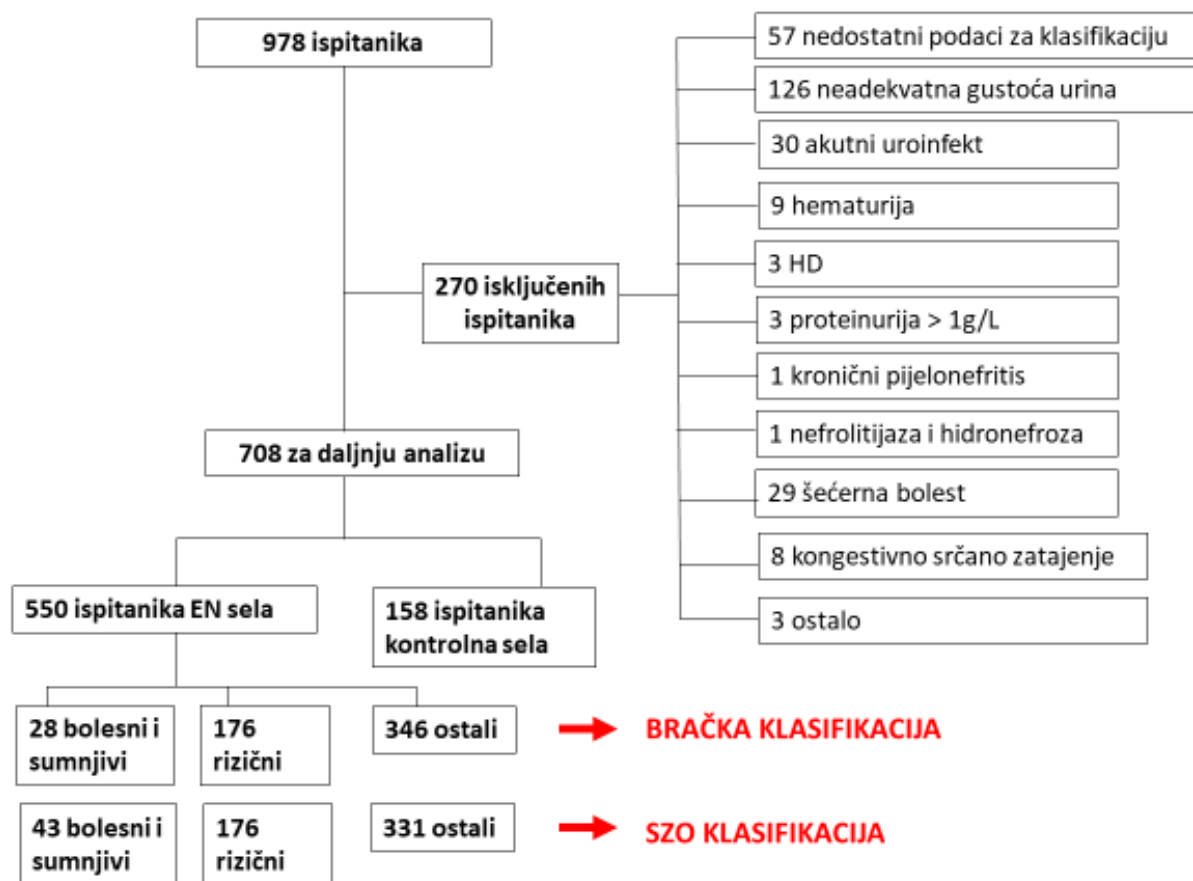
4.1. Ispitanici

4.1.1. Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula i endemska nefropatija

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkoga projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta "Endemska nefropatija u Hrvatskoj, epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza" (108-0000000-0329, voditelj projekta prof. dr. sc. B. Jelaković) te projekta Hrvatske zaklade za znanost "Molekularno profiliranje i proteomika karcinoma urotela" (br. 04/38, voditelj projekta prof.dr.sc. B. Jelaković). U sklopu projekata organizirana su velika epidemiološka istraživanja sela zahvaćenih endemskom nefropatijom tzv. perlustracije u suradnji s Hrvatskim zavodom za javno zdravstvo, Zavodom za javno zdravstvo Brodsko-posavske županije i Općom bolnicom „Dr. Josip Benčević“ Slavonski Brod, a prema Planu i programu mjera Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske uz odobrenje nadležnih etičkih povjerenstava.

Perlustracija, tijekom koje je učinjeno i ovo istraživanje, provedena je 2008. godine u tri endemska sela (Slavonski Kobaš, Živike i Pričac) te dva kontrolna sela (Klakar i Donja Bebrina). U istraživanje je uključeno 978 punoljetnih stanovnika navedenih sela. U sklopu istraživanja proveden je opsežan upitnik od strane medicinskog osoblja koji je sadržavao podatke iz osobne, obiteljske i epidemiološke anamneze, podatke o duljini boravka u selu, o prehrambenim navikama ispitanika, izloženosti potencijalnim drugim nefrotoksinima te o poljoprivrednim procesima obrade zemlje, žetve i pripreme brašna, te konzumacije kruha. Sva pitanja odnosila su se na sadašnje vrijeme i na vrijeme 20-30 godina u prošlosti. Svi ispitanici su klinički pregledani te im je izmjerena tjelesna visina i tjelesna masa. Arterijski tlak (AT) mjereno je tri puta Omronovim tlakomjerom (Omron M3) s odgovarajućom orukvicom u sjedećem položaju nakon pet minuta mirovanja prema preporukama Europskoga društva za hipertenziju (153). Ispitanicima je uzet uzorak krvi natašte te uzorak prvoga i drugoga jutarnjeg urina.

Od navedenih 978 ispitanika, u daljnju analizu uključeno je 708 ispitanika. Izuzeto je 270 ispitanika zbog razloga prikazanih na slici 5.



Slika 5. Dijagram uključenih ispitanika

Ispitanici iz endemskih sela klasificirani su prema modificiranoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije i prema novoj tzv. „Bračkoj” klasifikaciji.

Prema modificiranoj SZO klasifikaciji (17) bolesnici su raspodijeljeni prema sljedećim kriterijima:

- 1) pozitivna obiteljska anamneza,
- 2) tubularna proteinurija (omjer $\alpha 1$ mikroglobulin/kreatinin u mokraći) > 14 mg/g
- 3) anemija (hemoglobin < 120 g/L u muškaraca, hemoglobin < 113 g/L u žena)
- 4) eGFR CKD EPI < 60 ml/min/1,73m²

u skupine kako slijedi:

„Bolesni“ – 1+2+3+4, ili 1+2+3 ili 2+3+4

„Sumnjivi“ – 1+2, ili 2+3

„Rizični“ – 1

„Ostali“ – stanovnici endemskih sela koji ne zadovoljavaju nijedan gore navedeni kriterij.

Prema novoj „Bračkoj” klasifikaciji bolesnici su raspodijeljeni prema sljedećim kriterijima (tbl. 1):

1. boravak u EN selu / EN kućanstvu > 20 godina (2008. godine nije uziman podatak o boravku u EN kućanstvu jer tada je bila aktualna SZO klasifikacija; boravak u EN kućanstvu definiran je u ovom istraživanju boravkom u EN selu >20 godina + pozitivna obiteljska anamneza)
2. tubularna proteinurija ($\alpha 1\text{MCR} > 31,5 \text{ mg/g} + \alpha 1\text{M/UAE} > 0,91$)
3. anemija ($\text{Hb} < 120 \text{ g/L}$ muškarci i žene starije od 50 godina; $\text{Hb} < 110 \text{ g/L}$ žene mlađe od 50 godina)
4. $\text{eGFR CKD EPI} < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$
5. Karcinom prijelaznog epitela

u skupine kako slijedi:

„Bolesni“ – 1 (kućanstvo)+2+3+4, ili 1(selo)+2+5

„Sumnjivi“ – 1 (kućanstvo)+2 ili 1 (kućanstvo)+3+4 ili 1(selo)+5

„Rizični“ – 1

„Ostali“ – stanovnici endemskih sela koji ne zadovoljavaju nijedan gore navedeni kriterij.

Posebnu skupinu činili su ispitanici iz neendemskih sela.

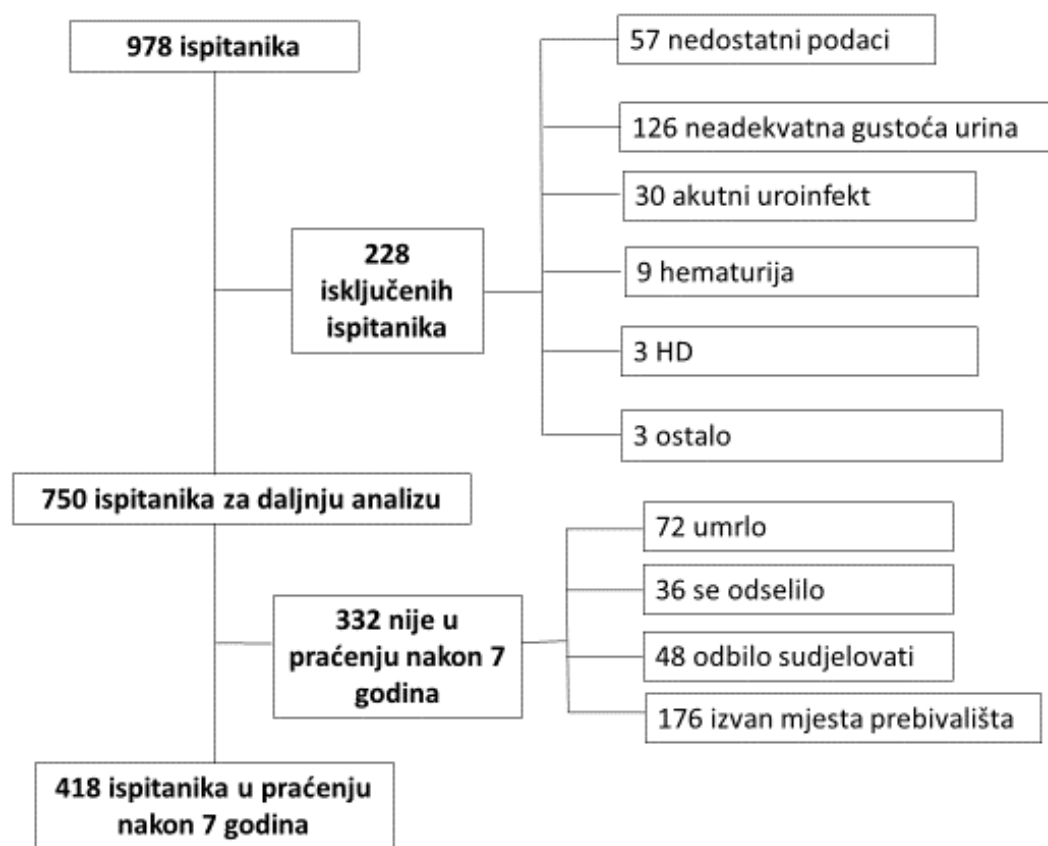
S obzirom da su prema „Bračkoj” klasifikaciji kriteriji stroži, tako je i broj „Bolesnih” od endemske nefropatije značajno manji nego prema ranijim klasifikacijama te ih je u ovom uzorku prema „Bračkoj” klasifikaciji bilo svega troje. Kako se „Sumnjivi” da boluju od endemske nefropatije mogu smatrati predstadijem bolesti odnosno ranom fazom endemske nefropatije, u ovom istraživanju objedinili smo „Bolesne” i „Sumnjive” u jednu skupinu „Bolesni i sumnjivi”, kao što smo već ranije radili mi, ali i drugi autori (154,155).

4.1.2. Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula i pogoršanje bubrežne funkcije

Jedan od ciljeva ovoga istraživanja bio je i odrediti kolika je prediktivna vrijednost novih biljega tubularnoga oštećenja za razvoj kronične bubrežne bolesti odnosno za pogoršanje bubrežne funkcije.

Budući da smo u ovom dijelu istraživanja željeli odrediti utjecaj novih tubularnih biljega na pogoršanje bubrežne funkcije u općoj populaciji u ovu analizu smo uključili i

bolesnike sa šećernom bolesti i drugim bubrežnim bolestima koje smo u ranijim analizama bili isključili. Iz analize su i ovaj put izuzeti bolesnici s mogućim akutnim uzrocima oštećene bubrežne funkcije poput uroinfekta te ispitanici s nepotpunim podacima. Od početno uključenih 978 ispitanika isključeno je 228 ispitanika zbog razloga prikazanih na slici 6, 72 ispitanika su umrla, a 260 ispitanika nije bilo dostupno (36 se odselilo, 48 odbilo sudjelovati, 176 je aktualno bilo izvan mjesta prebivališta ili opetovano nije zatečeno na adresi). Na taj smo način došli do ukupnog broja od 418 ispitanika koji su se odazvali kontrolnom pregledu što uz 72 umrla čini 65.3% (slika 6).



Slika 6. Dijagram uključenih ispitanika u sedmogodišnjem praćenju

Cilj ovoga prospektivnog dijela istraživanja bio je odrediti mogu li bazalne vrijednosti tubularnih biljega biti pouzdan prediktivni biljeg novonastale kronične bubrežne bolesti odnosno biljeg pogoršanja bubrežne funkcije većeg od očekivanog u sedmogodišnjem periodu. Novonastala kronična bubrežna bolest definirana je padom $\text{eGFR} < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ u ispitanika u kojih je 2008. godine bila iznad $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Pogoršanje bubrežne funkcije veće od fiziološkoga starenja definirano je kao pad $\text{eGFR} > 2 \text{ ml/min/1,73m}^2$ godišnje odnosno pad $\text{eGFR} > 14 \text{ ml/min/1,73m}^2$ u sedmogodišnjem periodu. Kao mjeru pogoršanja bubrežne

funkcije uzeli smo pad eGFR dvostruko veći od fiziološki očekivanoga (1 ml/min/1.73m^2 godišnje). Na ovaj način uzimajući “stroži” kriterij nastojali smo umanjiti utjecaj intraindividualnih varijacija u vrijednostima serumskoga kreatinina koje bi uz fiziološki pad glomerularne filtracije mogle dovesti do pada $\text{eGFR} > 7 \text{ ml/min/1.73m}^2$ u sedmogodišnjem periodu.

Kronična bubrežna bolest je klasificirana prema KDIGO smjernicama iz 2012. godine (88).

4.2. Metode

Glavnina laboratorijskih analiza učinjena je u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Određivanje biljega oštećenja proksimalnoga tubula učinjeno je u Zavodu za nefrologiju Brigham and Women's Hospital u Bostonu, SAD u suradnji s profesorom Joseph V. Bonvetre.

Istraživanje je provedeno na sljedeći način: prvi dan ispitanicima su bile podijeljene bočice za prvi jutarnji urin, drugi dan su liječnici, medicinske sestre i tehničari u EN selu, nakon potpisane suglasnosti od strane ispitanika, uzeli anamnezu (opsežan upitnik) i učinili klinički pregled ispitanika kojima je nakon toga izvađena krv natašte i uzet uzorak drugoga jutarnjeg urina. 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). Preuzet je uzorak prvoga jutarnjeg urina. Uzorci drugoga jutarnjeg urina za određivanje biljega oštećenja proksimalnoga tubula (KIM-1, HGF, IP-10) centrifugirani su unutar 2 sata od prikupljanja te su odmah nakon toga bili pohranjeni u suhom ledu. Uzorci krvi i urina su isti dan transportirani u Zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb gdje je učinjena laboratorijska obrada. Uzorci urina za određivanje biljega oštećenja proksimalnoga tubula (KIM-1, HGF, IP-10) bili su pohranjeni u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb u zamrzivaču na -80°C do slanja u Boston, SAD. Transport u SAD proveden je odgovarajućim kurirskim službama uz osiguranje optimalnih uvjeta slanja uzoraka koji su se nalazili u suhom ledu u stiropornim kutijama te su na odredište stigli u adekvatnom stanju.

Kompletna krvna slika je određena prema načelu laserske tehnologije rasipanja svjetlosti (uređaj Sysmex XE 5000), a iz centrifugirane krvi (10 minuta na 3500 okretaja na sobnoj temperaturi) serumski kreatinin „kontinuiranom“ fotometrijom s alkalnim pikratom – nekompenzirana Jaffeova metoda (uređaj Olympus AU 2700 analizator, reagens Beckman-Coulter), glukoza u serumu UV fotometrijom s heksokinazom (uređaj Olympus AU 2700

analizator), trigliceridi fotometrijom s glicerolfosfat-oksidazom (GPOPAP), ukupni kolesterol fotometrijom s kolesterol-oksidazom (CHOD-PAP), HDL-kolesterol homogenom enzimo-imunoinhibicijskom metodom te LDL-kolesterol homogenom metodom s CHE i CHO (uređaj Olympus AU 2700 analizator).

Iz uzorka drugoga jutarnjeg urina učinjena je kvalitativna analiza urina (glukoza, proteini, bilirubin, urobilinogen, pH, relativna volumna masa, krv, ketoni, nitriti, leukociti) test trakom (test traka Aution Stick 10EA, uređaj Arkray Aution Max AX 4280), kreatinin u urinu „kontinuiranom“ fotometrijom s alkalnim pikratom (uređaj Olympus AU 2700 analizator, reagens Beckman-Coulter), te lateks-imunonefelometrijski alfa1-mikroglobulin i albumin u urinu (uređaj Behring Nephelometer Analyzer II). Iz supernatanta drugoga jutarnjeg urina (centrifugiranje 10 minuta na 1500 okretaja pri sobnoj temperaturi) su određeni biljezi oštećenja proksimalnog tubula (KIM-1, HGF i IP-10). Imunotest temeljen na tehnologiji mikročesticama (*micro bead-based assay*) za određivanje KIM-1 razvijen je 2008. godine u studiji Vaidye i suradnika (99), dok su navedene analize za HGF i IP-10 učinjene uz pomoć komercijalno dostupnih testova (*Bio-Rad Laboratories*) u Brigham and Women's Hospital u Bostonu, SAD (99). Biljezi tubularnoga oštećenja KIM-1, HGF i IP-10 standardizirani su prema vrijednostima kreatinina u mokraći i izraženi kao njihov omjer u mjernoj jedinici ng/g kreatinina.

Procijenjena glomerularna filtracija određena je pomoću 2009 CKD-EPI jednadžbe (156). Budući da je CKD-EPI jednadžba evaluirana prema koncentraciji kreatinina u serumu izmjerenog kompenziranom Jafféovom metodom, prije uvrštavanja u jednadžbu vrijednosti su kreatinina u serumu svih ispitanika korigirane koristeći jednadžbu linearne regresije: $y = 0,95x + 0,44$ (y = kompenzirana Jafféova metoda; x = nekompenzirana Jafféova metoda) (157)

4.3. Statistička analiza

Kategorijski podatci predstavljeni se apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su srednjom vrijednosti (aritmetičkom sredinom) i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele, a u ostalim slučajevima središnjom vrijednosti (medijanom) i granicama interkvartilnog raspona, dob ispitanika prikazana je medijanom te najmanjom i najvećom vrijednosti. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-

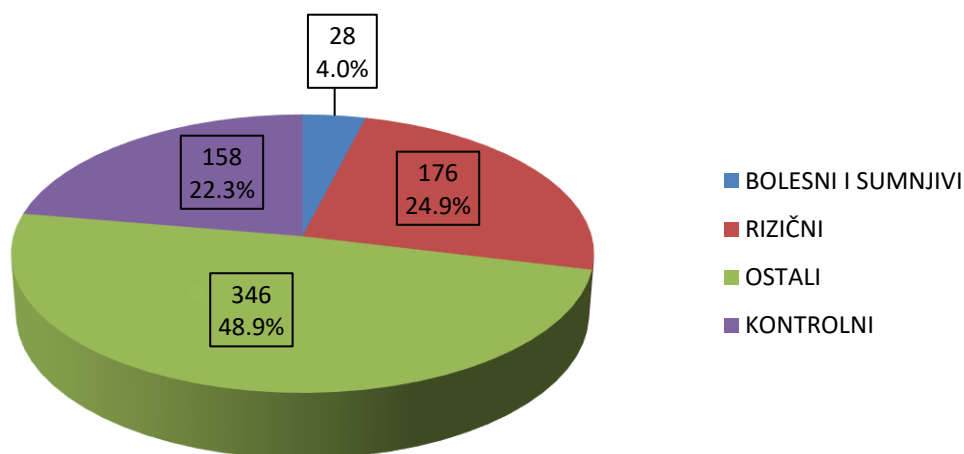
Whitneyevim U testom, u slučajevima ispitivanja razlike između više od dvije skupine korišten je Kruskal-Wallisov test (post hoc Mann-Whitney), odnosno jednofaktorska analiza varijanci s prilagodbom podataka. Razlike kategorijskih varijabli testirane su chi-kvadrat testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije r , a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ). ROC analizom ispitana je dijagnostička sposobnost pojedinih biljega za nastanak bubrežne bolesti. Metodom logističke regresije analiziran je utjecaj pojedinih biljega i njihovih kombinacija na razvoj nonastale kronične bubrežne bolesti odnosno pogoršanja bubrežne funkcije. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Podatci su analizirani statističkim postupcima pomoću programa MedCalc Statistical Software version 13.1.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija; <http://www.medcalc.org>; 2014).

5. RESULTATI

5.1. Rezultati za ispitanike endemskih i kontrolnih sela te za endemske podskupine klasificirane prema „Bračkoj“ klasifikaciji

U istraživanju provedenom na ispitivanoj populaciji obrađeni su podatci 708 ispitanika od čega je 550 ispitanika (77,7%) bilo iz endemskih sela, a 158 ispitanika (22,3%) iz kontrolnih sela.

Prema kriterijima nove „Bračke“ klasifikacije endemske nefropatije te objedinjavanjem „Bolesnih i sumnjivih“ ispitanika u jednu skupinu navedena podskupina imala je 28 ispitanika (3 „Bolesna“ i 25 „Sumnjivih“), „Rizičnih“ ispitanika bilo je 176, a „Ostalih“ 346 (slika 7). Slijedi prikaz rezultata za ispitanike podijeljene u dvije skupine: endemska i kontrolna sela te za podskupine klasificirane prema „Bračkoj“ klasifikaciji.



Slika 7. Udio kontrolnih ispitanika i endemskih ispitanika klasificiranih prema „Bračkoj“ klasifikaciji

5.1.1. Demografski podatci

U tablici 3 prikazani su demografski podatci ispitanika iz endemskih i kontrolnih sela. Isti podatci za ispitanike po podskupinama prikazani su u tablici 4. Nije bilo statistički značajne razlike između ispitanika s obzirom na spol niti između skupina, niti između endemskih podskupina. Analizom dobi ispitanika endemskih i kontrolnih sela dobivena je statistički značajna, ali klinički zanemariva razlika u starosti ispitanika. Nešto stariji su bili ispitanici u neendemskim selima (53 nasuprot 50 godina; $P < 0,001$). No analizirajući dob po podskupinama, značajno su stariji bili ispitanici u podskupini „Bolesni i sumnjivi“ čija je dob iznosila 76 godina. Nije utvrđena razlika u dobi između „Ostalih“ i „Rizičnih“. S druge strane, kontrolni ispitanici bili su nešto stariji od „Ostalih“ i „Rizičnih“ ispitanika.

Nije bilo razlike u duljini boravka u selima između endemskih i neendemskih ispitanika. Očekivano, najdulje su u endemskom selu boravili „Bolesni i sumnjivi“ prosječno 73 godine, značajno dulje od „Rizičnih“ i „Ostalih“ te kontrolnih ispitanika. „Ostali“ ispitanici najkraće su boravili u endemskom selu i to značajno kraće od ostale tri ispitivane skupine.

Pozitivnu obiteljsku anamnezu za endemsku nefropatiju imalo je 208 odnosno 37,8% ispitanika iz endemskih sela što je značajno više od svega 2 ispitanika s pozitivnom obiteljskom anamnezom u kontrolnim selima. U endemskim podskupinama klasificiranim prema „Bračkoj“ klasifikaciji 50% „Bolesnih i sumnjivih“ imalo je pozitivnu obiteljsku anamnezu, 100% „Rizičnih“ te 5,2% „Ostalih“ ispitanika.

Nije zapažena razlika u pušačkom statusu između ispitanika endemskih i kontrolnih sela, kao niti između ispitanika u endemskim podskupinama.

Iako nije bilo statistički značajno, a kliničko-epidemiološki je relevantno, devet ispitanika iz endemskih sela imalo je karcinom prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava, dok u kontrolnoj skupini niti jedan ispitanik nije imao karcinom. Gledano po podskupinama svih tih 9 ispitanika pripadalo je skupini „Bolesni i sumnjivi“ te činilo 32% ispitanika navedene skupine što je bilo statistički značajno više u odnosu na preostale tri skupine u kojima niti jedan ispitanik nije imao karcinom prijelaznoga epitela. Taj postotak je u skladu s približno tolikom učestalosti karcinoma prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava u bolesnika s nefropatijom aristolohične kiseline.

Tablica 3. Demografski podatci ispitanika iz endemskih i kontrolnih sela

ISPITIVANA VARIJABLA	ENDEMSKA SELA	KONTROLNA SELA	STATISTIKA
UDIO ISPITANIKA n (%)	550 (77,7)	158 (22,3)	
SPOL M/Ž n (%)	239/311 (43,5/56,5)	66/92 (41,8/58,2)	$\chi^2=0,142$ P=0,707
DOB godine C (min-maks)	50 (19-87)	53 (19-93)	U=-2,104 P=0,035
BORAVAK U SELU godine C (25P-75P)	44 (25-58)	47 (25-62)	U =-0,873 P=0,383
POZITIVNA OBITELJSKA ANAMNEZA n (%)	208 (37,8)	2 (1,3)	$\chi^2=78,602$ P<0,001
PUŠAČ n (%)	22 (18,8)	109 (26,0)	P= 0,116
KARCINOM PRIJELAZNOG EPITELA n (%)	9 (1,6)	0 (0)	$\chi^2=2,619$ P=0,106

χ^2 – chi kvadrat test; U – vrijednosti Mann-Whitneyevog testa; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila;
P – statistička vjerojatnost

Tablica 4. Demografski podatci ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema „Bračkoj“ klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI C (25P-75P)	^B RIZIČNI C(25P-75P)	^C OSTALI C(25P-75P)	^D KONTROLNA SELA C (25P-75P)	STATISTIKA	POST HOC TEST
UDIO ISPITANIKA n (%)	28 (4)	176 (24,9)	346 (48,9)	158 (22,3)		
SPOL M/Ž n (%)	10/18 (35,7/64,2)	84/92 (47,7/52,3)	145/201 (41,9/58,1)	66/92 (41,8/58,2)	$\chi^2=2,474$ P=0,480	
DOB godine C (min-maks)	76 (46-85)	50 (20-86)	47 (19-87)	53 (19-93)	H=54,315 P <0,001	¹ A:B – Z = -6,991; P < 0,001 A:C – Z = -6,677; P < 0,001 A:D – Z = -5,646; P < 0,001 B:C – Z = -0,684; P = 0,494 B:D – Z = -2,238; P = 0,025 C:D – Z = -2,820; P = 0,005
BORAVAK U SELU godine C (25P-75P)	73 (64-79)	49 (37-57)	37 (19-53)	47 (25-62)	H=67,902 P <0,001	¹ A:B – Z = -5,850 ; P <0,001 A:C – Z = -6,479; P <0,001 A:D – Z = -5,294; P <0,001 B:C – Z = -5,420; P <0,001 . B:D – Z = -1,407; P = 0,159 C:D – Z = -3,041; P < 0,001
POZITIVNA OBITELJSKA ANAMNEZA n (%)	14 (50)	176 (100)	18 (5.2)	2 (1,0)	$\chi^2=583,196$ P <0,001	² A: $\chi^2 = 4,930$; P = 0,026 B: $\chi^2 = 550,888$; P < 0,001 C: $\chi^2 = 191,799$; P < 0,001 D: $\chi^2 = 76,496$; P < 0,001
PUŠAČ n (%)	4 (14,3)	31 (17,6)	74 (21,4)	22 (13,9)	$\chi^2=5,270$ P= 0,153	
KARCINOM PRIJELAZNOG EPITELA n (%)	9 (32,14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	$\chi^2=228,386$ P <0,001	² A: $\chi^2 = 197,452$; P <0,001 B: $\chi^2 = 6,845$; P = 0,009 C: $\chi^2 = 1,821$; P = 0,177 D: $\chi^2 = 1,477$; P = 0,224

χ^2 – chi kvadrat test; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; H – vrijednost Kruskal – Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost
¹post hoc Mann Whitney test; ²post hoc χ^2 test

5.1.2. Kliničke osobitosti ispitanika

Nije bilo razlike u vrijednostima sistoličkoga arterijskog tlaka, srčanoj frekvenciji i indeksu tjelesne mase između ispitanika iz endemskih i kontrolnih sela. Nešto više vrijednosti dijastoličkoga arterijskog tlaka imali su ispitanici iz endemskih sela (87 mmHg nasuprot 83 mmHg; $P = 0,006$). Ispitanici iz neendemskih sela imali su veći opseg struka (tablica 5).

Tablica 5. Srednje vrijednosti arterijskih tlakova i antropometrijskih mjera ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	ENDEMSKA SELA C (25P-75P)	KONTROLNA SELA C (25P-75P)	U	P
SISTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK (mmHg)	144 (130-160)	143 (130-168)	-0,294	0,769
DIJASTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK (mmHg)	87 (80-95)	83 (76-92)	-2,734	0,006
SRČANA FREKVENCIJA (otkucaj/min)	75,5 (68,5-84,5)	74,5 (68,5-82,0)	-0,473	0,636
INDEKS TJELESNE MASE (kg/m ²)	26,77 (23,74-30,61)	27,43 (23,88-31,57)	-0,577	0,564
OPSEG STRUKA (cm)	95 (86-104)	99 (88-108)	-2,627	0,009

C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; U – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička vjerojatnost

S druge strane, analizirajući vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka u endemskim podskupinama, statistički značajno više vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na preostale tri skupine, dok između ostalih skupina nije bilo značajne razlike (tablica 6). Analizirajući vrijednosti dijastoličkoga arterijskog tlaka u endemskim podskupinama nema statistički značajne razlike unutar populacije endemskih sela. Razlika postoji između „Bolesnih i sumnjivih“ odnosno „Rizičnih“ prema kontrolnim ispitanicima (tablica 6)

Nije utvrđena statistički značajna razlika u srčanoj frekvenciji između „Bolesnih i sumnjivih“, „Rizičnih“ i „Ostalih“, kao niti prema kontrolnim ispitanicima (tablica 6).

Što se tiče indeksa tjelesne mase jedina statistički značajna razlika uočena je između „Rizičnih“ i „Ostalih“ ispitanika gdje „Rizični“ imaju nešto veći indeks tjelesne mase (tablica 6).

Najmanji opseg struka imali su ispitanici iz podskupine „Ostali“ (93 cm) što je bilo statistički značajno manje u odnosu na sve preostale skupine među kojima nije bilo značajne razlike (tablica 6).

Tablica 6. Srednje vrijednosti arterijskih tlakova i antropometrijskih mjera ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema „Bračkoj“ klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI C (25P-75P)	^B RIZIČNI C (25P-75P)	^C OSTALI C (25P-75P)	^D KONTROLNA SELA C (25P-75P)	STATISTIKA	Post hoc Mann Whitney
SISTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK (mmHg)	163 (140-182)	145 (133-158)	140 (128-160)	143 (130-168)	H=16,238 P=0,001	A:B – Z = -3,736; P = <0,001 A:C – Z = -3,924; P = <0,001 A:D – Z = -3,250; P = 0,001 B:C – Z = -0,969; P = 0,333 B:D – Z = -0,061; P = 0,952 C:D – Z = -0,957; P = 0,338
DIJASTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK (mmHg)	90 (82-100)	88 (80-95)	86 (78-95)	83 (76-92)	H=11,674 P=0,009	A:B – Z = -1,202; P = 0,229 A:C – Z = -1,739; P = 0,082 A:D – Z = -2,442; P = 0,015 B:C – Z = -1,313; P = 0,189 B:D – Z = -2,953; P = 0,003 C:D – Z = -1,942; P = 0,052
SRČANA FREKVENCIJA (otkucaj/min)	78.5 (72,5-87,5)	74.5 (66,5-81,5)	76 (69-85)	74.5 (68,5-82)	H=5,403 P=0,145	
INDEKS TJELESNE MASE (kg/m ²)	27,64 (24,61-33,71)	27,55 (24,38-31,64)	26,38 (23,18-29,76)	27,43 (23,88-31,57)	H=10,136 P=0,017	A:B – Z = -0,717; P = 0,473 A:C – Z = -1,839; P = 0,066 A:D – Z = -1,044; P = 0,297 B:C – Z = -2,795; P = 0,005 B:D – Z = -0,877; P = 0,381 C:D – Z = -1,542; P = 0,123
OPSEG STRUKA (cm)	104 (92-108)	98 (88-104)	93 (84-102)	99 (88-108)	H=22,888 P<0,001	A:B – Z = -1,794; P = 0,073 A:C – Z = -2,996; P = 0,003 A:D – Z = -1,122; P = 0,262 B:C – Z = -3,099; P = 0,002 B:D – Z = -0,819; P = 0,413 C:D – Z = -3,640; P = <0,001

C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; H– vrijednost Kruskal-Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost

5.1.3. Laboratorijski pokazatelji

U tablicama 7 i 8 prikazane su vrijednosti glukoze u plazmi te lipidograma. S obzirom na vrijednosti glukoze nije bilo razlike između endemske i kontrolne skupine. Međutim, analizirajući vrijednosti glukoze po podskupinama registrirane su statistički značajno više vrijednosti glukoze u „Bolesnih i sumnjivih“ u odnosu na preostale tri skupine (5,3mmol/L nasuprot 5,0/4,9/5,1mmol/L; P < 0,001). S obzirom na vrijednosti lipidnih pokazatelja nije bilo razlike niti između skupina, niti između podskupina.

Tablica 7. Vrijednosti metaboličkih laboratorijskih parametara u ispitanika iz endemskih i kontrolnih sela

ISPITIVANA VARIJABLA	ENDEMSKA SELA C (25P-75P)	KONTROLNA SELA C (25P-75P)	U	P
GLUKOZA U PLAZMI (mmol/L)	5,0 (4,6-5,5)	5,1(4,7-5,6)	-1,59	0,112
UKUPNI KOLESTEROL (mmol/L)	5,7 (4,9-6,5)	5,6 (4,9-6,2)	-0,695	0,487
HDL - KOLESTEROL (mmol/L)	1,49 (1,27-1,78)	1,57 (1,32-1,83)	-1,518	0,129
LDL – KOLESTEROL (mmol/L)	3,40 (2,80-4,10)	3,20 (2,70-3,80)	-1,949	0,051
TRIGLICERIDI (mmol/L)	1,24 (0,90-1,83)	1,34 (0,94-1,90)	-0,924	0,355

C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; U – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička vjerojatnost

Tablica 8. Vrijednosti metaboličkih laboratorijskih parametara u ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema „Bračkoj“ klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI C(25P-75P)	^B RIZIČNI C (25P-75P)	^C OSTALI C (25P-75P)	^D KONTROLNA SELA C (25P-75P)	STATISTIKA	POST HOC Mann Whitney test
GLUKOZA U PLAZMI (mmol/L)	5,35 (5,20-5,75)	5,00 (4,60-5,50)	4,90 (4,60-5,40)	5,10 (4,70-5,60)	H=14,572 P=0,002	A:B – Z = -3,182; P = 0,001 A:C – Z = -3,436; P = 0,001 A:D – Z = -2,455; P = 0,014 B:C – Z = -0,324; P = 0,746 B:D – Z = -1,439; P = 0,150 C:D – Z = -1,968; P = 0,049
UKUPNI KOLESTEROL (mmol/L)	5,75 (5,30-6,30)	5,85 (5,05-6,60)	5,55 (4,80-6,40)	5,60 (4,90-6,20)	H=5,652 P=0,130	
HDL - KOLESTEROL (mmol/L)	1,38 (1,18-1,91)	1,50 (1,33-1,85)	1,49 (1,25-1,73)	1,57 (1,32-1,83)	H=6,074 P=0,108	
LDL - KOLESTEROL (mmol/L)	3,45 (2,95-3,95)	3,60 (2,90-4,30)	3,40 (2,70-4,10)	3,20 (2,70-3,80)	H=7,137 P=0,068	
TRIGLICERIDI (mmol/L)	1,47 (1,08-1,94)	1,25 (0,92-1,83)	1,22 (0,89-1,82)	1,34 (0,94-1,90)	H=3,718 P=0,294	

C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; H– vrijednost Kruskal-Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost

U tablicama 9 i 10 prikazani su laboratorijski pokazatelji relevantni za bubrežnu bolest.

Između endemskih i kontrolnih ispitanika nije bilo razlike u vrijednostima hemoglobina. Očekivano, s obzirom da je to jedan od klasifikacijskih kriterija, značajno niže vrijednosti hemoglobina imali su ispitanici u podskupini „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na sve tri preostale skupine između kojih nije bilo značajne razlike (113 nasuprot 138/136/138 g/L; $P < 0,001$).

Značajno više vrijednosti serumskoga kreatinina imali su ispitanici iz endemskih sela u odnosu na kontrolne ispitanike (81,19 nasuprot 74,54 $\mu\text{mol/L}$; $P < 0,001$). Analizirajući vrijednosti serumskoga kreatinina po podskupinama „Bolesni i sumnjivi“ imali su značajno više vrijednosti serumskoga kreatinina od sve tri preostale skupine (126,79 nasuprot 81,19/80,24/74,54 $\mu\text{mol/L}$; $P < 0,001$). Kontrolni ispitanici imali su najniže vrijednosti serumskoga kreatinina, statistički značajno niže od sve tri endemske podskupine. Sukladno tome i procijenjena glomerularna filtracija bila je značajno niža u ispitanika iz endemskih sela u odnosu na kontrolna sela (83,75 nasuprot 87,53 ml/min/1,73m^2 ; $P = 0,008$). U „Bolesnih i sumnjivih“ procijenjena glomerularna filtracija bila je statistički značajno niža u odnosu na preostale skupine (39,72 ml/min/1,73m^2 nasuprot 84,06/85,8/87,53; $P < 0,001$).

Nije bilo razlike u omjeru albumina i kreatinina iz urina između ispitanika endemskih i kontrolnih sela. Međutim, „Bolesni i sumnjivi“ su imali značajno više vrijednosti ACR u odnosu na sve ostale tri skupine (34,48 mg/g nasuprot 5,36/5,41/5,68; $P < 0,001$). Za napomenuti je da su kontrolni bolesnici imali statistički značajno više vrijednosti ACR u odnosu na „Ostale“, ali daljnje analize opaženih razlika nisu predmet ovoga istraživanja.

Kao dosadašnji biljeg tubularnoga oštećenja određen je α1MCR iz uzorka prvoga i drugoga jutarnjeg urina. Važno je napomenuti kako su rezultati omjera iz oba uzorka urina sukladni što je zanimljiv podatak koji će biti publiciran zasebno od glavnih rezultata. Statistički značajno više vrijednosti α1MCR imali su kontrolni ispitanici u odnosu na endemske ispitanike. Međutim kad se ovaj tubularni biljeg analizira po endemskim podskupinama statistički značajno više vrijednosti opažene su u „Bolesnih i sumnjivih“ u odnosu na sve ostale tri skupine što je razumljivo s obzirom da je α1MCR jedan od klasifikacijskih kriterija za endemsku nefropatiju. Nešto su više vrijednosti α1MCR u „Bolesnih i sumnjivih“ prema „Bračkoj“ klasifikaciji dobivene u uzorku prvoga u odnosu na uzorke drugoga jutarnjeg urina. No kad se gledaju preostale dvije endemske podskupine i kontrolni ispitanici zapaža se da kontrolni ispitanici imaju značajno više vrijednosti α1MCR u odnosu na „Rizične“ i „Ostale“ ispitanike i to neovisno o uzorku urina iz kojeg se ovaj biljeg određuje.

Nema razlike u relativnoj volumnoj masi urina između endemskih i kontrolnih ispitanika. No razlika postoji kad se analiziraju endemske podskupine, u „Bolesnih i sumnjivih“ je značajno niža relativna volumna masa urina u odnosu na preostale tri skupine, dok među njima nema značajne razlike.

Tablica 9. Laboratorijski pokazatelji bubrežne bolesti u endemskih i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	ENDEMSKA SELA C(25P-75P)	KONTROLNA SELA C(25P-75P)	U	P
HEMOGLOBIN (g/L)	136 (127-147)	138 (129-145)	-0,730	0,465
Serumski KREATININ (μmol/L)	81,19 (72,64-93,54)	74,54 (67,89-83,09)	-5,359	<0,001
eGFR CKD EPI ml/min/1,73m²	83,75 (70,86-94,91)	87,53 (76,22-99,70)	-2,660	0,008
ACR (mg/g)	5,64 (3,80-10,10)	5,68 (4,13-12,79)	-1,325	0,185
α1MCR (prvi jutarnji urin) mg/g	5,52 (3,65-8,72)	6,83 (4,98-10,31)	-3,933	<0,001
α1MCR (drugi jutarnji urin) mg/g	6,08 (4,19-9,26)	7,40 (5,31-10,45)	-3,104	0,002
RELATIVNA VOLUMNA MASA URINA	1,015 (1,010-1,021)	1,015 (1,011-1,020)	-0,120	0,905

eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKD-EPI formuli; ACR – albumin/kreatinin omjer u urinu; α1MCR – alfa-1 mikroglobulin/kreatinin omjer u urinu; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; U – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička vjerojatnost

Tablica 10. Laboratorijski pokazatelji bubrežne bolesti u ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema „Bračkoj“ klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI C (25P-75P)	^B RIZIČNI C (25P-75P)	^C OSTALI C (25P-75P)	^D KONTROLNA SELA C (25P-75P)	STATISTIKA	POST HOC Mann Whitney test
HEMOGLOBIN (g/L)	113 (102-124)	138 (130-147)	136 (128-148)	138 (129-145)	H=39,975 P<0,001	A:B – Z = -6,071; P = <0,001 A:C – Z = -5,964; P = <0,001 A:D – Z = -5,946; P = <0,001 B:C – Z = -1,079; P = 0,281 B:D – Z = -0,621; P = 0,534 C:D – Z = -0,411; P = 0,681
Serumski KREATININ (μmol/L)	126,79 (106,84-162,42)	81,19 (73,59-91,64)	80,24 (71,69-89,74)	74,54 (67,89-83,09)	H=83,071 P<0,001	A:B – Z = -6,764; P = <0,001 A:C – Z = -7,544; P = <0,001 A:D – Z = -7,648; P = <0,001 B:C – Z = -1,988; P = 0,047 B:D – Z = -4,915; P = <0,001 C:D – Z = -3,827; P = <0,001
eGFR CKD EPI ml/min/1.73m ²	39,72 (26,64-46,35)	84,06 (70,89-94,86)	85,80 (73,36-96,50)	87,53 (76,22-99,70)	H=64,752 P<0,001	A:B – Z = -7,055; P = <0,001 A:C – Z = -7,635; P = <0,001 A:D – Z = -7,524; P = <0,001 B:C – Z = -1,177; P = 0,239 B:D – Z = -2,163; P = 0,031 C:D – Z = -1,415; P = 0,157
ACR (mg/g)	34,48 (13,36-147,96)	5,36 (3,65-10,42)	5,41 (3,77-8,29)	5,68 (4,13-12,79)	H=54,989 P<0,001	A:B – Z = -6,555; P = <0,001 A:C – Z = -7,267; P = <0,001 A:D – Z = -6,198; P = <0,001 B:C – Z = -0,342; P = 0,733 B:D – Z = -1,518; P = 0,129 C:D – Z = -2,169; P = 0,030
α1MCR (prvi jutarnji urin) mg/g	49,70 (22,83-98,02)	5,39 (3,63-8,46)	5,20 (3,55-8,18)	6,83 (4,98-10,31)	H=85,225 P<0,001	A:B – Z = -7,548; P = <0,001 A:C – Z = -7,793; P = <0,001 A:D – Z = -7,082; P = <0,001 B:C – Z = -0,511; P = 0,609 B:D – Z = -3,890; P = <0,001 C:D – Z = -4,843; P = <0,001
α1MCR (drugi jutarnji urin) mg/g	32,62 (21,19-77,25)	6,40 (4,56-9,41)	5,51 (4,00-8,20)	7,40 (5,31-10,45)	H=83,776 P<0,001	A:B – Z = -7,447; P = <0,001 A:C – Z = -7,887; P = <0,001 A:D – Z = -7,193; P = <0,001 B:C – Z = -2,566; P = 0,010 B:D – Z = -2,111; P = 0,035 C:D – Z = -4,586; P = <0,001
RELATIVNA VOLUMNA MASA URINA	1,007 (1,004-1,010)	1,015 (1,010-1,021)	1,016 (1,010-1,022)	1,015 (1,011-1,020)	H=36,355 P<0,001	A:B – Z = -5,450; P = <0,001 A:C – Z = -5,775; P = <0,001 A:D – Z = -5,918; P = <0,001 B:C – Z = -0,815; P = 0,415 B:D – Z = -0,002; P = 0,999 C:D – Z = -0,844; P = 0,399

eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKD-EPI formuli; ACR – albumin/kreatinin omjer u urinu; α1MCR – alfa-1 mikroglobulin/kreatinin omjer u urinu; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; H – vrijednost Kruskal - Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost

Rezultati analize novih biljega oštećenja proksimalnoga tubula prikazani su u tablici 11. Biljezi tubularnoga oštećenja KIM-1, HGF i IP-10 standardizirani su prema vrijednostima kreatinina u mokraći i izraženi kao njihov omjer u mjernoj jedinici ng/g kreatinina. Vrijednosti IP-10 bile su više u ispitanika iz endemskih sela u odnosu na ispitanike iz kontrolnih sela. Za KIM-1 te HGF nije bilo statistički značajne razlike između ove dvije skupine.

Tablica 11. Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula ispitanika iz endemskih i kontrolnih sela

ISPITIVANA VARIJABLA	ENDEMSKA SELA C (25P-75P)	KONTROLNA SELA C (25P-75P)	U	P
KIM-1 (ng/g)	271,76 (149,45-461,36)	288,64 (174,62-464,13)	-0,662	0,508
HGF (ng/g)	308,20 (160,48-522,46)	296,92 (157,92-496,44)	-0,748	0,454
IP-10 (ng/g)	26,06 (8,38-59,82)	16,79 (9,88-34,87)	-2,277	0,023

KIM-1 – kidney injury molecule – 1; HGF – faktor rasta hepatocita, IP-10 – interferonom gama induciran protein 10; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; U – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička vjerojatnost

No kada se analiziraju endemske podskupine uočavaju se značajno više vrijednosti KIM-1 u „Bolesnih i sumnjivih“ u odnosu na sve preostale tri skupine (509,34 nasuprot 258,96/262,65/288,64 ng/g; $P < 0,001$) dok između preostalih skupina nema razlike. Isto se uočava i za HGF koji u „Bolesnih i sumnjivih“ iznosi 543,52 ng/g, značajno više nego u „Rizičnih“, „Ostalih“ i kontrolnih ispitanika u kojih iznosi 300,22/304,04/296,92 ng/g; $P = 0,004$. S druge strane, analizom IP-10 u endemskim podskupinama nema statistički značajne razlike u IP-10 među endemskim i kontrolnim ispitanicima, kao niti između endemskih podskupina. Rezultati novih biljega tubularnoga oštećenja prikazani su u tablici 12.

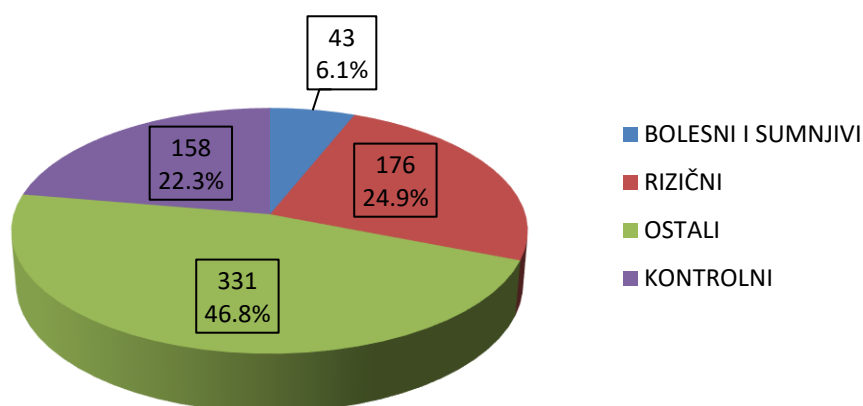
Tablica 12. Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula u ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema „Bračkoj“ klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI C (25P-75P)	^B RIZIČNI C(25P-75P)	^C OSTALI C(25P-75P)	^D KONTROLNA SELA C(25P-75P)	STATISTIKA	POST HOC Mann Whitney test
KIM-1 (ng/g)	509,34 (307,65-892,13)	258,96 (169,26-451,27)	262,65 (138,66-443,20)	288,64 (174,62-464,13)	H=19,238 P<0,001	A:B – Z = -4,108; P = <0,001 A:C – Z = -4,116; P = <0,001 A:D – Z = -3,748; P = <0,001 B:C – Z = -0,742; P = 0,458 B:D – Z = -0,627; P = 0,531 C:D – Z = -1,274; P = 0,203
HGF (ng/g)	543,52 (263,34-1042,97)	300,22 (159,16-516,05)	304,04 (156,36-514,41)	296,92 (157,92-496,44)	H=13,357 P=0,004	A:B – Z = -3,336; P = 0,001 A:C – Z = -3,473; P = 0,001 A:D – Z = -3,710; P = <0,001 B:C – Z = -0,742; P = 0,458 B:D – Z = -0,419; P = 0,675 C:D – Z = -0,233; P = 0,816
IP-10 (ng/g)	34,28 (5,94-95,92)	25,36 (8,80-52,74)	25,79 (8,30-60,10)	16,79 (9,88-34,87)	H=5,865 P=0,118	

KIM-1 – kidney injury molecule – 1; HGF – faktor rasta hepatocita, IP-10 – interferonom gama induciran protein 10; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; H – vrijednost Kruskal – Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost

5.2. Rezultati za ispitanike klasificirane u endemske podskupine prema modificiranoj SZO klasifikaciji i kontrolne ispitanike

Prema kriterijima modificirane SZO klasifikacije endemske nefropatije te objedinjavanjem „Bolesnih i sumnjivih“ ispitanika u jednu skupinu navedena podskupina imala je 43 ispitanika (16 „Bolesnih“ i 27 „Sumnjivih“), „Rizičnih“ ispitanika bilo je 176, a „Ostalih“ 331 (slika 8). Slijedi prikaz rezultata za ispitanike podijeljene u četiri skupine – tri endemske podskupine klasificirane prema modificiranoj SZO klasifikaciji te kontrolne ispitanike.



Slika 8. Udio kontrolnih ispitanika i endemskih ispitanika klasificiranih prema modificiranoj SZO klasifikaciji

5.2.1. Demografski podatci

U tablici 13 prikazani su demografski podatci ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema modificiranoj SZO klasifikaciji. Rezultati ove analize podudarni su s onima dobivenim za endemske podskupine razvrstane prema „Bračkoj“ klasifikaciji. Niti prema ovoj klasifikaciji nema razlike u spolnoj raspodjeli ispitanika. Značajno su stariji bili „Bolesni i sumnjivi“ čija je dob iznosila 73 godine u odnosu na sve ostale skupine. Nije bilo razlike u dobi između „Rizičnih“ i „Ostalih“, dok su kontrolni ispitanici bili nešto stariji od „Rizičnih“ i „Ostalih“ ispitanika. Kao i prema „Bračkoj“ klasifikaciji najdulje su u endemskom selu boravili „Bolesni i sumnjivi“, dok su „Ostali“ boravili u EN selu značajno kraće od sve preostale tri skupine.

Što se tiče pozitivne obiteljske anamneze za endemsku nefropatiju rezultati su prema modificiranoj SZO klasifikaciji nešto drukčiji što je odraz promjene klasifikacijskih kriterija za endemsku nefropatiju u novoj „Bračkoj“ klasifikaciji. Tako je prema modificiranoj SZO klasifikaciji, u skupini „Bolesni i sumnjivi“ 74,41% ispitanika imalo pozitivnu obiteljsku anamnezu, u skupini „Rizični“ 100% ispitanika, u skupini „Ostali“ nije bilo ispitanika s pozitivnom obiteljskom anamezom za endemsku nefropatiju, dok je u kontrolnoj skupini bilo 1.26% ispitanika s pozitivnom obiteljskom anamezom. Nije bilo razlike u pušačkom statusu između promatranih skupina.

Analizirajući prisutnost karcinoma prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava, sedam je ispitanika (16,28%) u skupini „Bolesni i sumnjivi“ imalo karcinom što je bilo statistički značajno više u odnosu na ostale skupine, dva ispitanika (0,6%) u skupini „Ostali“, dok u skupini „Rizični“ i u kontrolnoj skupini nije bilo oboljelih od karcinoma prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava.

Tablica 13. Demografski podatci ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema Modificiranoj SZO klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI	^B RIZIČNI	^C OSTALI	^D KONTROLNA SELA	STATISTIKA	POST HOC TEST
UDIO ISPITANIKA n (%)	43 (6,07)	176 (24,86)	331(46,75)	158 (22,32)		
SPOL M/Ž n (%)	19/24 (44,2/55,8)	74/102 (42,05/57,95)	146/185 (44,1/55,9)	66/92 (41,77/58,23)	$\chi^2=0,351$ P = 0,950	
DOB god C (min-maks)	73 (27-85)	48 (19-86)	49 (19-87)	53 (19-93)	H=52,165 P<0,001	¹ A:B – Z = -7,019; P < 0,001 A:C – Z = -5,975 ; P < 0,001 A:D – Z = -4,786; P < 0,001 B:C – Z = -1,694; P < 0,090 B:D – Z = -3,606; P < 0,001 C:D – Z = -2,196; P < 0,028
BORAVAK U SELU god C (25P-75P)	68 (54-78)	46 (32-55)	39 (21-55)	47 (25-62)	H=52,568 P<0,001	¹ A:B – Z = -6,575; P = <0,001 A:C – Z = -6,685; P = <0,001 A:D – Z = -5,314; P = <0,001 B:C – Z = -2,369; P = 0,018 B:D – Z = -0,401; P = 0,688 C:D – Z = -2,343 ; P = 0,019
POZITIVNA OBITELJSKA ANAMNEZA n (%)	32 (74,41)	176 (100)	0 (0)	2 (1,26)	$\chi^2=659,298$ P<0,001	² A: $\chi^2 = 41,623$; P < 0,001 B: $\chi^2 = 550,888$; P < 0,001 C: $\chi^2 = 259,714$; P < 0,001 D: $\chi^2 = 76,496$; P < 0,001
PUŠAČ n (%)	6 (13,96)	32 (18,18)	71 (21,26)	22 (23,9)	$\chi^2=6,075$ p = 0,108	
KARCINOM PRIJELAZNOG EPITELA n (%)	7 (16,28)	0 (0)	2 (0.6)	0 (0)	$\chi^2=82,645$ p<0,001	² A: $\chi^2 = 69,338$; P < 0,001 B: $\chi^2 = 1,821$; P = 0,177 C: $\chi^2 = 1,326$; P = 0,250 D: $\chi^2 = 1,477$; P = 0,224

χ^2 – chi kvadrat test; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; H – vrijednost Kruskal – Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost ¹post hoc Mann Whitney test; ²post hoc χ^2 test

5.2.2. Kliničke osobitosti ispitanika

Prema modificiranoj SZO klasifikaciji „Bolesni i sumnjivi“ imali su značajno više vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka u odnosu na sve ostale skupine (166 mmHg nasuprot 140/141/143 mmHg; $P < 0,001$), dok između „Rizičnih“, „Ostalih“ i kontrolnih ispitanika nije bilo razlike (tablica 14). Također, „Bolesni i sumnjivi“ imali su više vrijednosti dijastoličkoga arterijskog tlaka u odnosu na ostale tri skupine, a nešto su više vrijednosti dijastoličkoga arterijskog tlaka imali „Ostali“ u odnosu na kontrolne ispitanike (tablica 14). Nije bilo razlike u srčanoj frekvenciji i indeksu tjelesne mase između ispitivanih skupina. Najmanji opseg struka imali su „Ostali“, značajno manji u odnosu na preostale tri skupine među kojima nije bilo razlike (tablica 14).

Tablica 14. Srednje vrijednosti arterijskih tlakova i antropometrijskih mjera ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema modificiranoj SZO klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI C(25P-75P)	^B RIZIČNI C(25P-75P)	^C OSTALI C(25P-75P)	^D KONTROLNA SELA C (25P-75P)	STATISTIKA	POST HOC Mann Whitney test
SISTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK (mmHg)	166 (150-180)	140 (130-155)	141 (130-160)	143 (130-168)	H=27,64 P<0,001	A:B – Z = -5,512; P = <0,001 A:C – Z = -4,784; P = <0,001 A:D – Z = -3,992; P = <0,001 B:C – Z = -0,963; P = 0,335 B:D – Z = -1,314; P = 0,189 C:D – Z = -0,583; P = 0,560
DIJASTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK (mmHg)	95 (82-100)	85 (80-92)	87 (79-95)	83 (76-92)	H=15,7 P<0,001	A:B – Z = -3,010; P = 0,003 A:C – Z = -2,703; P = 0,007 A:D – Z = -3,529; P = <0,001 B:C – Z = -0,654; P = 0,513 B:D – Z = -1,783; P = 0,075 C:D – Z = -2,343; P = 0,019
SRČANA FREKVENCIJA (otkucaj/min)	77,8 (70,8-91,8)	75,5 (67,0-82,5)	75,5 (69,0-84,5)	74,5 (68,5-82,0)	H=3,466 P=0,325	
INDEKS TJELESNE MASE (kg/m ²)	27,43 (24,25-32,60)	27,17 (24,03-31,22)	26,49 (23,38-29,97)	27,43 (23,88-31,57)	H=6,342 P=0,096	
OPSEG STRUKA (cm)	99 (91-107)	98 (88-104)	93 (85-103)	99 (88-108)	H=16,65 P=0,001	A:B – Z = -1,014; P = 0,310 A:C – Z = -2,398; P = 0,017 A:D – Z = -0,133; P = 0,894 B:C – Z = -2,514; P = 0,012 B:D – Z = -1,126; P = 0,260 C:D – Z = -3,439; P = 0,001

C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. Percentila; H – vrijednost Kruskal – Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost

5.2.3. Laboratorijski pokazatelji

U tablici 15 prikazane su vrijednosti glukoze u plazmi te lipidograma između ispitivanih skupina. Vrijednosti glukoze bile su nešto više u „Bolesnih i sumnjivih“ u odnosu na preostale tri skupine. Nadalje, postojala je i razlika između kontrolnih ispitanika i „Rizičnih“, „Rizični“ su imali niže vrijednosti glukoze u odnosu na kontrolne, dok između „Ostalih“ i kontrolnih, kao i „Ostalih“ i „Rizičnih“ nije bilo razlike. Te razlike iako statistički značajne, s obzirom na apsolutne vrijednosti nisu klinički relevantne. Nije bilo razlike između skupina niti u jednom od lipidnih parametara.

Tablica 15. Vrijednosti glukoze u plazmi te lipidnih parametara u ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema modificiranoj SZO klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI C(25P-75P)	^B RIZIČNI C(25P-75P)	^C OSTALI C(25P-75P)	^D KONTROLNA SELA C(25P-75P)	STATISTIKA	POST HOC Mann Whitney test
GLUKOZA U PLAZMI (mmol/L)	5,40 (5,20-5,80)	4,90 (4,50-5,35)	5,00 (4,70-5,50)	5,10 (4,70-5,60)	H=23,315 P<0,001	A:B – Z = -4,382; P = <0,001 A:C – Z = -4,060; P = <0,001 A:D – Z = -2,959; P = 0,003 B:C – Z = -1,339; P = 0,181 B:D – Z = -2,539; P = 0,011 C:D – Z = -1,621; P = 0,105
UKUPNI KOLESTEROL (mmol/L)	5,70 (5,10-6,30)	5,65 (4,90-6,45)	5,60 (4,80-6,50)	5,60 (4,90-6,20)	H=0,802 P=0,849	
HDL - KOLESTEROL (mmol/L)	1,38 (1,20-1,89)	1,51 (1,31-1,84)	1,50 (1,27-1,74)	1,57 (1,32-1,83)	H=6,144 P=0,105	
LDL - KOLESTEROL (mmol/L)	3,50 (2,90-4,00)	3,50 (2,80-4,10)	3,40 (2,70-4,20)	3,20 (2,70-3,80)	H=3,893 P=0,273	
TRIGLICERIDI (mmol/L)	1,51 (1,03-2,53)	1,19 (0,85-1,71)	1,24 (0,90-1,82)	1,34 (0,94-1,90)	H=7,389 P=0,060	

C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; H – vrijednost Kruskal – Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost

U tablici 16 prikazani su laboratorijski pokazatelji relevantni za bubrežnu bolest. Kao i prema „Bračkoj“ klasifikaciji, i prema modificiranoj SZO klasifikaciji najniže vrijednosti hemoglobina imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na preostale tri skupine između kojih nije bilo razlike (121 nasuprot 137/136/138 g/L; $P < 0,001$).

Značajno više vrijednosti serumskog kreatinina imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na sve ostale skupine (110,64 nasuprot 79,29/80,24/74,54 $\mu\text{mol/L}$; $P < 0,001$). Kontrolni ispitanici imali su značajno niže vrijednosti kreatinina i u odnosu na „Rizične“ i „Ostale“ dok između ove dvije skupine nije bilo razlike. Procijenjena glomerularna filtracija bila je, u skladu s gornjim rezultatima, najniža u „Bolesnih i sumnjivih“ (44,82 nasuprot 85,76/84,35/87,53 ml/min/1,73m^2 ; $P < 0,001$), dok između ostalih skupina nije bilo značajne razlike.

Nadalje, vrijednosti omjera albumina i kreatinina u urinu bile su najviše u „Bolesnih i sumnjivih“ u odnosu na sve ostale ispitanike (29,27 nasuprot 4,96/5,57/5,68 mg/g ; $P < 0,001$). Prema ovoj klasifikaciji kontrolni su ispitanici imali nešto više vrijednosti ACR u odnosu na „Rizične“, dok između „Rizičnih“ i „Ostalih“ te „Ostalih“ i kontrolnih nije bilo razlike u ACR.

Kao i prema „Bračkoj“ klasifikaciji značajno više vrijednosti omjera alfa-1 mikroglobulina i kreatinina iz oba uzorka urina imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na preostale skupine ($\alpha 1\text{MCR}$ prvi jutarnji urin 25,73 nasuprot 5,13/5,23/6,83 mg/g ; $P < 0,001$; $\alpha 1\text{MCR}$ drugi jutarnji urin 26,93 nasuprot 5,94/5,61/7,40 mg/g ; $P < 0,001$). Također, kao i prema „Bračkoj“ klasifikaciji, kontrolni ispitanici imali su nešto više vrijednosti $\alpha 1\text{MCR}$ u odnosu na „Rizične“ i „Ostale“ ispitanike.

Relativna volumna masa urina bila je najniža u „Bolesnih i sumnjivih“ u odnosu na sve tri ostale skupine među kojima nema razlike.

Tablica 16. Laboratorijski pokazatelji bubrežne bolesti ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema modificiranoj SZO klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI C(25P-75P)	^B RIZIČNI C(25P-75P)	^C OSTALI C(25P-75P)	^D KONTROLNA SELA C(25P-75P)	STATISTIKA	POST HOC Mann Whitney test
HEMOGLOBIN (g/L)	121 (105-138)	137 (129-146)	136 (128-148)	138 (129-145)	H=20,799 P<0,001	A:B – Z = -4,280; P = <0,001 A:C – Z = -4,340; P = <0,001 A:D – Z = -4,235; P = <0,001 B:C – Z = -0,127; P = 0,899 B:D – Z = -0,039; P = 0,969 C:D – Z = -0,119; P = 0,905
Serumski KREATININ (μmol/L)	110,64 (87,84-150,54)	79,29 (72,64-90,22)	80,24 (71,69-90,69)	74,54 (67,89-83,09)	H=76,099 P<0,001	A:B – Z = -6,740; P = <0,001 A:C – Z = -7,015; P = <0,001 A:D – Z = -7,758; P = <0,001 B:C – Z = -0,008; P = 0,994 B:D – Z = -3,843; P = <0,001 C:D – Z = -4,198; P = <0,001
eGFR CKD EPI ml/min/1.73m ²	44,82 (32,41-72,91)	85,76 (73,71-95,20)	84,35 (72,97-96,50)	87,53 (76,22-99,70)	H=59,068 P<0,001	A:B – Z = -6,841; P = <0,001 A:C – Z = -7,117; P = <0,001 A:D – Z = -7,191; P = <0,001 B:C – Z = -0,614; P = 0,539 B:D – Z = -1,097; P = 0,273 C:D – Z = -1,799; P = 0,072
ACR (mg/g)	29,27 (12,20-130,89)	4,96 (3,49-8,35)	5,57 (3,80-8,50)	5,68 (4,13-12,79)	H=67,063 P<0,001	A:B – Z = -7,490; P = <0,001 A:C – Z = -7,652; P = <0,001 A:D – Z = -6,377; P = <0,001 B:C – Z = -1,300; P = 0,194 B:D – Z = -2,701; P = 0,007 C:D – Z = -1,901; P = 0,057
α1MCR (prvi jutarnji urin) mg/g	25,73 (10,87-51,76)	5,13 (3,50-7,63)	5,23 (3,55-8,33)	6,83 (4,98-10,31)	H=95,421 P<0,001	A:B – Z = -8,144; P = <0,001 A:C – Z = -8,089; P = <0,001 A:D – Z = -6,828; P = <0,001 B:C – Z = -0,991; P = 0,322 B:D – Z = -5,118; P = <0,001 C:D – Z = -4,597; P = <0,001
α1MCR (drugi jutarnji urin) mg/g	26,93 (18,67-39,04)	5,94 (4,15-7,69)	5,61 (4,02-8,27)	7,40 (5,31-10,45)	H=125,23 P<0,001	A:B – Z = -9,965; P = <0,001 A:C – Z = -9,819; P = <0,001 A:D – Z = -9,107; P = <0,001 B:C – Z = -0,105; P = 0,916 B:D – Z = -4,236; P = <0,001 C:D – Z = -4,292; P = <0,001
RELATIVNA VOLUMNA MASA URINA	1,009 (1,005-1,013)	1,015 (1,010-1,022)	1,016 (1,010-1,022)	1,015 (1,011-1,020)	H=28,436 P<0,001	A:B – Z = -4,838; P = <0,001 A:C – Z = -5,066; P = <0,001 A:D – Z = -5,042; P = <0,001 B:C – Z = -0,089; P = 0,929 B:D – Z = -0,626; P = 0,531 C:D – Z = -0,601; P = 0,548

eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKD-EPI formuli; ACR – albumin/kreatinin omjer u urinu; α1MCR – alfa-1 mikroglobulin/kreatinin omjer u urinu; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; H – vrijednost Kruskal – Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost

Rezultati analize novih biljega oštećenja proksimalnoga tubula prikazani su u tablici 17. Kao i prema „Bračkoj“ klasifikaciji značajno više vrijednosti KIM-1 imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na sve preostale skupine (415,45 nasuprot 247,42/275,47/288,64 ng/g; $P < 0,001$), dok između „Rizičnih“, „Ostalih“ i kontrolnih ispitanika nije bilo razlike. Isto tako, najviše vrijednosti HGF-a imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na ostale tri skupine (489,43 nasuprot 283,21/309,09/296,92 ng/g; $P < 0,001$), dok između te tri skupine nije bilo razlike. Za razliku od „Bračke“ klasifikacije, prema modificiranoj SZO klasifikaciji postoji razlika u biljegu IP-10 između „Bolesnih i sumnjivih“ i kontrolnih ispitanika (42,46 nasuprot 16,79 ng/g; $P = 0,042$), dok nema razlike u vrijednostima IP-10 između endemskih podskupina.

Tablica 17. Biljezi oštećenja proksimalnog tubula u ispitanika razvrstanih u endemske podskupine prema modificiranoj SZO klasifikaciji i kontrolnih ispitanika

ISPITIVANA VARIJABLA	^A BOLESNI I SUMNJIVI C(25P-75P)	^B RIZIČNI C(25P-75P)	^C OSTALI C(25P-75P)	^D KONTROLNA SELA C(25P-75P)	STATISTIKA	POST HOC Mann Whitney test
KIM-1 (ng/g)	415,45 (230,65-825,21)	247,42 (155,29-419,63)	275,47 (144,07-452,63)	288,64 (174,62-464,13)	H=13,133 P=0,004	A:B – Z = -3,573; P = <0,001 A:C – Z = -3,196; P = 0,001 A:D – Z = -2,783; P = 0,005 B:C – Z = -0,532; P = 0,595 B:D – Z = -1,377; P = 0,169 C:D – Z = -0,841; P = 0,400
HGF (ng/g)	489,43 (258,83-911,19)	283,21 (150,81-494,38)	309,09 (162,14-524,79)	296,92 (157,92-496,44)	H=13,038 P=0,005	A:B – Z = -3,466; P = <0,001 A:C – Z = -3,202; P = 0,001 A:D – Z = -3,516; P = <0,001 B:C – Z = -0,592; P = 0,554 B:D – Z = -0,119; P = 0,905 C:D – Z = -0,419; P = 0,675
IP-10 (ng/g)	42,46 (13,93-92,26)	25,92 (9,05-51,61)	24,56 (7,90-60,85)	16,79 (9,88-34,87)	H=8,188 P=0,042	A:B – Z = -1,638; P = 0,101 A:C – Z = -1,553; P = 0,121 A:D – Z = -2,907; P = 0,004 B:C – Z = -0,173; P = 0,863 B:D – Z = -1,683; P = 0,095 C:D – Z = -1,844; P = 0,065

KIM-1 – Kidney injury molecule – 1; HGF – faktor rasta hepatocita; IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10;
C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. Percentila; H – vrijednost Kruskal – Wallisovog testa; P – statistička vjerojatnost

5.3. Usporedba novih biljega tubularnoga oštećenja s dosadašnjim biljegom tubularnoga oštećenja omjerom alfa-1 mikroglobulina i kreatina u urinu

U sljedećoj analizi usporedili smo nove tubularne biljege KIM-1, HGF i IP-10 s dosadašnjim biljegom oštećenja proksimalnoga tubula α 1MCR koji je ujedno i dijagnostički kriterij za endemsku nefropatiju. S obzirom da je granična vrijednost za α 1MCR prema novoj „Bračkoj“ klasifikaciji 31,5 mg/g, podijelili smo ispitanike iz endemskih sela u dvije skupine prema vrijednostima α 1MCR < 31,5 odnosno > 31,5 mg/g s ciljem da utvrdimo ima li razlike između ovih skupina u novim tubularnim biljezima. U analizu smo uključili i albumin/kreatinin omjer kao standardni biljeg proteinurije. Rezultati ove analize prikazani su u tablici 18. Ispitanici s α 1MCR > 31,5 mg/g imali su statistički značajno više vrijednosti KIM-1 i HGF-a, dok nema razlike u biljevu IP-10. Također, u skupini ispitanika s α 1MCR > 31,5 mg/g izmjerene su značajno više vrijednosti i ACR.

Tablica 18. Novi biljezi tubularnog oštećenja i albumin/kreatinin omjer u endemskih ispitanika podijeljenih u dvije skupine prema vrijednostima omjera alfa-1 mikroglobulin i kreatinina iz urina

	α1MCR < 31,5 mg/g C (25P-75P)	α1MCR > 31,5 mg/g C (25P-75P)	U	P
KIM-1 (ng/g)	262,46 (147,39-446,11)	467,73 (309,27-892,13)	-3,603	<0,001
HGF (ng/g)	299,34 (157,11-512,74)	770,72 (324,40-1280,26)	-4,063	<0,001
IP-10 (ng/g)	21,33 (8,93-51,19)	40,79 (6,26-92,26)	-0,530	0,595
ACR (mg/g)	5,39 (3,75-9,07)	47,94 (16,03-132,38)	-6,566	<0,001

α 1MCR – alfa-1 mikroglobulin/ kreatinin omjer iz urina; KIM -1 – Kidney injury molecule – 1; HGF – faktor rasta hepatocita; IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10; ACR – albumin/kreatinin omjer; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; U – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička vjerojatnost

5.4. Usporedba novih biljega tubularnoga oštećenja u ispitanika koji u endemskim selima žive dulje odnosno kraće od 20 godina

Sljedeći korak u analizi bio je usporediti vrijednosti novih biljega tubularnoga oštećenja KIM-1, HGF i IP-10 u ispitanika koji u endemskom selu žive dulje od 20 godina u odnosu na one koji u endemskom selu žive kraće od 20 godina. Nismo našli statistički značajne razlike niti u jednom od novih biljega tubularnog oštećenja (tablica 19).

Tablica 19. Biljezi oštećenja proksimalnog tubula u ispitanika razvrstanih ovisno žive li u endemskim selima više i manje od 20 godina.

	BORAVAK U EN SELU > 20 GODINA C (25P-75P)	BORAVAK U EN SELU < 20 GODINA C (25P-75P)	U	P
KIM-1 (ng/g)	250,55 (128,33-438,28)	239,32 (138,66-400,41)	-0,121	0,904
HGF (ng/g)	309,33 (152,46-524,79)	341,18 (172,02-492,07)	-0,516	0,606
IP-10 (ng/g)	20,35 (6,72-51,55)	29,72 (9,85-61,85)	-0,950	0,342

EN – endemska nefropatija; KIM-1 – Kidney injury molecule – 1; HGF – faktor rasta hepatocita; IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; U – vrijednost Mann – Whitneyevog testa; P – statistička vjerojatnost

5.5. Analize povezanosti

Učinjena je analiza povezanosti dobi, spola, sistoličkoga arterijskog tlaka, glukoze u plazmi te dosadašnjih biljega bubrežne bolesti (eGFR, ACR, α 1MCR) s novim biljezima bubrežnog oštećenja (KIM 1, HGF, IP-10) u cjelokupnoj populaciji ispitanika. U tablici 20 prikazane su vrijednosti koeficijenata korelacije navedenih parametara.

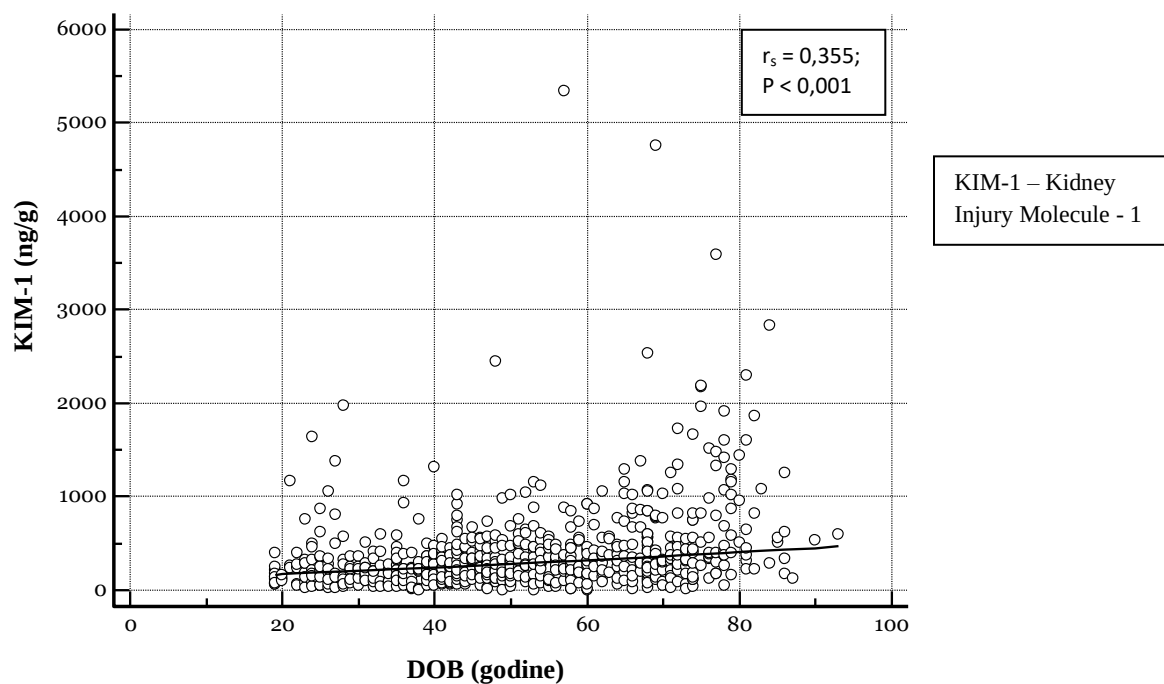
Tablica 20. Vrijednosti koeficijenata povezanosti novih biljega bubrežnoga oštećenja s ostalim faktorima rizika bubrežne bolesti i dosadašnjim biljezima bubrežnog oštećenja u cijeloj ispitivanoj skupini

Ispitivana varijabla		KIM-1 (ng/g)	HGF (ng/g)	IP-10 (ng/g)
DOB (godine)	r_s	0,355	0,385	0,021
	P	<0,001	<0,001	0,582
	N	708	708	708
SPOL	r_s	0,226	0,140	0,058
	P	<0,001	<0,001	0,123
	N	708	708	708
SISTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK (mmHg)	r_s	0,255	0,275	0,019
	P	<0,001	<0,001	0,611
	N	702	702	702
GLUKOZA U PLAZMI (mmol/L)	r_s	0,175	0,180	-0,043
	P	<0,001	<0,001	0,260
	N	705	705	705
eGFR CKD EPI (ml/min/1,73m ²)	r_s	-0,237	-0,256	0,030
	P	<0,001	<0,001	0,431
	N	708	708	708
ACR (mg/g)	r_s	0,314	0,268	0,133
	P	<0,001	<0,001	<0,001
	N	707	707	707
α 1MCR prvi jutarnji urin (mg/g)	r_s	0,224	0,265	0,052
	P	<0,001	<0,001	0,165
	N	706	706	706
α 1MCR drugi jutarnji urin (mg/g)	r_s	0,216	0,399	0,033
	P	<0,001	<0,001	0,379
	N	700	700	700

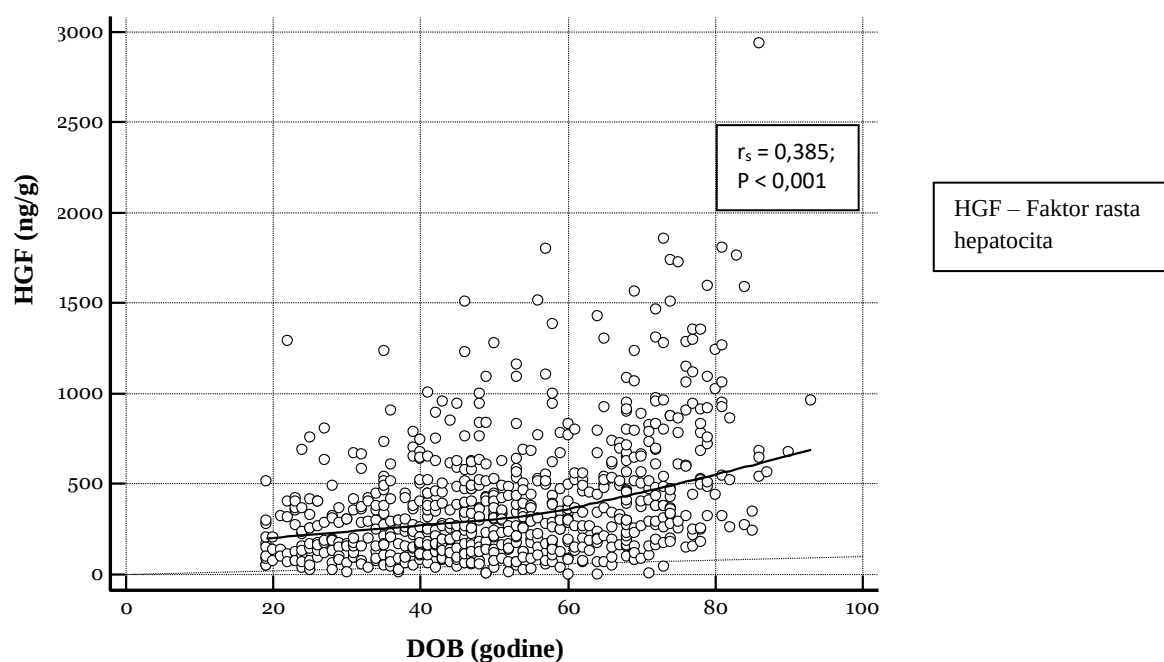
KIM-1 – Kidney injury molecule – 1; HGF – factor rasta hepatocita; IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10; eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKD-EPI formuli; ACR – albumin/kreatinin omjer; α 1MCR – alfa-1 mikroglobulin/kreatinin omjer u urinu; r_s – Spearmanov koeficijent korelacije; P – statistička vjerojatnost

IP-10 nije bio povezan niti s jednom ispitivanom varijablom.

Dob ispitanika bila je slabo pozitivno povezana s vrijednostima KIM-1 ($r_s = 0,355$; $P < 0,001$) i HGF ($r_s = 0,385$; $P < 0,001$) što se može vidjeti i na pripadajućim pravcima odnosno krivuljama povezanosti na slikama 9 i 10.



Slika 9. Krivulja povezanosti KIM-1 i dobi



Slika 10. Krivulja povezanosti HGF i dobi

Potom je analizirana povezanost dobi i novih tubularnih biljega pri čemu je prilagodba napravljena za godine provedene u endemskom selu. U tablici 21 prikazani su koeficijenti povezanosti nakon prilagodbe za duljinu boravka u endemskom selu iz čega je vidljivo da nakon prilagodbe praktički nema povezanosti dobi i biljega KIM-1 ($r_s = 0,200$; $P < 0,001$), a povezanost dobi i HGF je također značajno manja ($r_s = 0,302$; $P < 0,001$).

Tablica 21. Povezanost dobi i biljega oštećenja proksimalnoga tubula nakon prilagodbe za duljinu boravka u endemskom selu

		Dob (god.)
KIM-1 (ng/g)	r_s	0,200
	P	< 0,001
HGF (ng/g)	r_s	0,302
	P	< 0,001
IP-10 (ng/g)	r_s	0,048
	P	0,225

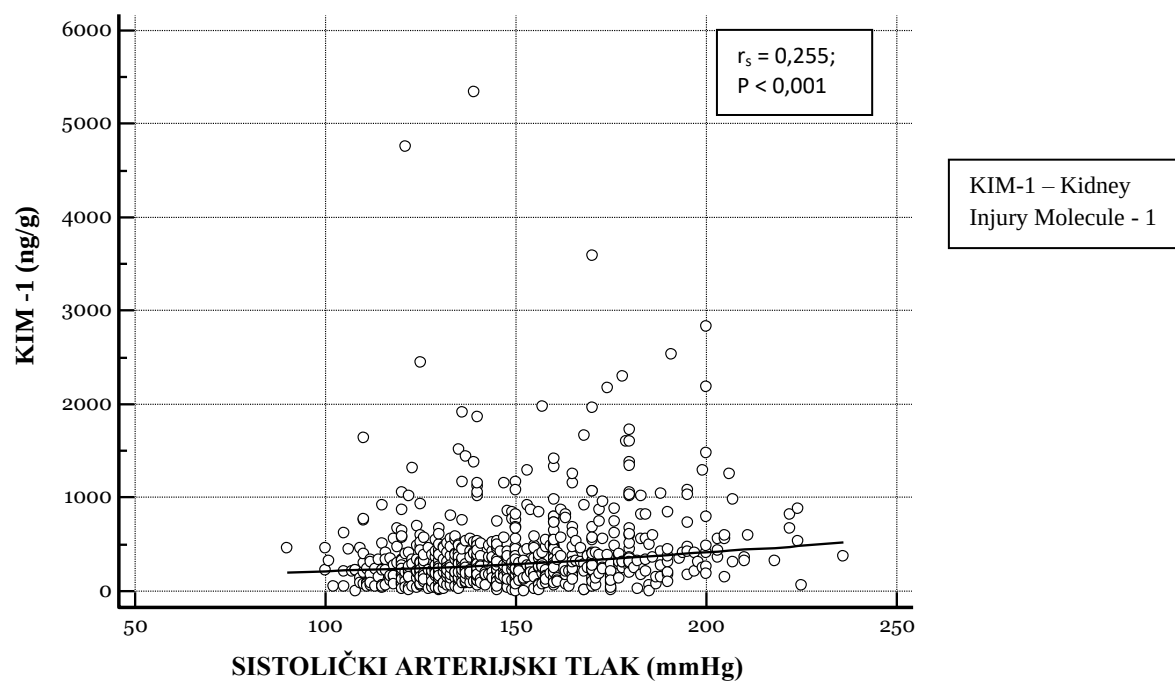
KIM-1 – Kidney injury molecule – 1; HGF faktor rasta hepatocita;

IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10;

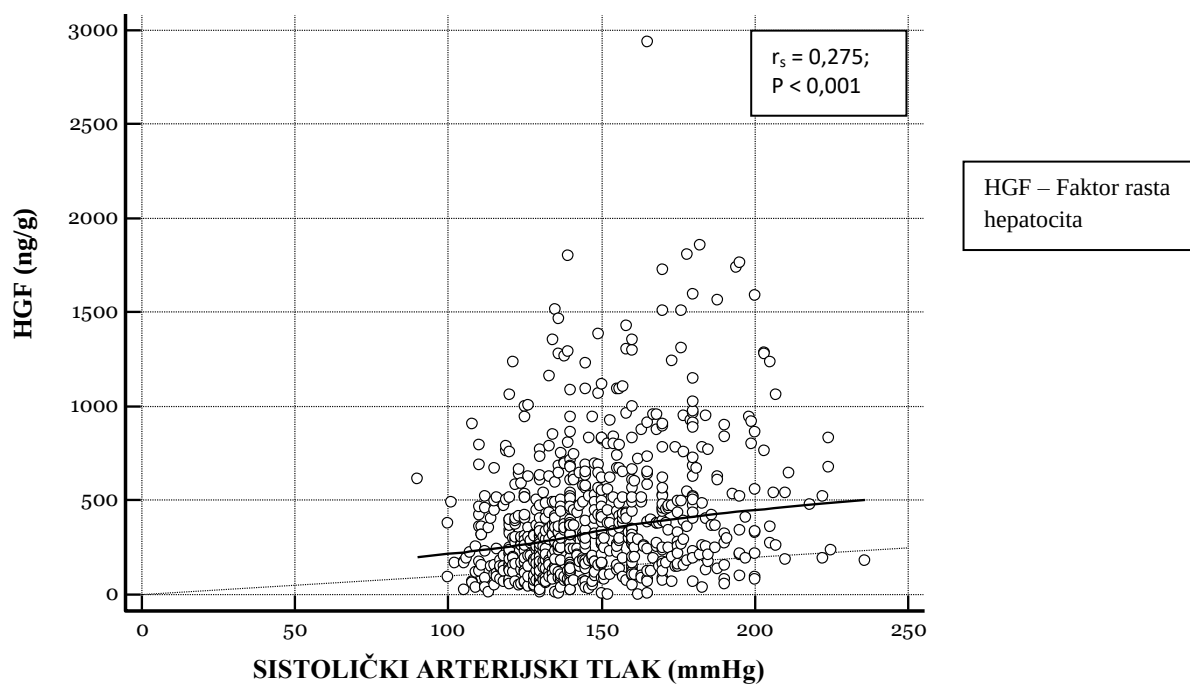
r_s – Spearmanov koeficijent korelacije; P- statistička vjerojatnost

Nije bilo povezanosti spola niti s jednim novim biljekom oštećenja proksimalnoga tubula. Također, glukoza u plazmi nije bila povezana niti s jednim novim biljekom.

Vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka bile su slabo pozitivno povezane sa KIM-1 ($r_s = 0,255$; $P < 0,001$) i HGF ($r_s = 0,275$; $P < 0,001$) što je prikazano na slikama 11. i 12.



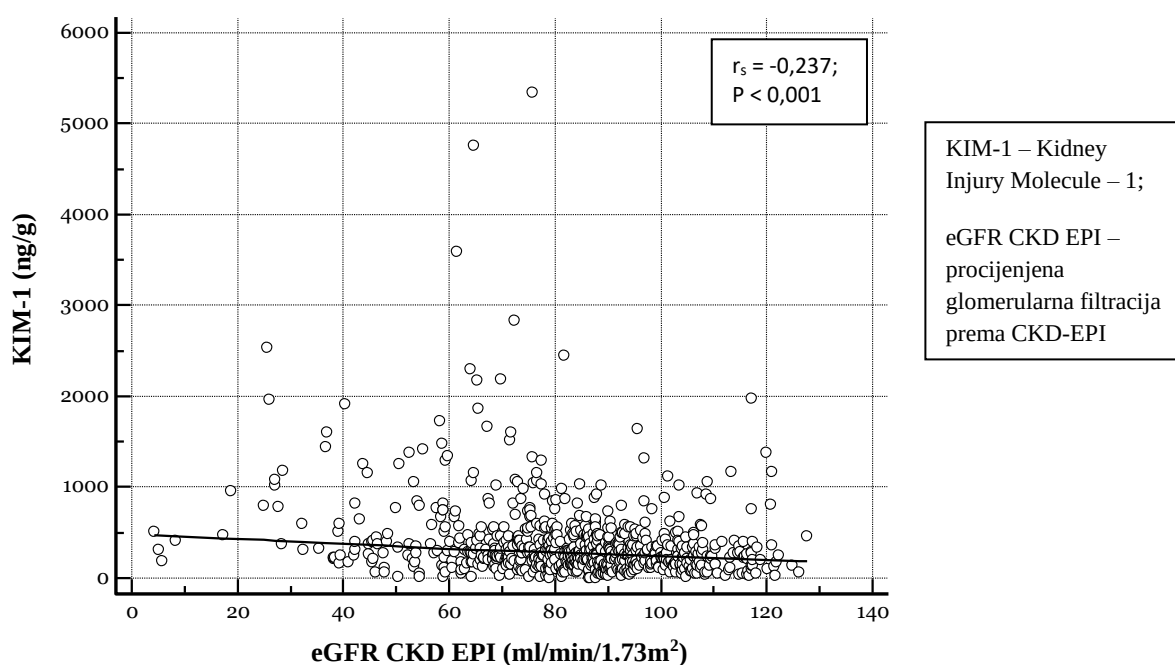
Slika 11. Krivulja povezanosti KIM-1 i sistoličkoga arterijskog tlaka



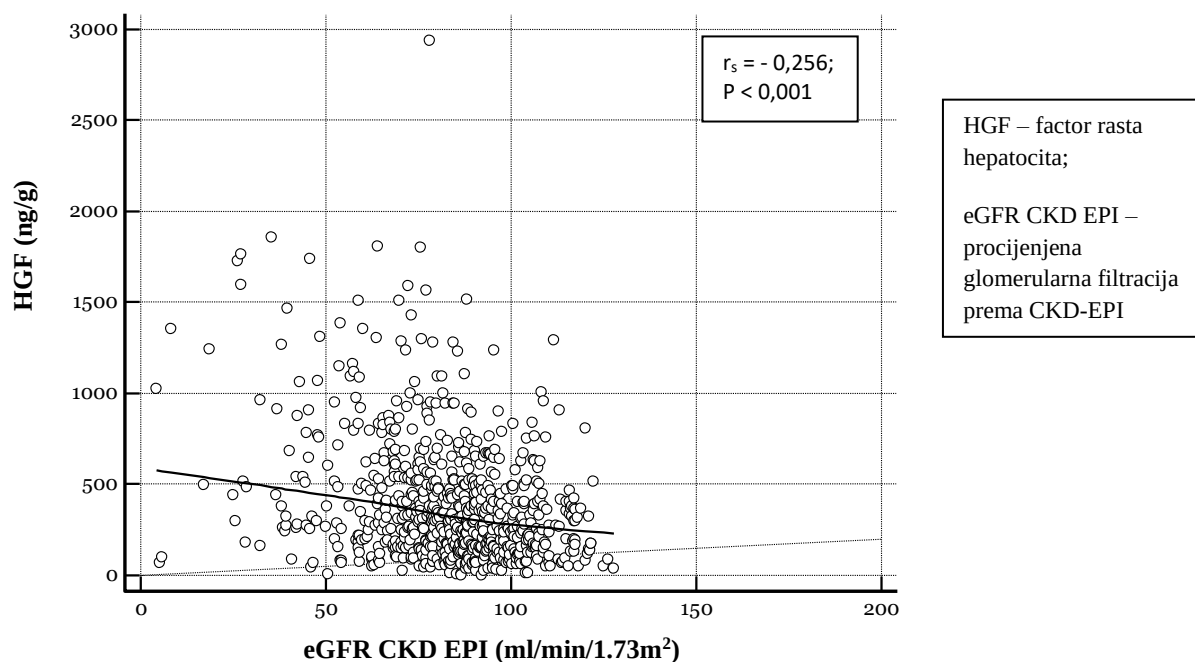
Slika 12. Krivulja povezanosti HGF i sistoličkoga arterijskog tlaka

Zatim smo promatrali povezanost novih tubularnih biljega s dosadašnjim parametrima bubrežnoga oštećenja – eGFR, ACR i α 1MCR. Kao što je već ranije navedeno, IP-10 nije bio povezan s niti jednim navedenim parametrom.

Procijenjena glomerularna filtracija bila je slabo negativno povezana s HGF-om ($r_s = -0,256$; $P < 0,001$) i s KIM-1 ($r_s = -0,237$; $P < 0,001$). Pravci odnosno krivulje povezanosti za navedene parametre prikazani su na slikama 13 i 14. Prema raspodjeli podataka na navedenim grafovima vidljiva je disperzija podataka te možemo zaključiti da bi povezanost između KIM i HGF s jedne strane te eGFR CKD EPI s druge strane zasigurno bila veća da smo iz analize isključili ekstremne rezultate.

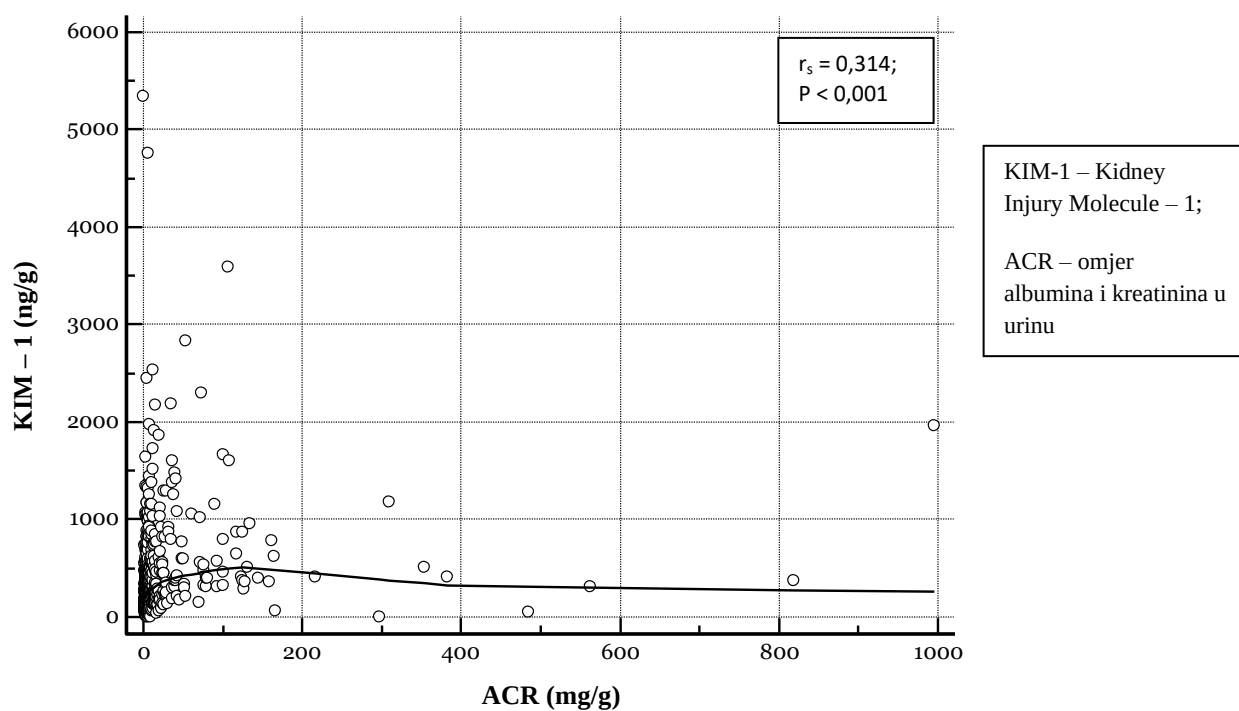


Slika 13. Krivulja povezanosti KIM-1 i eGFR CKD EPI

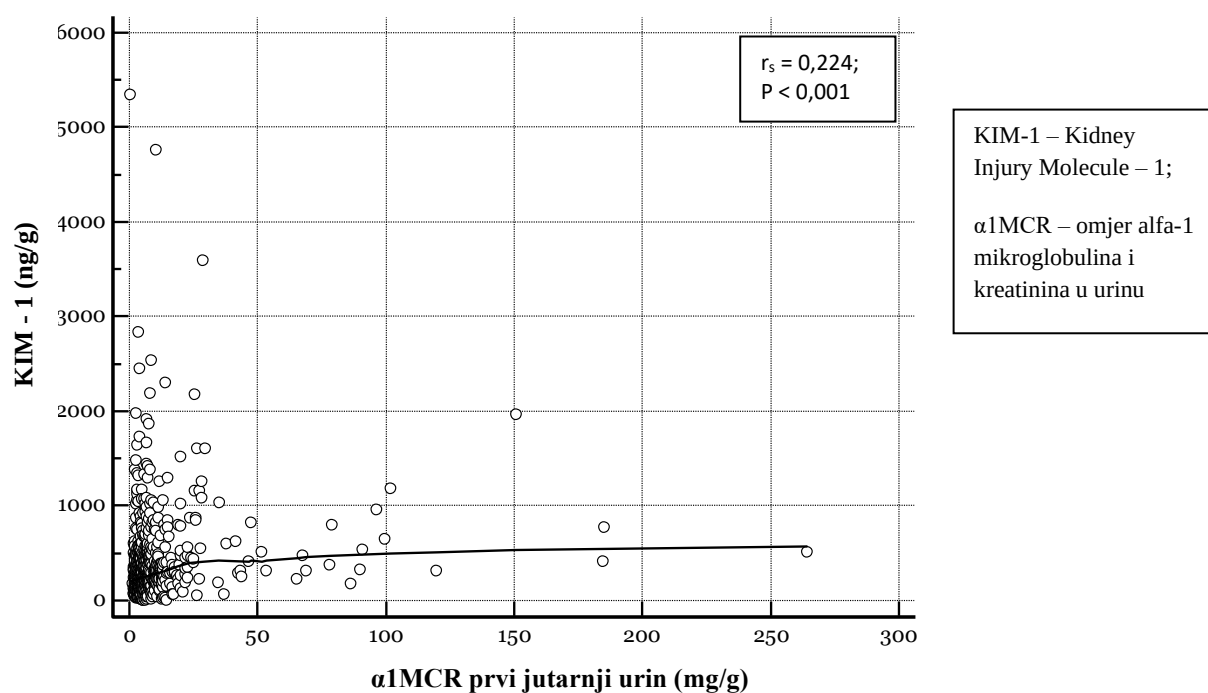


Slika 14. Krivulja povezanosti HGF i eGFR CKD EPI

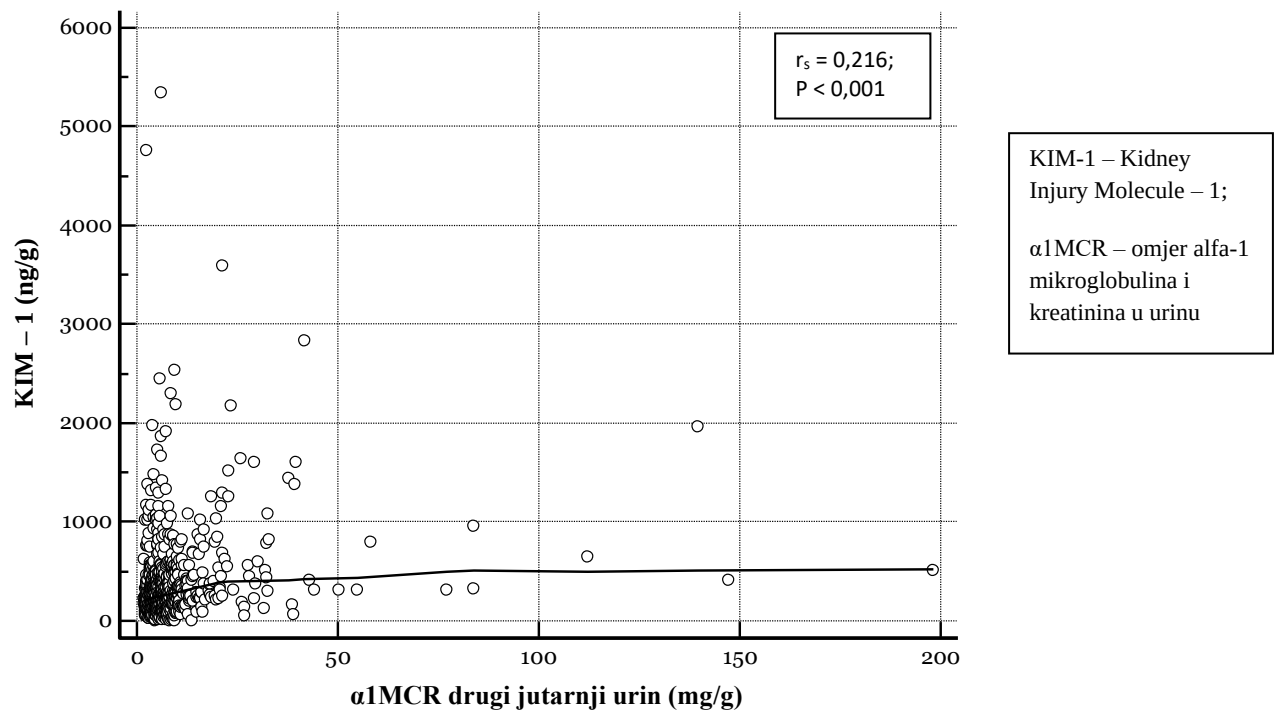
Slično se zapaža i za ostala dva tradicionalna biljega bubrežnoga oštećenja ACR i α 1MCR. ACR je bio pozitivno povezan s KIM-1 ($r_s = 0,314$; $P < 0,001$) i slabo pozitivno povezan s HGF ($r_s = 0,268$; $P < 0,001$). α 1MCR kao biljeg tubularnoga bubrežnog oštećenja bio je pozitivno povezan s HGF, i to više α 1MCR određen iz drugoga jutarnjeg urina (α 1MCR iz prvoga jutarnjeg urina $r_s = 0,265$; $P < 0,001$; α 1MCR iz drugoga jutarnjeg urina $r_s = 0,399$; $P < 0,001$). Vrlo slaba povezanost dobivena je za α 1MCR i KIM-1 (α 1MCR iz prvoga jutarnjeg urina $r_s = 0,224$; $P < 0,001$; α 1MCR iz drugoga jutarnjeg urina $r_s = 0,216$; $P < 0,001$). Međutim kao i u slučaju procijenjene glomerularne filtracije i na krivuljama povezanosti za ove parametre možemo primijetiti rasap podataka koji zasigurno umanjuje povezanost navedenih parametara zbog nekolicine ekstremnih rezultata. Kao što je vidljivo za ACR i α 1MCR iz oba uzorka urina nagib krivulje odnosno povezanost navedenih parametara s KIM-1 i HGF je puno veća kad se promatra početni dio krivulje oko kojeg je grupirana većina rezultata, dok nekolicina ekstremnih rezultata navedenih parametara smanjuje povezanost i mijenja nagib pravca odnosno krivulje. Krivulje povezanosti ACR i α 1MCR s KIM-1 i HGF prikazani su na slikama 15-20.



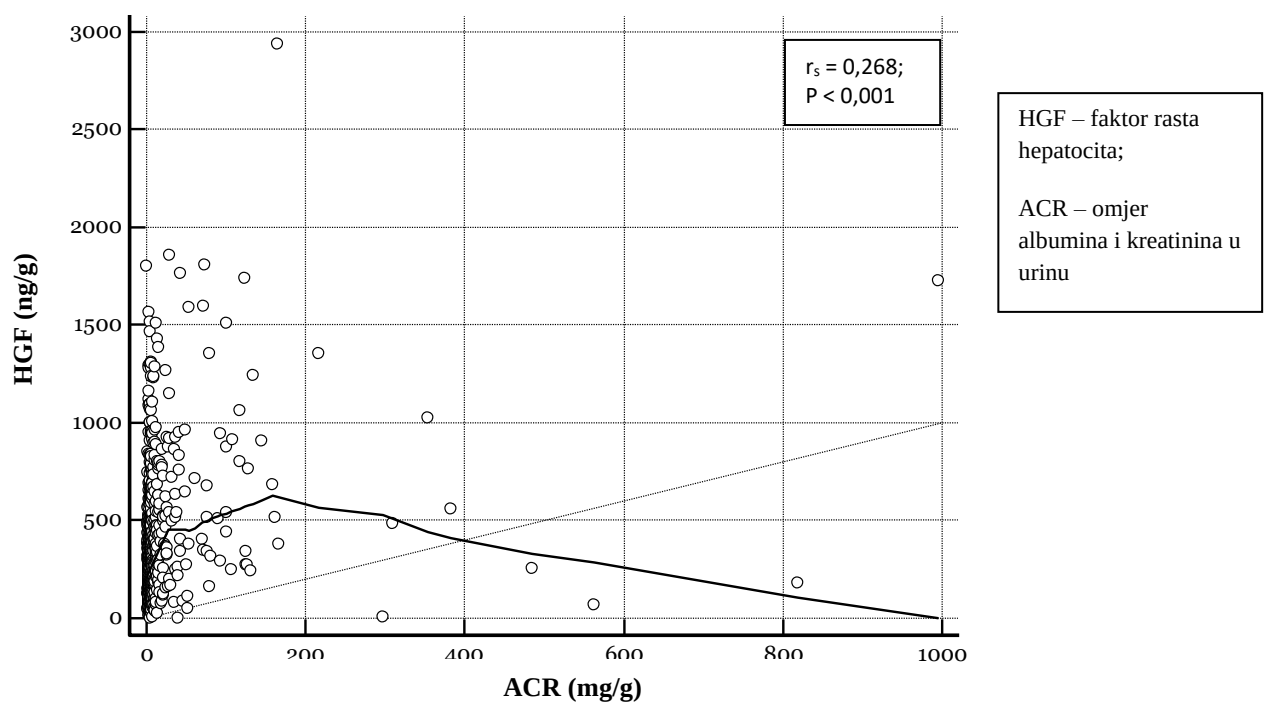
Slika 15. Krivulja povezanosti KIM-1 i ACR



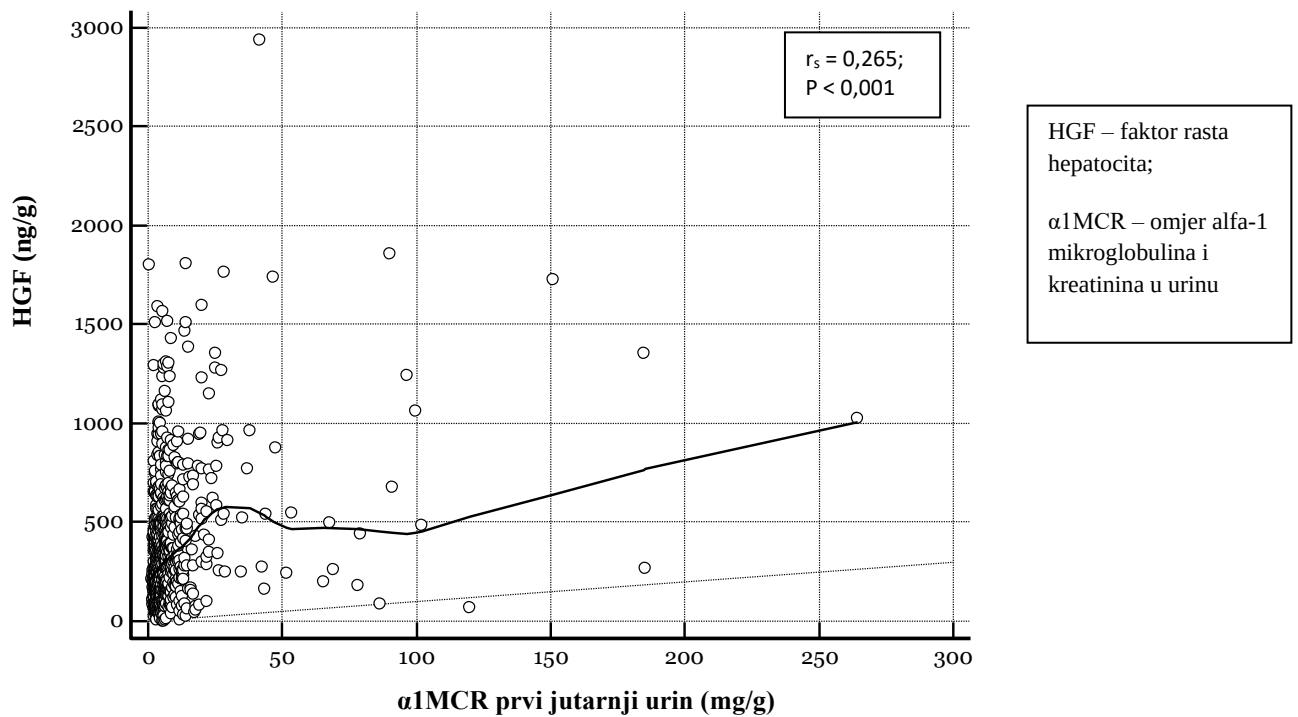
Slika 16. Krivulja povezanosti KIM-1 i $\alpha 1$ MCR iz prvoga jutarnjeg urina



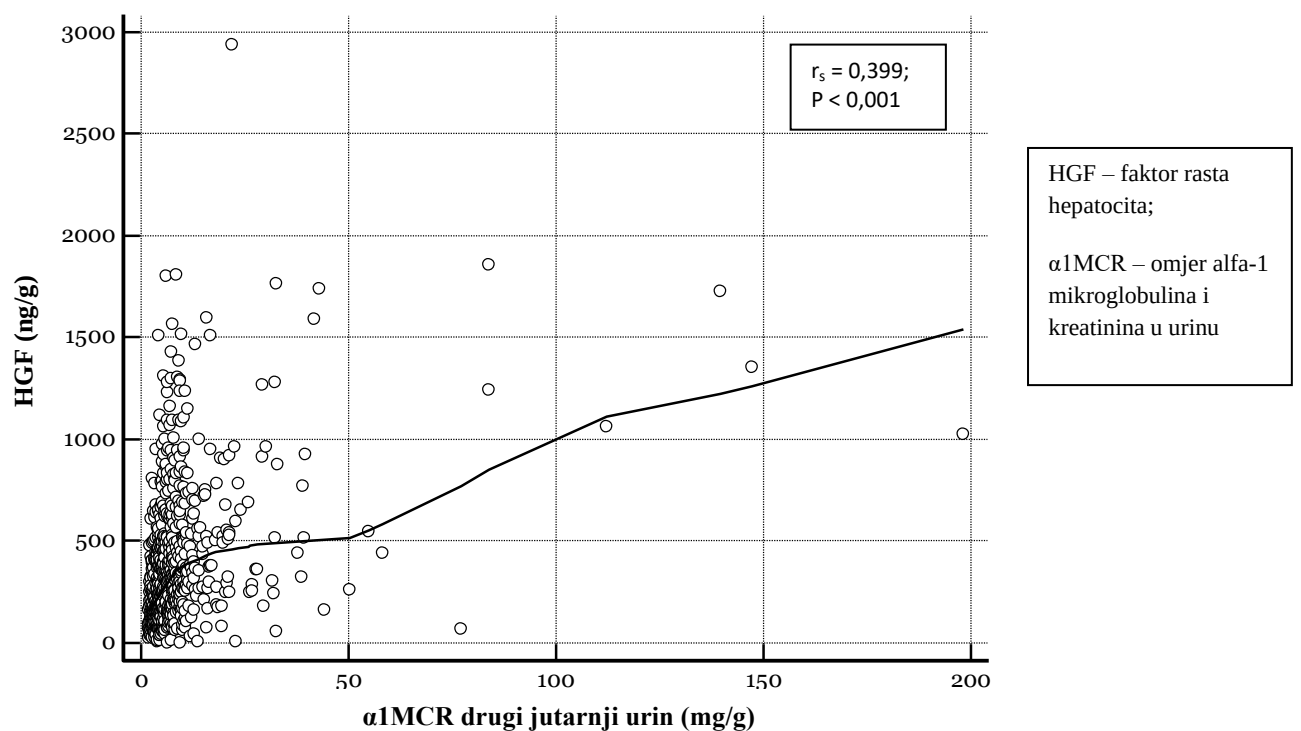
Slika 17. Krivulja povezanosti KIM-1 i $\alpha 1$ MCR iz drugoga jutarnjeg urina



Slika 18. Krivulja povezanosti HGF i ACR



Slika 19. Krivulja povezanosti HGF i $\alpha 1$ MCR iz prvoga jutarnjeg urina



Slika 20. Krivulja povezanosti HGF i $\alpha 1$ MCR iz drugoga jutarnjeg urina

U tablici 22 prikazana je analiza povezanosti novih biljega međusobno na uzorku cijele ispitivane populacije. Pozitivna povezanost postoji jedino između KIM-1 i HGF.

Tablica 22. Međusobna povezanost novih biljega bubrežne bolesti

Ispitivana varijabla		HGF	IP-10
KIM-1	r_s	0,389	0,237
	P	<0,001	<0,001
	N	708	708
HGF	r_s		0,145
	P		<0,001
	N		708

KIM - Kidney injury molecule 1; HGF – faktor rasta hepatocita; IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10; r_s – Spearmanov koeficijent korelacije; P – statistička vjerojatnost

S obzirom na vrlo slabu povezanost novih tubularnih biljega bubrežnoga oštećenja KIM-1 i HGF, a izostanak povezanosti IP-10, s dobi i sistoličkim tlakom, kao i izostanak povezanosti sva tri biljega s glukozom u plazmi, dobivene statistički značajno više vrijednosti biljega KIM-1 i HGF u „Bolesnih i sumnjivih“ u odnosu na sve preostale ispitanike ne možemo tumačiti izmjerenim višim vrijednostima sistoličkoga arterijskog tlaka, starijom dobi i klinički zanemarivo višim vrijednostima glukoze u plazmi u ovoj podskupini bolesnika. S obzirom na nenormalnu raspodjelu bubrežnih parametara do sada prikazani rezultati učinjeni su neparametrijskim statističkim analizama kojima se ne može učiniti prilagodba za kovarijate, ali analizama povezanosti praktički smo isključili njihov mogući utjecaj.

Ipak, kako bismo formalno isključili mogući utjecaj dobi, sistoličkoga arterijskog tlaka i glukoze na dobivene razlike u novim tubularnim biljezima učinili smo dodatnu statističku analizu. Kao što je čest slučaj u literaturi (99,109,158,159,160), logaritmirali smo podatke po bazi prirodnoga logaritma čime smo dobili pravilnu raspodjelu podataka koja nam je omogućila analizu parametrijskim metodama uz prilagodbu za relevantne kovarijate. Učinjen je t test za razlike između endemske i kontrolne skupine te analiza varijance za endemske podskupine (po „Bračkoj“ i po modificiranoj SZO klasifikaciji) i kontrolnu skupinu nakon prilagodbe za dob, sistolički tlak, glukozu, pušenje i obiteljsku anamnezu.

Parametrijskom analizom novih tubularnih biljega KIM-1, HGF i IP-10 (ANOVA, logaritmirani podatci) uočeni su rezultati jednaki onima dobivenim neparametrijskom analizom. Nije bilo razlike u vrijednostima KIM-1 između endemske i kontrolne skupine.

Prema „Bračkoj“ klasifikaciji, značajno više vrijednosti KIM-1 imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na sve preostale skupine ($F = 6,310$; svi $P < 0,001$), dok između ostalih skupina nije bilo razlike. Također, iste smo rezultate za KIM-1 dobili i prema modificiranoj SZO klasifikaciji ($F = 4,322$; svi $P < 0,001$).

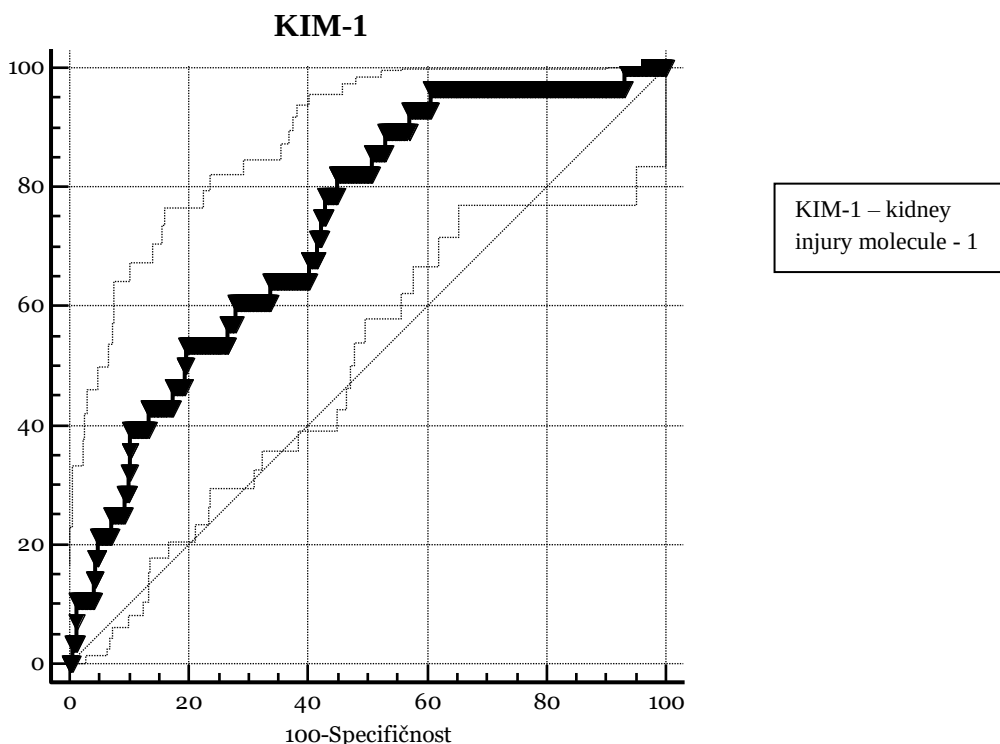
Nadalje, nije bilo razlike u HGF između endemske i kontrolne skupine. Prema „Bračkoj“ klasifikaciji značajno više vrijednosti HGF imali su „bolesni i sumnjivi“ u odnosu na sve preostale skupine ($F = 4,378$; $P = 0,005$), dok između ostalih skupina nije bilo razlike. Iste smo rezultate za HGF dobili i prema modificiranoj SZO klasifikaciji ($F = 4,324$; $P = 0,005$).

Kao i neparametrijskom analizom, više su vrijednosti biljega IP-10 registrirane u endemskih ispitanika u odnosu na kontrolne ($t = -2,310$; $P = 0,021$). Međutim, analizom po endemskim podskupinama prema „Bračkoj“ klasifikaciji i kontrolnoj skupini nije bilo značajne razlike u biljegu IP-10 između ispitivane četiri skupine ($F = 2,237$; $P = 0,083$). Isto tako, razlike nije bilo niti između ove četiri skupine u slučaju kasifikacije po modificiranoj SZO klasifikaciji ($F = 2,527$; $P = 0,056$).

5.6. ROC analize

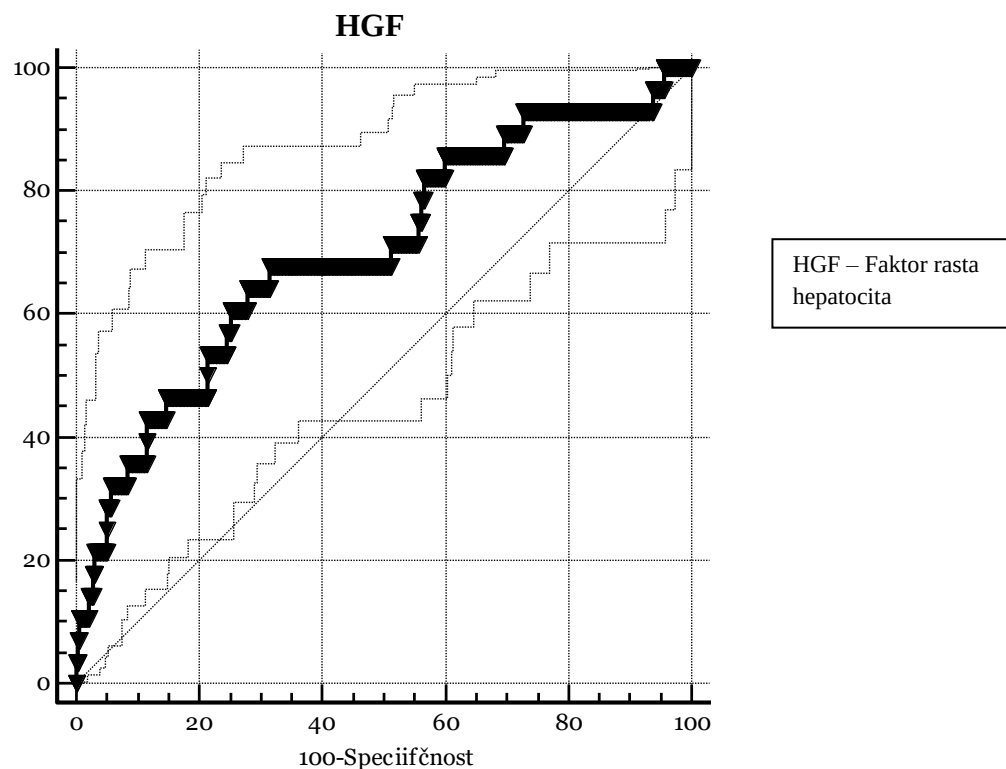
S obzirom na dobivene značajno povišene vrijednosti biljega KIM-1 i HGF u „Bolesnih i sumnjivih“ željeli smo utvrditi imaju li ova dva biljega moguću ulogu u dijagnostičkom algoritmu za endemsku nefropatiju te smo testirali njihovu osjetljivost i specifičnost kao dijagnostičkog testa za endemsku nefropatiju. S obzirom da nije bilo razlike u biljegu IP-10 analizirajući međusobno pojedine endemske podskupine i kontrolne ispitanike, kao niti između skupina endemskih ispitanika podijeljenih prema α 1MCR, nije bilo potrebe niti učiniti ROC analizu za IP-10 jer je već iz dosadašnjih rezultata jasno da nema dijagnostičku vrijednost u algoritmu za EN.

Učinjena je ROC analiza KIM-1 kao biljega endemske nefropatije. Najveća osjetljivost i specifičnost utvrđena je za koncentraciju od 293,95 ng/g kreatinina. Kada je učinjena analiza s obzirom na vrijednosti ispod i iznad navedene koncentracije, postojala je osjetljivost od 82,1% i specifičnost od 55,1% (površina ispod krivulje = 0,733; $Z = 5,194$; $P < 0,001$). Omjer šansi (OR) da osoba koja ima koncentraciju KIM-1 veću od 293,95 ng/g kreatinina oboli od EN po „Bračkoj“ klasifikaciji je 5,656 (95% IP = 2.1251-15.0524; $Z = 3.469$; $p = 0.0005$), slika 21.



Slika 21. ROC krivulja KIM-1 za endemsku nefropatiju

Učinjena je ROC analiza HGF-a kao biljega bolesti. Najveća osjetljivost i specifičnost utvrđena je za koncentraciju od 482,68 ng/g kreatinina. Kada je učinjena analiza s obzirom na vrijednosti ispod i iznad navedene koncentracije, postojala je osjetljivost od 64,3% i specifičnost od 72,2% (površina ispod krivulje = 0,702; $Z = 3,580$; $P < 0,001$). Omjer šansi da osoba koja ima koncentraciju HGF veću od 482,68 ng/g kreatinina oboli od EN po „Bračkoj“ klasifikaciji je OR 4,667 (95% IP = 2,116 – 10,293; $Z = 3,817$; $P < 0,001$), slika 22.



Slika 22. ROC krivulja HGF za endemsku nefropatiju

5.7. Biljezi oštećenja proksimalnoga tubula i pogoršanje bubrežne funkcije

U ovom longitudinalnom dijelu istraživanja analizirali smo podatke za ispitanike koji su se odazvali kontrolnom pregledu nakon sedam godina. Od polaznih 978 ispitanika isključeno je 228 ispitanika zbog razloga navedenih na slici 6, 72 ispitanika su umrla, a 260 ispitanika nije bilo dostupno (36 se odselilo, 48 odbilo sudjelovati, 176 je aktualno bilo izvan mjesta prebivališta). Na taj smo način došli do ukupnog broja od 418 ispitanika koji su se odazvali kontrolnom pregledu što uz 72 umrla čini 65,3%.

Među ispitanicima koji su se odazvali kontrolnom pregledu bilo je značajno više žena, ispitanici su bili mlađe dobi te nešto nižih vrijednosti sistoličkoga i dijastoličkoga tlaka. Nije bilo razlike između ove dvije skupine ispitanika s obzirom na indeks tjelesne mase i opseg struka (tablica 23).

Tablica 23. Razlika između ispitanika koji su se odazvali kontrolnom pregledu nakon 7 godina i onih koji se nisu odazvali

	ISPITANICI U PRAĆENJU	ISPITANICI KOJI NISU U PRAĆENJU	STATISTIKA	P
SPOL (M/Ž) n (%)	160/315 (33,7/66,3%)	212/274 (43,6/56,4%)	$\chi^2 = 9,998$	0,002
DOB (godine) C (25P-75P)	49 (40-61)	58 (41-73)	U = -6,153	<0,001
SISTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK (mmHg) C (25P-75P)	140 (129-160)	150 (134-170)	U = -4,4480	<0,001
DIJASTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK (mmHg) C (25P-75P)	85 (78-93)	87 (80-96)	U = -2,019	0,043
INDEKS TJELESNE MASE (kg/m²) C (25P-75P)	27,18 (24,06-30,96)	27,18 (23,61-31,21)	U = 0,192	0,848
OPSEG STRUKA (cm) C (25P-75P)	95 (86-104)	98 (87-106)	U = -1,697	0,090

χ^2 – chi kvadrat test; U – vrijednosti Mann-Whitneyevog testa; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila;
P – statistička vjerojatnost

Analizirajući pokazatelje bubrežne funkcije kao i nove tubularne biljege utvrdili smo značajne razlike između ove dvije skupine ispitanika (tablica 24). Ispitanici koji su se odazvali kontrolnom pregledu nakon sedam godina imali su bazalno nešto niže vrijednosti kreatinina i posljedično više vrijednosti procijenjene glomerularne filtracije, imali su niži ACR i niži

α 1MCR, te niže vrijednosti biljega KIM-1 i HGF u odnosu na ispitanike koji se nisu odazvali. Nije bilo razlike između ispitanika s obzirom na biljeg IP-10.

Tablica 24. Razlika u laboratorijskim pokazateljima između ispitanika koji su se odazvali kontrolnom pregledu nakon 7 godina i onih koji se nisu odazvali

	ISPITANICI U PRAĆENJU C (25P-75P)	ISPITANICI KOJI NISU U PRAĆENJU C (25P-75P)	U	P
KREATININ (μ mol/L)	76,44 (69,79-86,89)	82,62 (72,64-97,34)	-6,362	<0,001
eGFR CKD EPI (ml/min/1.73m ²)	86,09 (75,38-96,23)	78,99 (59,81-94,25)	-5,673	<0,001
ACR (mg/g)	5,33 (3,83-8,30)	7,93 (4,50-24,60)	-8,008	<0,001
α1MCR (prvi jutarnji)(mg/g)	5,36 (3,82-7,63)	8,19 (4,72-17,39)	-9,302	<0,001
α1MCR (drugi jutarnji)(mg/g)	6,22 (4,20-9,36)	9,18 (5,33-16,84)	-8,607	<0,001
GUP (mmol/L)	5,00 (4,60-5,60)	5,20 (4,70-5,80)	-3,322	0,001
KIM-1 (ng/g)	250,15 (143,77-418,31)	310,46 (170,26-555,36)	-3,826	<0,001
HGF (ng/g)	316,51 (160,48-502,45)	375,27 (196,98-673,89)	-3,678	<0,001
IP-10 (ng/g)	19,87 (7,87-48,08)	22,03 (7,62-60,85)	-0,887	0,375

eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKD-EPI formuli; ACR – albumin/kreatinin omjer u urinu; α 1MCR – alfa-1 mikroglobulin/kreatinin omjer u urinu; GUP – glukoza u plazmi; KIM-1 – kidney injury molecule – 1; HGF – faktor rasta hepatocita; IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10; C – medijan; 25. i 75.P. – 25. i 75. percentila; U – vrijednosti Mann-Whitneyevog testa; P – statistička vjerojatnost

Na tablici 25 prikazana je inicijalna raspodjela prema stadijima kronične bubrežne bolesti (88) za ispitanike koji su se odazvali kontrolnom pregledu. Većina ispitanika (89,7%) nalazila se inicijalno u stadijima G1A1 i G2A1 odnosno nisu imali elemente kronične bubrežne bolesti. Tek 24 ispitanika (5,74%) imala su inicijalno eGFR CKD EPI < 60 ml/min/1.73m². Albuminuriju > 30 mg/g imao je 21 ispitanik odnosno 5,02%. Uz to su, kao što je već navedeno,

bili i mlađi, što sve govori u prilog da su ispitanici čiji smo klinički tijek pratili bili „zdraviji“. To objašnjava i niže vrijednosti novih biljega KIM-1 i HGF koje smo dobili u ovom istraživanju.

Tablica 25. Inicijalna raspodjela prema stadijima kronične bubrežne bolesti za ispitanike koji su se odazvali kontrolnom pregledu

Stadiji kronične bubrežne bolesti				ACR kategorije		
				<30 mg/g	30-300 mg/g	≥300 mg/g
				A1	A2	A3
eGFR CKD EPI kategorije (ml/min/1.73m ²)	≥ 90	*G1	N (%)	161 (38,52%)	5 (1,20%)	0 (0,0%)
	60-89	G2	N (%)	214 (51,20%)	13 (3,11%)	1 (0,24%)
	45-59	G3a	N (%)	20 (4,78%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	30-44	G3b	N (%)	2 (0,48%)	1 (0,24%)	0 (0,0%)
	15-29	G4	N (%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,24%)
	< 15	G5	N (%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

*G – stadij; eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKD-EPI formuli; ACR – albumin/kreatinin omjer

Na slici 26 prikazana je raspodjela ispitanika prema stadijima kronične bubrežne bolesti nakon sedam godina praćenja.

U trenutku kontrolnoga pregleda nakon sedam godina u stadijima G1A1 i G2A2 bilo je 83,7% ispitanika, dok je 38 ispitanika (9,09%) imalo eGFR CKD EPI < 60 ml/min/1.73m². Albuminuriju > 30 mg/g nakon sedam godina imao je 41 ispitanik odnosno 9,81%.

Tablica 26. Raspodjela prema stadijima kronične bubrežne bolesti nakon 7 godina za ispitanike koji su se odazvali kontrolnom pregledu

Stadiji kronične bubrežne bolesti				ACR kategorije		
				<30 mg/g	30-300 mg/g	≥300 mg/g
				A1	A2	A3
eGFR CKD EPI kategorije (ml/min/1.73m ²)	≥ 90	*G1	N (%)	204 (48,80)	8 (1,91)	0 (0,0)
	60-89	G2	N (%)	146 (34,93)	18 (4,31)	4 (0,96)
	45-59	G3a	N (%)	20 (4,78)	3 (0,72)	0 (0,0)
	30-44	G3b	N (%)	7 (1,67)	3 (0,72)	1 (0,24)
	15-29	G4	N (%)	0 (0,0)	1 (0,24)	2 (0,48)
	< 15	G5	N (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,24)

*G – stadij; eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKD-EPI formuli; ACR – albumin/kreatinin omjer

5.7.1. Novonastala kronična bubrežna bolest u sedmogodišnjem periodu

Novonastala kronična bubrežna bolest definirana je procijenjenom glomerularnom filtracijom (eGFR CKD EPI) < 60 ml/min/1.73m² nakon sedam godina praćenja. Od 418 ispitanika koji su se odazvali kontrolnom pregledu nakon sedam godina bilo je ukupno 20 ispitanika (4.8%) s novonastalom kroničnom bubrežnom bolesti od čega su petero bili dijabetičari (25%). Prosječni pad eGFR u ovoj skupini ispitanika u sedmogodišnjem periodu iznosio je 23,87 ml/min/1.73m².

Binarnom logističkom regresijom analizirana je mogućnost predviđanja razvoja novonastale kronične bubrežne bolesti na temelju vrijednosti pojedinih biljega bubrežnoga oštećenja.

Analizirana je prediktivna vrijednost sistoličkoga arterijskog tlaka, procijenjene glomerularne filtracije, omjera albumina i kreatinina u urinu, omjera alfa-1 mikroglobulina i kreatinina u uzorku prvoga i drugoga jutarnjeg urina, te novih biljega tubularnoga oštećenja KIM-1, HGF i IP-10 pojedinačno te sva tri u zajedničkom modelu. Analizirana je linearnost, povezanost navedenih biljega i multikolinearnost. Zbog tek malog broja podataka koji su nedostajali pozornost je obraćena na veličinu standardne pogreške.

SISTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK

U analizu je uključeno 416 ispitanika. Model je bio statistički značajan, $\chi^2 = 22,484$; $P < 0,001$, čak 16,4% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale kronične bubrežne bolesti moglo bi se objasniti utjecajem vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka (tablica 27).

Tablica 27. Prediktivna vrijednost sistoličkoga arterijskog tlaka za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
Sistolički arterijski tlak (mm Hg)	0,042	0,009	21,112	1	<0,001	1,042	1,024	1,061
Konstanta	-9,524	1,545	38,020	1	<0,001	<0,001		
$R^2 = 0,053$ (Cox & Snell), $0,164$ (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 22,484$, $P = < 0,001$.								

B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

BAZALNA PROCIJENJENA GLOMERULARNA FILTRACIJA

Učinjena je binarna logistička regresija kako bi se ispitala mogućnost predviđanja novonastale kronične bubrežne bolesti na temelju vrijednosti bazalne eGFR. U analizu je uključeno 418 ispitanika. Model je bio statistički značajan: $\chi^2 = 14,633$; $P < 0,001$, čak 10,8% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale kronične bubrežne bolesti moglo bi se objasniti pomoću eGFR-a (tablica 28).

Tablica 28. Prediktivna vrijednost bazalne eGFR-a za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
eGFR CKD EPI (mL/min1,73m²)	-0,054	0,014	14,112	1	<0,001	0,948	0,922	0,975
Konstanta	1,284	1,079	1,416	1	0,234	3,612		
$R^2 = 0,034$ (Cox & Snell), $0,108$ (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 14,633$, $P < 0,001$.								

eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKE EPI formuli; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

OMJER ALBUMINA I KREATININA U URINU

U analizu je uključeno 416 ispitanika. Model nije bio statistički značajan, $\chi^2 = 2,318$; $P = 0,128$, samo 1,7% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale kronične bubrežne bolesti moglo bi se objasniti utjecajem omjera albumina i kreatinina u urinu (tablica 29).

Tablica 29. Prediktivna vrijednost omjera albumina i kreatinina u urinu za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
ACR (mg/g)	0,004	0,003	2,948	1	0,086	1,004	0,999	1,009
Konstanta	-3,068	0,238	165,930	1	<0,001	0,047		
$R^2 = 0,006$ (Cox & Snell), 0,017 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 2,318$, $P = 0,128$.								

ACR – albumin/kreatinin omjer; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

OMJER ALFA-1 MIKROGLOBULINA I KREATININA U PRVOM JUTARNJEM URINU

U analizu je uključeno 416 ispitanika. Model nije bio statistički značajan, $\chi^2 = 0,991$; $P = 0,320$, samo 0,7% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale kronične bubrežne bolesti moglo bi se objasniti utjecajem omjera alfa 1 mikroglobulina i kreatinina u uzorku prvoga jutarnjeg urina (tablica 30).

Tablica 30. Prediktivna vrijednost $\alpha 1$ MCR u uzorku prvog jutarnjeg urina za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
$\alpha 1$MCR - prvi jutarnji urin(mg/g)	0,014	0,012	1,378	1	0,241	1,014	0,991	1,038
Konstanta	-3,094	0,252	151,247	1	<0,001	0,045		
$R^2 = 0,002$ (Cox & Snell), 0,007 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 0,991$, $P = 0,320$.								

$\alpha 1$ MCR – omjer alfa-1 mikroglobulina i kreatinina; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

OMJER ALFA-1 MIKROGLOBULINA I KREATININA U DRUGOM JUTARNJEM URINU

U analizu je uključeno 414 ispitanika. Model nije bio statistički značajan, $\chi^2 = 2,679$; $P = 0,102$, samo 2% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale kronične bubrežne bolesti moglo bi se objasniti utjecajem $\alpha 1\text{MCR}$ u uzorku drugoga jutarnjeg urina (tablica 31).

Tablica 31. Prediktivna vrijednost $\alpha 1\text{MCR}$ u uzorku drugog jutarnjeg urina za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
$\alpha 1\text{MCR}$ - drugi jutarnji (mg/g kreatinina) (urin)	0,040	0,022	3,296	1	0,069	1,041	0,997	1,087
Konstanta	-3,322	0,311	113,821	1	<0,001	0,036		
$R^2 = 0,006$ (Cox & Snell), 0,020 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 2,679$, $P = 0,102$.								

$\alpha 1\text{MCR}$ – omjer alfa-1 mikroglobulina i kreatinina; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

NOVI TUBULARNI BILJEZI

Učinjena je analiza prediktivne vrijednosti svakoga pojedinog biljega za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest te potom model sa sva tri biljega zajedno. U analizu je uključeno 416 ispitanika.

KIM-1

Analizirajući prediktivnu vrijednost biljega KIM-1 za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest, model nije bio statistički značajan: $\chi^2 = 0,952$; $P = 0,329$, samo 0,07% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale bubrežne bolesti moglo bi se objasniti utjecajem vrijednosti KIM-1 (tablica 32).

Tablica 32. Prediktivna vrijednost KIM-1 za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
KIM - 1 (ng/g)	<0,001	<0,001	1,221	1	0,269	1,000	1,000	1,001
Konstanta	-3,136	0,276	128,993	1	<0,001	0,043		
$R^2 = 0,002$ (Cox & Snell), 0,007 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 0,952$, $P = 0,329$.								

KIM – 1 – *Kidney Injury Molecule – 1*; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

HGF

Analizirajući prediktivnu vrijednost HGF za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest, model je bio statistički značajan: $\chi^2 = 4,750$; $P = 0,029$, 3,5% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale bubrežne bolesti moglo bi se objasniti utjecajem biljega (tablica 33).

Tablica 33. Prediktivna vrijednost biljega HGF za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
HGF (ng/g)	0,001	0,001	5,481	1	0,019	1,001	1,000	1,002
Konstanta	-3,588	0,380	89,292	1	0,000	0,028		
$R^2 = 0,011$ (Cox & Snell), 0,035 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 4,750$, P = 0,029 .								

HGF – faktor rasta hepatocita; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

Budući da je dobivena prediktivna vrijednost HGF za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest, željeli smo utvrditi ostaje li ta prediktivna vrijednost i kada se modelu dodaju „tradicionalni“ prognostički biljezi kao što su bazalna eGFR i ACR.

Učinjena je binarna logistička regresija kako bi se ispitala mogućnost predviđanja novonastale kronične bubrežne bolesti temeljem kombinacije bazalne eGFR, ACR i HGF-a. Model je bio statistički značajan: $\chi^2 = 17,088$; $P = 0,001$, 12,6% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale kronične bubrežne bolesti moglo bi se objasniti utjecajem opisane kombinacije biljega (tablica 34). Međutim prognostičku vrijednost u navedenom modelu ima bazalna glomerularna filtracija dok prediktivna vrijednost HGF-a nestaje.

Tablica 34. Prediktivna vrijednost kombinacije eGFR, ACR i HGF za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
ACR (mg/g)	0,001	0,003	0,119	1	0,730	1,001	0,996	1,006
eGFR CKD EPI (mL/min1,73m²)	-0,049	0,015	9,996	1	0,002	0,952	0,924	0,982
HGF (ng/g)	0,001	0,001	2,713	1	0,100	1,001	1,000	1,002
Konstanta	0,443	1,265	0,123	1	0,726	1,557		
$R^2 = 0,040$ (Cox & Snell), 0,126 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 17,088$, P = 0,001								

ACR – albumin/kreatinin omjer; eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKD-EPI formuli; HGF – faktor rasta hepatocita; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

IP-10

Analizirajući prediktivnu vrijednost biljega IP-10 za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest, model nije bio statistički značajan: $\chi^2 = 3,731$; $P = 0,053$, samo 2,8% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale kronične bubrežne bolesti moglo bi se objasniti utjecajem biljega (tablica 35).

Tablica 35. Prediktivna vrijednost biljega IP-10 za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
IP-10 (ng/g)	0,002	0,001	4,345	1	0,037	1,002	1,000	1,003
Konstanta	-3,118	0,245	161,608	1	0,000	0,044		
$R^2 = 0,009$ (Cox & Snell), 0,028 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 3,731$, $P = 0,053$.								

IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

Model koji je uključivao sva tri biljega (KIM-1, HGF i IP-10) nije bio statistički značajan, $\chi^2 = 7,118$, $P = 0,068$, samo 5,3% (Nagelkerke R^2) varijance novonastale kronične bubrežne bolesti moglo bi se objasniti utjecajem biljega (tablica 36).

Tablica 36. Prediktivna vrijednost biljega KIM-1, HGF i IP-10 za otkrivanje novonastale kronične bubrežne bolesti

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
KIM-1 (ng/g)	<0,001	<0,001	<0,001	1	0,993	1,000	0,999	1,001
HGF (ng/g)	0,001	0,001	3,314	1	0,069	1,001	1,000	1,002
IP-10 (ng/g)	0,001	0,001	2,414	1	0,120	1,001	1,000	1,003
Konstanta	-3.615	0,385	87,952	1	<0,001	0,027		
$R^2 = 0,017$ (Cox & Snell), 0,053 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 7,118$, $P = 0,068$.								

KIM -1 – *Kidney Injury Molecule - 1*; HGF – faktor rasta hepatocita; IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

5.7.2. Pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu

Pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu definirano je padom procijenjene glomerularne filtracije (eGFR CKD EPI) > 2 ml/min/1.73m² godišnje odnosno ukupno za > 14 ml/min/1.73m² u sedmogodišnjem periodu. Od 418 ispitanika koji su se odazvali kontrolnom pregledu nakon 7 godina u 39 ispitanika (9.3%) ustanovili smo pogoršanje bubrežne funkcije od čega su petero bili dijabetičari. Prosječni pad eGFR u ovoj skupini ispitanika bio je 22,84 ml/min/1.73m².

Binarnom logističkom regresijom analizirana je mogućnost predviđanja pogoršanja bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu s obzirom na bazalne vrijednosti biljega bubrežnoga oštećenja. Analizirana je prediktivna vrijednost sistoličkoga arterijskog tlaka, procijenjene glomerularne filtracije, omjera albumina i kreatinina u urinu, omjera alfa-1 mikroglobulina i kreatinina u uzorku prvoga i drugoga jutarnjeg urina, novih biljega tubularnoga oštećenja KIM-1, HGF i IP-10 pojedinačno te sva tri u zajedničkom modelu. Analizirana je linearnost, povezanost navedenih biljega i multikolinearnost. Zbog tek malog broja podataka koji su nedostajali pozornost je obraćena na veličinu standardne pogreške.

SISTOLIČKI ARTERIJSKI TLAK

U analizu je uključeno 416 ispitanika. Model je bio statistički značajan, $\chi^2 = 8,803$; $P = 0,003$, 4,5% (Nagelkerke R^2) varijance pogoršanja bubrežne funkcije moglo bi se objasniti utjecajem vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka (tablica 37).

Tablica 37. Prediktivna vrijednost sistoličkog arterijskog tlaka za pogoršanje bubrežne funkcije

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
Sistolički arterijski tlak (mm Hg)	0,020	0,007	9,049	1	0,003	1,020	1,007	1,003
Konstanta	-5,222	1,027	25,842	1	<0,001	0,005		
$R^2 = 0,021$ (Cox & Snell), 0,045 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 8,803$, P = 0,003 .								

B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

BAZALNA PROCIJENJENA GLOMERULARNA FILTRACIJA (eGFR)

Učinjena je binarna logistička regresija kako bi se ispitao prediktivni utjecaj bazalne eGFR za pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu. U analizu je uključeno 418 ispitanika. Model nije bio statistički značajan: $\chi^2 = 0,824$; $P = 0,364$, samo 0,4% (Nagelkerke R^2) varijance pogoršanja bubrežne funkcije kroz 7 godina moglo bi se objasniti pomoću bazalne eGFR (tablica 38).

Tablica 38. Prediktivna vrijednost bazalne eGFR-a za pogoršanja bubrežne funkcije

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
eGFR CKD EPI (mL/min1,73m²)	-0,009	0,010	0,829	1	0,363	0,991	0,971	1,011
Konstanta	-1,469	0,889	2,729	1	0,099	0,230		
$R^2 = 0,002$ (Cox & Snell), 0,004 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 0,824$, $P = 0,364$.								

eGFR CKD EPI – procijenjena glomerularna filtracija prema CKD-EPI formuli; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

OMJER ALBUMINA I KREATININA U URINU

U analizu je uključeno 418 ispitanika. Model je bio statistički značajan, $\chi^2 = 16,561$; $P < 0,001$, čak 8,4% (Nagelkerke R^2) varijance pogoršanja bubrežne funkcije moglo bi se objasniti utjecajem omjera albumina i kreatinina (tablica 39).

Tablica 39. Prediktivna vrijednost omjera albumina i kreatinina u urinu za pogoršanje bubrežne funkcije

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
ACR (mg/g)	0,019	0,006	8,787	1	0,003	1,019	1,006	1,032
Konstanta	-2,552	0,197	167,193	1	<0,001	0,078		
$R^2 = 0,039$ (Cox & Snell), 0,084 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 16,561$, $P < 0,001$.								

ACR – albumin/kreatinin omjer; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

OMJER ALFA-1 MIKROGLOBULINA I KREATININA U PRVOM JUTARNJEM URINU

U analizu je uključeno 417 ispitanika. Model je bio statistički značajan, $\chi^2 = 12,788$; $P < 0,001$, 6,5% (Nagelkerke R^2) varijance pogoršanja bubrežne funkcije moglo bi se objasniti utjecajem omjera alfa 1 mikroglobulina i kreatinina u uzorku prvoga jutarnjeg urina (tablica 40).

Tablica 40. Prediktivna vrijednost omjera alfa 1 mikroglobulina i kreatinina u uzorku prvog jutarnjeg urina za pogoršanje bubrežne funkcije

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
$\alpha 1\text{MCR}$ - prvi jutarnji (mg/g) (urin)	0,083	0,030	7,796	1	0,005	1,086	1,025	1,151
Konstanta	-2,873	0,280	105,301	1	<0,001	0,057		
$R^2 = 0,030$ (Cox & Snell), 0,065 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 12,788$, $P < 0,001$.								

$\alpha 1\text{MCR}$ – alfa-1 mikroglobulin/kreatinin omjer; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

OMJER ALFA-1 MIKROGLOBULINA I KREATININA U DRUGOM JUTARNJEM URINU

U analizu je uključeno 414. Model je bio statistički značajan, $\chi^2 = 15,931$; $P < 0,001$, čak 8,1% (Nagelkerke R^2) varijance pogoršanja bubrežne funkcije moglo bi se objasniti utjecajem omjera alfa 1 mikroglobulina i kreatinina u uzorku drugoga jutarnjeg urina (tablica 41).

Tablica 41. Prediktivna vrijednost omjera alfa 1 mikroglobulina i kreatinina u uzorku drugog jutarnjeg urina za pogoršanje bubrežne funkcije

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
$\alpha 1\text{MCR}$ - drugi jutarnji (mg/g) (urin)	0,093	0,026	13,067	1	<0,001	1,097	1,043	1,153
Konstanta	-3,071	0,299	105,373	1	<0,001	0,046		
$R^2 = 0,038$ (Cox & Snell), 0,081 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 15,931$, $P < 0,001$.								

$\alpha 1\text{MCR}$ – alfa-1 mikroglobulin/kreatinin omjer; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

NOVI BILJEZI TUBULARNOGA OŠTEĆENJA

Učinjena je analiza prediktivne vrijednosti svakoga pojedinog biljega za pogoršanje bubrežne funkcije te potom model sa sva tri biljega zajedno. U analizu je uključeno 416 ispitanika.

KIM-1

Analizirajući prediktivnu vrijednost biljega KIM-1 za pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu, model nije bio statistički značajan: $\chi^2 = 1,117$; $P = 0,291$, samo 0,06% (Nagelkerke R^2) varijance pogoršanja bubrežne funkcije moglo bi se objasniti utjecajem vrijednosti KIM-1 (tablica 42).

Tablica 42. Prediktivna vrijednost KIM-1 za pogoršanje bubrežne funkcije

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
KIM - 1 (ng/g)	<0,001	<0,001	1,313	1	0,252	1,000	1,000	1,001
Konstanta	-2,395	0,206	134,752	1	<0,001	0,091		
$R^2 = 0,003$ (Cox & Snell), 0,006 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 1,117$, $P = 0,291$.								

KIM – 1 – *Kidney Injury Molecule -1*; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

HGF

Analizirajući prediktivnu vrijednost biljega HGF za pogoršanje bubrežne funkcije, model nije bio statistički značajan: $\chi^2 = 2,280$; $P = 0,131$, samo 1,2% (Nagelkerke R^2) varijance pogoršanja bubrežne funkcije moglo bi se objasniti utjecajem biljega HGF (tablica 43).

Tablica 43. Prediktivna vrijednost biljega HGF za pogoršanje bubrežne funkcije

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
HGF (ng/g)	0,001	0,000	2,472	1	0,116	1,001	1,000	1,002
Konstanta	-2,577	0,271	90,724	1	0,000	0,076		
$R^2 = 0,005$ (Cox & Snell), 0,012 (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 2,280$, $P = 0,131$.								

HGF – faktor rasta hepatocita; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

IP-10

Analizirajući prediktivnu vrijednost biljega IP-10 za pogoršanje bubrežne funkcije, model nije bio statistički značajan: $\chi^2 = 2,794$; $P = 0,097$, samo 1,4% (Nagelkerke R^2) varijance pogoršanja bubrežne funkcije moglo bi se objasniti utjecajem biljega IP-10 (tablica 44).

Tablica 44. Prediktivna vrijednost biljega IP-10 za pogoršanje bubrežne funkcije

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
IP-10 (ng/g)	0,001	0,001	3,014	1	0,083	1,001	1,000	1,003
Konstanta	-2,357	0,179	173,604	1	0,000	0,095		
$R^2 = 0,007$ (Cox & Snell), $0,014$ (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 2,794$, $P = 0,097$.								

IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

Model koji je uključivao sva tri biljega (KIM-1, HGF i IP-10) nije bio statistički značajan, $\chi^2 = 4,424$, $P = 0,219$, samo 2,3% (Nagelkerke R^2) varijance pogoršanja bubrežne funkcije bi se moglo objasniti utjecajem kombinacije biljega (tablica 45).

Tablica 45. Prediktivna vrijednost biljega KIM-1, HGF i IP-10 za pogoršanje bubrežne funkcije

	B	SE	Wald	df	P	Exp(B)	95% IP za Exp(B)	
							Donji	Gornji
KIM-1 (ng/g)	<0,001	<0,001	0,164	1	0,685	1,000	1,000	1,001
HGF (ng/g)	0,001	0,001	1,066	1	0,302	1,001	1,000	1,002
IP-10 (ng/g)	0,001	0,001	1,939	1	0,164	1,001	1,000	1,002
Konstanta	-2,619	0,275	90,907	1	<0,001	0,073		
$R^2 = 0,011$ (Cox & Snell), $0,023$ (Nagelkerke R^2). Model $\chi^2(1) = 4,424$, $P = 0,219$.								

KIM – 1 – *Kidney Injury Molecule – 1*; HGF – faktor rasta hepatocita; IP-10 – interferonom gama inducirani protein 10; B – koeficijent regresije, SE – standardna pogreška, df – stupnjevi slobode, P – statistička vjerojatnost, IP – interval pouzdanosti

6. RASPRAVA

Ovo je prvo istraživanje u kojemu su evaluirani novi biljezi oštećenja proksimalnoga tubula u endemskoj nefropatiji. U istraživanje je bilo uključeno 708 ispitanika, od toga je 550 ispitanika bilo iz endemskih sela te 158 ispitanika iz kontrolnih sela. S obzirom da smo u ovom istraživanju koristili i danas aktualne strože „Bračke“ kriterije (77) za klasifikaciju ispitanika iz endemskoga kraja, u ovom uzorku ispitanika prema navedenoj klasifikaciji značajno je manje oboljelih od endemske nefropatije odnosno sumnjivih da boluju od endemske nefropatije nego prema modificiranoj SZO klasifikaciji. S druge strane manji broj „Bolesnih“ i „Sumnjivih“ prema obje klasifikacije u skladu je s opažanjima da endemska nefropatija postupno, ali sigurno iščezava u većini endemskih žarišta. U ovom istraživanju udio „Bolesnih“ i „Sumnjivih“ značajno je manji od ranije opisivanih u literaturi, čak i u slučaju recentnih istraživanja koja ukazuju na iščezavanje bolesti (19,22,23). Dakle, manji broj „Bolesnih“ i „Sumnjivih“ u našem istraživanju dijelom je posljedica korištenja navedene „Bračke“ klasifikacije koja strože definira oboljele ispitanike i sumnjive da boluju od EN, dijelom prirodnoga tijeka bolesti, a manjim dijelom i zbog isključivanja ispitanika koji nisu pristali na davanje drugoga uzorka urina potrebnoga za određivanje urinarnih biljega ili isti nisu mogli dati zbog terminalnog bubrežnog zatajenja i anurije. U ovom istraživanju nismo određivali prevalenciju endemske nefropatije i pojedinih kategorija jer to nije bio randomizirani uzorak opće populacije endemskih sela. Budući da je oboljelih od endemske nefropatije i prema „Bračkoj“ i prema modificiranoj SZO klasifikaciji u ovom uzorku bilo vrlo malo, kako se „Sumnjivi“ smatraju predstadijem bolesti ili blažim oblicima endemske nefropatije (154), te kako su i u drugim istraživanjima ove dvije skupine već bile spajane (154,155), i u ovom istraživanju objedinili smo „Bolesne i sumnjive“ u jednu skupinu (slika 7 i 8).

Ispitanici iz kontrolnih sela bili su tri godine stariji od ispitanika iz endemskih sela (53 nasuprot 50 godina; $P = 0,035$) što zasigurno nije klinički relevantno. No unutar endemskih podskupina, kao i u dosadašnjim istraživanjima (19,22,23,24), „Bolesni i sumnjivi“ bili su značajno stariji u odnosu na sve ostale skupine te je medijan dobi u toj skupini bio 76 godina prema „Bračkoj“ klasifikaciji. Nije bilo razlike u dobi između „Rizičnih“ i „Ostalih“ odnosno kontrolne skupine. Kontrolna je skupina bila značajno starija od „Rizičnih“ i „Ostalih“ (53 nasuprot 50 odnosno 47 godine; $P = 0,025$ odnosno $P = 0,005$) što je sukladno ranijim istraživanjima (19). „Bolesni i sumnjivi“ značajno su dulje boravili u endemskim selima u odnosu na ostale podskupine, kao i u odnosu na kontrolnu skupinu, što indirektno govori o većoj vjerojatnosti ranije izloženosti uzročnom okolišnom agensu, tj. aristolohičnoj kiselini.

Promjenom klasifikacije endemske nefropatije dobiveni su drukčiji rezultati u odnosu na ranije izvještaje o pozitivnoj obiteljskoj anamnezi. Pozitivna obiteljska anamneza nije više klasifikacijski kriterij prema „Bračkoj“ klasifikaciji. Danas se umjesto toga upotrebljava podatak o boravku u endemskom kućanstvu dulje od 20 godina, a dodani su i novi kriteriji oboljelih poput karcinoma prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava koji ranije nije bio uključen. Koliko je raniji obavezan podatak o obiteljskoj anamnezi bio ograničavajući razabire se iz naših rezultata kako samo 50% „Bolesnih i sumnjivih“ ima pozitivnu obiteljsku anamnezu. To s opravdanjem pobuđuje pitanje nije li ranije učestalost „Bolesnih i sumnjivih“ bila veća. Ovo istraživanje započelo je 2008. godine kada su još vrijedili kriteriji modificirane SZO klasifikacije te se nije uzimao podatak o godinama provedenim u endemskom kućanstvu. Stoga je u ovom istraživanju, radi svrstavanja ispitanika u podskupine prema „Bračkoj“ klasifikaciji, boravak u endemskom kućanstvu > 20 godina definiran kao boravak u endemskom selu > 20 godina uz pozitivnu obiteljsku anamnezu što su ionako podudarni podatci za većinu stanovnika endemskih sela i kućanstava, a razlikuje se uglavnom kod onih koji mijenjaju sela i kućanstva bilo zbog selidbe ili ženidbe. Tako se oni ispitanici koji imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu, a nisu boravili u EN selu > 20 godina ne svrstavaju po definiciji u rizične pa sada određeni dio u skupini „Ostali“ (5.2%) ima pozitivnu obiteljsku anamnezu što prema modificiranoj SZO klasifikaciji nije slučaj. Karcinom prijelaznoga epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava dijagnosticiran je u devetoro ispitanika iz skupine „Bolesnih i sumnjivih“ prema „Bračkoj“ klasifikaciji što je bilo statistički, klinički i epidemiološki značajno više u odnosu na sve ostale skupine u kojima nije bilo niti jednog ispitanika s karcinomom. Ovi podatci sukladni su ranijim izvještajima i potvrđuju kako su ovi karcinomi, jednako kao i kronična tubulointersticijska nefropatija, sastavni dio *de facto* sindroma endemske nefropatije, a istovremeno dodatno potkrepljuju već odavno prihvaćenu hipotezu kako je aristolohična kiselina zajednički uzročnik oba entiteta.

Između stanovnika endemskih i kontrolnih sela nije postojala razlika u sistoličkom arterijskom tlaku, dok su nešto više vrijednosti dijastoličkoga arterijskog tlaka izmjerene u stanovnika endemskih sela. S druge strane, „Bolesni i sumnjivi“ imali su značajno više vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka u odnosu na sve endemske podskupine kao i kontrolne ispitanike (163mmHg nasuprot 145/140/143mmHg, $P < 0.001$). Nije neobično što su vrijednosti arterijskoga tlaka više u „Bolesnih“ jer su to ujedno i stariji bolesnici u uznapređovalim stadijima kronične bubrežne bolesti, ali podatci o višim vrijednostima izmjerenim u „Sumnjivih“ zavrjeđuje komentar. Već je u našim drugim istraživanjima opaženo

kako se izgubio raniji fenomen da je arterijska hipertenzija rjeđe prisutna u „Sumnjivih“ da boluju od EN. Dika i suradnici to su objasnili dijelom promjenama životnih navika – sve je više prisutan sjedilački način života, seljaci su deblji nego što su bili ranije, prehrana postaje sve sličnija urbanoj s velikim unosom kuhinjske soli, a uz to stanovnici ovih sela su lošijega socioekonomskog statusa i nižega stupnja obrazovanja (161).

Kontrolni ispitanici imali su nešto veći opseg struka u odnosu na endemske ispitanike što je također već ranije verificirano (162), no analizirajući podskupine najveći opseg struka imali su „Bolesni i sumnjivi“, a oni zajedno s „Rizičnim“ i kontrolnim ispitanicima imali su značajno veći opseg struka u odnosu na ispitanike u podskupini „Ostali“. To ne treba čuditi s obzirom da su ispitanici u podskupini „Ostali“ najmlađi.

Nije bilo razlike u koncentraciji glukoze u plazmi između ispitanika endemskih i kontrolnih sela. Međutim, statistički značajno više vrijednosti glukoze imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu prema svim ostalim podskupinama i kontrolnim ispitanicima (5.3mmol/L nasuprot 5.0/4.9/5.1mmol/L; svi $P < 0,005$) što s obzirom na same vrijednosti niti u našem presječnom, niti prospektivnom dijelu istraživanja ne može biti smatrano klinički značajnim. U lipidnim parametrima nije bilo razlika niti između skupina niti između podskupina. Očekivano najniže vrijednosti hemoglobina imali su „Bolesni i sumnjivi“ s obzirom da je anemija jedan od kriterija klasifikacije bolesti. Među „Rizičnim“, „Ostalim“ i kontrolnim ispitanicima nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima hemoglobina. Jednako tako, s obzirom da je bubrežna insuficijencija jedan od kriterija bolesti, najviše vrijednosti serumskoga kreatinina odnosno najniže vrijednosti procijenjene glomerularne filtracije imali su „Bolesni i sumnjivi“. Najviši omjer albumina i kreatinina u urinu imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na sve ostale ispitanike. Analizirali smo omjer alfa1-mikroglobulina i kreatinina iz prvoga i drugoga jutarnjeg urina te dobili podudarne rezultate neovisno o vremenu uzorkovanja urina. Zanimljiv rezultat jest kako su kontrolni ispitanici imali statistički značajno više vrijednosti omjera alfa-1 mikroglobulina i kreatinina u odnosu na ispitanike iz endemskih sela što je već i ranije zamijećeno (162). No te su vrijednosti značajno ispod graničnih vrijednosti za tubularnu proteinuriju i prema SZO i prema „Bračkim“ kriterijima (77) te prema svemu nemaju značajnost u dijagnostičkom postupku i klasifikaciji endemske nefropatije. Mogući uzroci bit će analizirani neovisno o ovom istraživanju jer izlaze iz okvira naše hipoteze i zadanih ciljeva, ali navodimo samo podatak kako bi se to dijelom moglo objasniti značajno mlađom dobi ispitanika u brojčano najvećim skupinama „Ostali“ i „Rizični“ u odnosu na kontrolne ispitanike. Međutim, gledajući endemske podskupine značajno više vrijednosti

omjera alfa-1 mikroglobulina i kreatinina u urinu imali su „Bolesni i sumnjivi“ u odnosu na „Rizične“, „Ostale“ i kontrolne ispitanike što je bilo i očekivano. Relativna volumna masa urina bila je najniža u „Bolesnih i sumnjivih“ što je također očekivano s obzirom da je endemska nefropatija tubulopatija s posljedičnim gubitkom sposobnosti koncentriranja mokraće. Relativna volumna masa urina nekada je bila jedan od kriterija za dijagnosticiranje EN. Između ostalih podskupina nema razlike u relativnoj volumnoj masi urina.

Prije rasprave o rezultatima vezanim uz nove biljege oštećenja proksimalnoga tubula potrebno je istaknuti još neke činjenice koje su važne jer mogu imati reperkusije na interpretaciju dobivenih rezultata. „Bolesni i sumnjivi“ bili su značajno stariji od svih ostalih, imali su značajno više vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka te nešto više vrijednosti glukoze u plazmi. Kako znamo da svi ovi parametri prema dostupnoj literaturi (109,158,159) mogu utjecati kako na bubrežnu bolest, tako i na vrijednosti istraživanih novih tubularnih biljega, analizirali smo povezanost dobi, sistoličkoga arterijskog tlaka i glukoze u plazmi s biljezima oštećenja proksimalnoga tubula. Nijedan od novih biljega nije bio povezan s vrijednostima glukoze u plazmi. IP-10 nije bio povezan niti s dobi, niti sa sistoličkim arterijskim tlakom. Povezanost KIM-1 i HGF s dobi bila je slaba iako statistički značajna ($r_s = 0,355$ odnosno $r_s = 0,385$; $P < 0,001$), a sa sistoličkim arterijskim tlakom još slabija ($r_s = 0,255$ odnosno $r_s = 0,275$; $P < 0,001$). Dodatno je učinjena analiza povezanosti dobi s biljezima KIM-1 i HGF nakon prilagodbe za duljinu boravka u endemskome selu te tada povezanosti s dobi više nije bilo za KIM-1, dok je povezanost HGF i dobi bila slabija ($r_s = 0,302$; $P < 0,001$). Statistička značajnost u ovim slučajevima znači da slaba povezanost nije slučajna, no i dalje je slaba te se ne bi očekivao utjecaj dobi, sistoličkoga arterijskog tlaka i glukoze u plazmi na same vrijednosti biljega KIM-1 i HGF u skupinama gdje je uočena razlika u ovim parametrima.

Prvi odgovor koji smo željeli dobiti u analizi novih biljega oštećenja proksimalnog tubula jest njihova povezanost s dosadašnjim biljezima bubrežne bolesti. IP-10 nije bio povezan niti s jednim dosadašnjim biljegom bubrežnog oštećenja. KIM-1 i HGF bili su slabo negativno povezani s eGFR ($r_s = -0,237$ odnosno $r_s = -0,256$; $P < 0,001$). Iako na prvi pogled iznenađujuće, slične rezultate nepovezanosti odnosno slabe povezanosti tubularnih biljega i procijenjene glomerularne filtracije dobili su i drugi autori (111,112,159,160,163). Nadalje, KIM-1 i HGF bili su slabo pozitivno povezani s omjerom albumin/kreatinin ($r_s = 0,314$ odnosno $r_s = 0,268$; $P < 0,001$) što je sukladno rezultatima drugih autora u drugim bubrežnim bolestima (107,112,159). Iako bismo očekivali jaču povezanost s obzirom da se radi o tubularnim biljezima, KIM-1 bio je vrlo slabo povezan s $\alpha 1$ mikroglobulin/kreatinin omjerom

iz oba uzorka urina ($r_s = 0.224$ odnosno $r_s = 0.216$; $P < 0,001$), no slično su zamijetili i drugi autori (112). HGF je bio pozitivno povezan s $\alpha 1$ mikroglobulin/kreatinin omjerom i to značajnije kada se $\alpha 1$ mikroglobulin/kreatinin omjer određuje iz drugoga jutarnjega urina ($r_s = 0.399$; $P < 0.001$) što je i za očekivati budući da smo i nove tubularne biljege određivali iz drugoga jutarnjeg urina. Dijelom se slaba povezanost novih tubularnih biljega KIM-1 i HGF s albumin/kreatinin omjerom i alfa-1 mikroglobulin/kreatinin omjerom može objasniti rasapom podataka te nejednolikom raspodjelom zbog nekolicine ekstremnih rezultata što se može vidjeti na krivuljama povezanosti (slika 15-20) gdje je povezanost na očigled veća za glavninu grupiranih podataka u početnom dijelu krivulje dok se zatim zbog ekstremnih podataka povezanost smanjuje.

Tubularni biljezi bubrežnoga oštećenja do sada su ekstenzivno istraživani u akutnom bubrežnom oštećenju gdje su pokazali svoju superiornost u odnosu na tradicionalne biljege bubrežnoga oštećenja (89,93,94,96,97,99). Studije na animalnim modelima dokazale su da su neki tubularni biljezi uključeni u proces fibroze u bubregu te mogu posredovati tranziciju akutnoga u kronično bubrežno oštećenje (102,103,117,164). U posljednje vrijeme tubularni se biljezi sve više istražuju u kroničnim bubrežnim bolestima u kojima su također dokazane povišene vrijednosti tubularnih biljega odnosno pojačana ekspresija njihovih gena (107,109,111,134,163,165). Stoga smo i mi u endemskoj nefropatiji kao primjeru jedne od kroničnih tubulointersticijskih bolesti bubrega željeli odrediti ulogu tubularnih biljega KIM-1, HGF i IP-10.

Analizirajući nove biljege tubularnoga oštećenja nije bilo statistički značajne razlike između skupina endemskih i kontrolnih sela s obzirom na vrijednosti KIM-1 i HGF. Međutim, nešto više vrijednosti IP-10 imali su ispitanici iz endemskih sela u odnosu prema kontrolnim ispitanicima što po svemu nema klinički značaj jer se navedena razlika gubi kad se analiziraju endemske podskupine međusobno, kao i usporedbom endemskih podskupina s kontrolnom skupinom. S druge strane, kad se gledaju endemske podskupine tada se uočavaju značajno više vrijednosti biljega KIM-1 i HGF u „Bolesnih i sumnjivih“ ispitanika u odnosu na „Rizične“, „Ostale“ i kontrolne ispitanike dok između ove posljednje tri skupine međusobno nema razlike.

Sve su ove analize provedene i kad su se ispitanici klasificirali prema modificiranoj SZO klasifikaciji. Razlike među skupinama i podskupinama s obzirom na dob, spol, arterijski tlak, te laboratorijske parametre bile su potpuno podudarne, no prema SZO klasifikaciji biljeg IP-10 bio je u „Bolesnih i sumnjivih“ nešto viši u odnosu na kontrolne, neendemske ispitanike. Međutim nema značajne razlike u biljegu IP-10 niti po ovoj klasifikaciji među endemskim

podskupinama pa dobivena razlika iako statistički značajna, nije klinički i dijagnostički relevantna.

Iako je povezanost dobi, sistoličkog arterijskog tlaka i glukoze u plazmi s novim tubularnim biljezima bila zanemariva te vjerojatno nije uzrok dobivenim razlikama u novim tubularnim biljezima među podskupinama, željeli smo statistički umanjiti njihov utjecaj na dobivene rezultate. Kako većina varijabli, pa tako i svi novi i stari biljezi bubrežnoga oštećenja, pokazuje nenormalnu raspodjelu provedene su odgovarajuće neparametrijske statističke analize. Da bismo potvrdili naše rezultate učinjena je dodatno i parametrijska analiza uz prilagodbu za dob, sistolički arterijski tlak i glukozu na logaritamski transformiranim podacima što je čest slučaj u literaturi (99,109,158). I ovom analizom dobivene su značajno više vrijednosti KIM-1 i HGF u „Bolesnih i sumnjivih“ u odnosu na preostale tri skupine, i to prema obje klasifikacije endemske nefropatije, dok nije bilo razlike u IP-10 među endemskim podskupinama i kontrolnim ispitanicima niti po jednoj klasifikaciji.

Ovom dodatnom analizom definitivno smo potvrdili ranije dobivene rezultate te možemo zaključiti da razlike u tubularnim biljezima KIM-1 i HGF zaista postoje odnosno da značajno više vrijednosti ovih biljega u „Bolesnih i sumnjivih“ ispitanika nisu posljedica starije dobi, višega sistoličkoga arterijskog tlaka ili viših vrijednosti glukoze zabilježenih u ovih ispitanika. S druge strane, niti ovom analizom nema razlike u biljegu IP-10 između endemskih podskupina i kontrolnih ispitanika. Stoga uočen statistički neznačajan trend pada vrijednosti IP-10 od „Bolesnih i sumnjivih“ preko „Rizičnih“ i „Ostalih“ do kontrolnih ispitanika nema kliničko niti dijagnostičko značenje. S obzirom da je IP-10 biljeg uglavnom inflamatornih procesa koji u endemskoj nefropatiji, a pogotovo u njenoj uznapredovaloj fazi nisu dominantno prisutni možemo zaključiti kako su dobiveni rezultati vezani uz IP-10 očekivani.

S obzirom na smanjenu izloženost uzročnom agensu te pad prevalencije endemske nefropatije prema recentnim epidemiološkim istraživanjima (19,22) nismo očekivali razliku u biljezima tubularnog oštećenja KIM-1 i HGF između endemskih podskupina. Kako su prema „Bračkoj“ klasifikaciji bolesna bila tek tri ispitanika, više vrijednosti biljega u objedinjenoj skupini „Bolesni i sumnjivi“ po svemu su posljedica povišenih vrijednosti u „Sumnjivih“ bolesnika. U „Sumnjivih“ bolesnika moguće još uvijek postoji određeni stupanj aktivnog oštećenja proksimalnoga tubula odnosno reparatornih procesa te su posljedično zbog toga više i vrijednosti KIM-1 i HGF. Također, u istraživanjima je utvrđena uloga prekomjerne i trajne ekspresije KIM-1 na razvoj intersticijske fibroze što je karakteristika uznapredovaloga bubrežnog zatajenja (102). S druge strane HGF oponira profibrogeno djelovanje TGF β pa

pojačana ekspresija HGF gena i posljedično njegove povišene vrijednosti u urinu predstavljaju pokušaj tubularnih epitelnih stanica da antagoniziraju profibrogene signale koji vode u daljnje pogoršanje bubrežne funkcije (134). Premda su vrijednosti KIM-1 i HGF bile značajno povišene u „Bolesnih i sumnjivih“ u odnosu na ostale endemske podskupine i kontrolne ispitanike, apsolutne vrijednosti koje smo izmjerili značajno su niže od vrijednosti određenih u akutnom tubularnom oštećenju (99,166). Uspoređujući ih s vrijednostima u drugim kroničnim bubrežnim bolestima, naše su vrijednosti u najvećoj mjeri sukladne onima u literaturi ovisno o tipu bubrežne bolesti i stupnju zatajenja bubrežna funkcije u pojedinom istraživanju (107,109,159).

Nadalje, željeli smo usporediti nove tubularne biljege u odnosu na dosadašnji biljeg tubularne proteinurije u endemskoj nefropatiji omjer alfa-1 mikroglobulina i kreatinina u urinu. Stoga smo analizirali razlike u novim tubularnim biljezima između endemskih ispitanika podijeljenih u dvije skupine prema $\alpha 1\text{MCR} < 31,5 \text{ mg/g}$ odnosno $> 31,5 \text{ mg/g}$ što je granična vrijednost za tubularnu proteinuriju prema novoj „Bračkoj“ klasifikaciji. U ispitanika s $\alpha 1\text{MCR} > 31,5 \text{ mg/g}$ dobili smo statistički značajno više vrijednosti KIM-1 i HGF što je bilo i očekivano s obzirom da se radi o biljezima tubularnoga oštećenja, dok za IP-10 nije bilo značajne razlike.

Sljedeće pitanje koje smo postavili bilo je vezano uz dijagnostičku vrijednost biljega KIM-1 i HGF. ROC analizom testirana je osjetljivost i specifičnost biljega KIM-1 i HGF kao dijagnostičkih testova za endemsku nefropatiju prema „Bračkoj“ klasifikaciji. Prema našim rezultatima niti osjetljivost, niti specifičnost ovih biljega nije dostatna da bi bili korisni u dijagnostičkom algoritmu za endemsku nefropatiju.

Već je u nekoliko navrata istaknuto kako se prevalencija endemske nefropatije polagano smanjuje te kako bolest postepeno nestaje kao posljedica manje izloženosti aristolohičnoj kiselini. U narednoj analizi cilj nam je bio odrediti možemo li analizom novih biljega oštećenja proksimalnoga tubula dobiti podatak koji će dodatno potkrijepiti ranija opažanja. S tim ciljem učinili smo usporedbu vrijednosti ovih biljega između ispitanika koji u endemskim selima žive dulje odnosno kraće od 20 godina. Pretpostavljali smo da bi u slučaju i dalje prisutne izloženosti aristolohičnoj kiselini u akutnoj odnosno početnoj fazi endemske nefropatije ovi biljezi mogli biti povišeni više nego u uznapredovalim stadijima kronične bubrežne bolesti, međutim nismo našli statistički značajnu razliku. Ovaj podatak još je jedan u nizu koji ukazuje da izloženost uzročnom agensu više nije prisutna te možemo očekivati iščezavanje endemske nefropatije u budućnosti, kao što su pokazali i dosadašnji radovi (22,23,25).

U prospektivnom dijelu istraživanja zanimalo nas je kolika je prediktivnost novih biljega oštećenja proksimalnoga tubula za progresiju kronične bubrežne bolesti, tj. pad eGFR. Inicijalno nam je želja bila analizirati posebno prediktivnost za progresiju endemske nefropatije, no od toga smo odustali zbog dva razloga. Prvi razlog bio je malen broj „Bolesnih i sumnjivih“, a drugi razlog je bilo naše razmišljanje da bi tom analizom dobili samo podatak od mogućeg akademskog interesa za vrlo uski krug stručnjaka. Stoga smo odlučili napraviti analizu u cijeloj skupini ispitanika i analizirati koje su prediktivne vrijednosti ovih biljega u općoj populaciji. Posljednjih godina brojna su istraživanja provedena s ciljem utvrđivanja postoji li prediktivna vrijednost novih bubrežnih biljega za razvoj odnosno napredovanje kronične bubrežne bolesti. Peters i sur. pokazali su neovisnu prognostičku vrijednost KIM-1 za razvoj terminalnoga bubrežnog zatajenja u bolesnika s IgA nefropatijom (112). Waikar i sur. u svoje su istraživanje uključili pet različitih kohorti i detektirali su više vrijednosti tubularnih biljega u bolesnika s nižom eGFR i višom albuminurijom (159). U REGARDS studiji autori su pokazali povezanost KIM-1 i NGAL s ukupnom smrtnosti bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti, te neovisnu prediktivnu vrijednost KIM-1 za razvoj terminalnoga bubrežnog zatajenja, dok se prediktivna vrijednost NGAL izgubila nakon prilagodbe za eGFR i albuminuriju (111). Peralta i sur. utvrdili su povezanost viših vrijednosti KIM-1 i novonastale kronične bubrežne bolesti odnosno bržega gubitka bubrežne funkcije (109). U bolesnika sa šećernom bolesti tip 2 koji su recentno preboljeli koronarni incident novi bubrežni biljezi nisu pokazali značajan doprinos u predviđanju daljnjeg gubitka bubrežne funkcije u usporedbi s tradicionalnim biljezima eGFR i albuminurijom (165). Hsu i sur. su u svom istraživanju pokazali snažnu povezanost tubularnih biljega i progresije kronične bubrežne bolesti, međutim nakon prilagodbe za albumin/kreatinin omjer i bazalnu eGFR niti jedan biljeg nije pokazao neovisnu prognostičku vrijednost povrh samih tradicionalnih biljega bubrežnoga oštećenja (158).

Sva ova istraživanja provedena su na vrlo heterogenim populacijama. U neka su istraživanja uključeni zdravi ispitanici dok su u druga uključeni ispitanici s kroničnom bubrežnom bolesti. Uključeni su bolesnici s različitim bubrežnim bolestima. Također, definicija napredovanja kronične bubrežne bolesti odnosno gubitka bubrežne funkcije razlikuje se od istraživanja do istraživanja. Slično je i s vremenom praćenja bolesnika. Zbog svih ovih razloga dobiveni su različiti rezultati o prognostičkoj vrijednosti tubularnih biljega u kroničnoj bubrežnoj bolesti te definitivnog zaključka još nema.

Mi smo naše ispitanike pratili sedam godina i željeli smo utvrditi postoji li prognostička vrijednost biljega KIM-1, HGF i IP-10 za razvoj novonastale kronične bubrežne bolesti odnosno bržega pogoršanja bubrežne funkcije tj. većega pada eGFR u općoj populaciji ispitanika u sedmogodišnjem periodu. Binarnom logističkom regresijom utvrdili smo da postoji prediktivna vrijednost bazalne glomerularne filtracije i sistoličkoga arterijskog tlaka za razvoj novonastale kronične bubrežne bolesti definirane padom $GFR < 60 \text{ ml/min/1.73m}^2$ u sedmogodišnjem periodu što je očekivano s obzirom da se radi o poznatim faktorima rizika za razvoj kronične bubrežne bolesti. S druge strane, omjer albumina i kreatinina, kao i alfa-1 mikroglobulina i kreatinina nije pokazao prediktivnu vrijednost za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest. Nadalje, nismo utvrdili prognostičku vrijednost novih biljega KIM-1 i IP-10 za razvoj novonastale kronične bubrežne bolesti, dok je biljeg HGF pokazao određenu prediktivnu vrijednosti za razvoj novonastale kronične bubrežne bolesti, no samo se oko 3,5% varijance može objasniti utjecajem toga biljega. Kada se u model s HGF-om uključe i tradicionalni prognostički biljezi eGFR i ACR, HGF nema dodanu prognostičku vrijednost povrh tradicionalnih biljega prvenstveno eGFR. Gledajući sva tri nova tubularna biljega (KIM-1, HGF i IP-10) zajedno u modelu nije bilo prediktivne vrijednosti za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest.

Kad se promatra pogoršanje bubrežne funkcije odnosno pad eGFR za $\geq 14 \text{ ml/min/1.73m}^2$ u sedmogodišnjem periodu prediktivnu vrijednosti od „tradicionalnih“ biljega pokazali su sistolički arterijski tlak, ACR i $\alpha 1\text{MCR}$ iz oba uzorka urina. Za razliku od novonastale kronične bubrežne bolesti, bazalna glomerularna filtracija nije pokazala prognostički značaj za pogoršanje bubrežne funkcije vjerojatno zbog viših bazalnih vrijednosti eGFR u ovoj skupini ispitanika. Nije bilo prediktivne vrijednosti niti jednog od novih tubularnih biljega za pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu. Dobiveni rezultati u skladu su s recentnim istraživanjima (158,163,167)

Negativni rezultati koje smo dobili najvećim dijelom su posljedica činjenice da se uglavnom radi o zdravoj populaciji (tablica 23-25) kod koje je očekivani godišnji pad eGFR manji, a vjerojatnost nastanka novonastale kronične bubrežne bolesti u sedmogodišnjem periodu praćenja je mala te je posljedično i mali uzorak ispitanika s novonastalom kroničnom bubrežnom bolesti odnosno pogoršanjem bubrežne funkcije. Osim maloga uzorka u oba dijela našega istraživanja, ograničenje je ovoga epidemiološkoga istraživanja jednokratno određivanje parametara bubrežne funkcije kako bazalno, tako i prilikom kontrolnoga pregleda nakon sedam godina. Ovu ćemo kohortu ispitanika nastaviti pratiti u projektu koji nastavljamo.

Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika ne bi li utvrdili definitivnu ulogu novih tubularnih biljega u predviđanju gubitka bubrežne funkcije kako u zdravih ispitanika, tako i u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti s jasno definiranim ishodom.

7. ZAKLJUČAK

Zaključci:

1. Nema razlike u vrijednostima novih biljega bubrežnoga tubularnog oštećenja KIM-1 i HGF između ispitanika iz endemskih i kontrolnih sela. Vrijednosti IP-10 bile su nešto više u ispitanika iz endemskih sela u odnosu na kontrolna sela što nema kliničko značenje jer nije bilo razlike između endemskih podskupina.
2. Utvrdili smo značajno više vrijednosti biljega KIM-1 i HGF u „Bolesnih i sumnjivih“ ispitanika u odnosu na „Rizične“, „Ostale“ i kontrolne ispitanike. Razlika se može objasniti prvenstveno povišenim vrijednostima u „Sumnjivih“ ispitanika u kojih vjerojatno još postoji određeni stupanj aktivnoga tubularnog oštećenja odnosno reparatornih procesa.
3. Nije bilo statistički značajne razlike u biljegu IP-10 između „Bolesnih i sumnjivih“, „Rizičnih“, „Ostalih“ i kontrolnih ispitanika, što je bilo i za očekivati s obzirom da inflamacija nije među dominantnim karakteristikama endemske nefropatije.
4. U ispitanika s vrijednostima omjera alfa-1 mikroglobulina i kreatinina iznad granične vrijednosti (31.5 mg/g) za EN po „Bračkim“ kriterijima utvrdili smo i značajno više vrijednosti biljega KIM-1 i HGF, dok nije bilo razlike u IP-10
5. Analizirajući osjetljivost i specifičnost novih biljega bubrežnoga oštećenja, KIM-1 i HGF nisu korisni testovi u dijagnostičkom algoritmu za endemsku nefropatiju s obzirom na nisku osjetljivost i specifičnost.
6. Usporedbom vrijednosti novih biljega bubrežnoga oštećenja između ispitanika koji u endemskom kraju borave dulje odnosno kraće od 20 godina nismo dobili značajnu razliku što je još jedan od dokaza smanjene izloženosti uzročnom agensu te iščezavanju bolesti u budućnosti.
7. Vrijednosti KIM-1 i HGF dobivene u našem istraživanju značajno su niže u odnosu na vrijednosti u akutnom bubrežnom oštećenju opisane u literaturi, a u najvećoj mjeri su u skladu s vrijednostima u ostalim kroničnim bubrežnim bolestima.
8. U prospektivnom dijelu našega istraživanja od novih tubularnih biljega samo je HGF pokazao prediktivnu vrijednost za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest, no ta prediktivna vrijednost nema dodanu vrijednost pred tradicionalnim prognostičkim biljezima tj. pred procijenjenom glomerularnom filtracijom. KIM-1 i IP-10 nisu pokazali prediktivnu vrijednost za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest. Niti jedan od novih biljega nije pokazao prediktivnu vrijednost za pogoršanje bubrežne funkcije definirano padom $eGFR \geq 14 \text{ ml/min/1,73}^2$ u sedmogodišnjem periodu.

9. Kao što je već poznato u literaturi, i u našem istraživanju sistolički arterijski tlak i procijenjena glomerularna filtracija pokazali su prediktivnu vrijednost za novonastalu kroničnu bubrežnu bolest. S druge strane, sistolički arterijski tlak, albumin/kreatinin omjer, kao i alfa1-mikroglobulin/kreatinin omjer pokazali su prediktivnu vrijednost za pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu.

8. SAŽETAK

Endemska nefropatija kronična je tubulointersticijska bolest bubrega koja se u hrvatskom endemskom žarištu proteže na 14 sela uz rijeku Savu zapadno od Slavonskoga Broda. Kako je glavno mjesto djelovanja okolišnog uzročnika u endemskoj nefropatiji proksimalni tubul, željeli smo utvrditi ulogu novih biljega bubrežnoga tubularnog oštećenja KIM-1, HGF i IP-10 u endemskoj nefropatiji. Također, cilj nam je bio utvrditi prediktivnu vrijednost navedenih biljega na nastanak kronične bubrežne bolesti odnosno pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu.

U prvi dio presječnog istraživanja uključeno je 978 ispitanika iz 3 endemska i 2 kontrolna sela. Ispitanici iz endemskih sela klasificirani su u podskupine „Bolesni i sumnjivi“, „Rizični“ i „Ostali“. Svi ispitanici ispunili su detaljan upitnik, učinjen je fizikalni pregled, uzeti su im uzorci krvi te prvoga i drugoga jutarnjeg urina za analizu. U drugi longitudinalni dio istraživanja uključeno je 418 ispitanika koji su dali svoj pristanak za kontrolni pregled nakon 7 godina.

Prema našim rezultatima nema razlike u novim biljezima bubrežnoga oštećenja KIM-1, HGF između endemskih i kontrolnih bolesnika, dok je IP-10 bio nešto viši u endemskih u odnosu na kontrolne ispitanike što nema kliničko značenje jer nije bilo razlike kad se analiziraju međusobno endemske podskupine i kontrolni ispitanici. Međutim, „Bolesni i sumnjivi“ ispitanici imali su značajno više vrijednosti KIM-1 i HGF u odnosu na sve ostale ispitanike što ukazuje na još prisutan određeni stupanj aktivnoga tubularnog oštećenja odnosno reparatornih procesa u ovih ispitanika. Prema ROC analizi KIM-1 i HGF nemaju ulogu u dijagnostičkom algoritmu za endemsku nefropatiju s obzirom na nisku osjetljivost i specifičnost. Uspoređujući vrijednosti novih biljega između ispitanika koji u endemskom kraju borave dulje odnosno kraće od 20 godina nismo dobili značajnu razliku što je još jedan od dokaza smanjene izloženosti uzročnom agensu. U ovom istraživanju KIM-1 i IP-10 nisu pokazali prediktivnu vrijednost za razvoj novonastale kronične bubrežne bolesti, niti za pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu praćenja. HGF je pokazao prediktivnu vrijednost za razvoj novonastale kronične bubrežne bolesti, no ne doprinosi značajno tradicionalnim prognostičkim biljezima poput procijenjene glomerularne filtracije. S druge strane HGF nema prediktivnu vrijednost za pogoršanje bubrežne funkcije u sedmogodišnjem periodu.

Ključne riječi: endemska nefropatija, nefropatija aristolohične kiseline, biljezi bubrežnog tubularnog oštećenja, KIM-1, HGF, IP-10

9. SUMMARY

BIOMARKERS OF PROXIMAL TUBULE INJURY IN ENDEMIC NEPHROPATHY

Jelena Kos

Zagreb, 2020.

Endemic nephropathy is a chronic tubulointerstitial kidney disease that in Croatia affects rural population west of Slavonski Brod along the Sava river. As proximal tubule injury is a hallmark of initial kidney damage in EN, our aim was to determine the role of the novel markers of tubular injury KIM-1, HGF and IP-10 in EN and to determine prognostic value of these biomarkers in chronic kidney disease.

In the first part of the study (cross-sectional) 978 participants from 3 endemic villages and 2 non-endemic control villages were enrolled. Participants from endemic villages were classified in 3 subgroups: “EN diseased and suspects”, “EN at risk”, “EN others“. All participants fulfilled extensive questionnaire, underwent physical examination, their blood was drawn and urine sample collected. In the second, longitudinal part of the study 418 participants were included in the follow up visit after 7 years.

We failed to find any differences in KIM-1 and HGF values between endemic and control participants while IP-10 showed a slightly higher levels in endemic participants. However, when we analyzed IP-10 values among the EN subgroups and control participants there were no significant differences. But significantly higher levels of KIM-1 and HGF were found in the urine of „EN diseased and suspects“ in comparison to all other groups, which could be attributed to the persistence of ongoing active tubular damage and reparatory processes in these patients. KIM-1 and HGF were not found to have specificity and sensitivity high enough to be incorporable into the diagnostic algorithm for EN. We found no differences in KIM-1, HGF and IP-10 values between endemic residents who live in these villages for more than 20 years in comparison to the residents who live less than 20 years confirming that exposure to the environmental agent is obviously diminished. In this study KIM-1 and IP-10 had no predictive value for the development of chronic kidney disease, or for the decline in renal function in 7-year follow-up. HGF showed predictive value for the development of chronic kidney disease, but when analyzed in model together with ACR and eGFR, HGF had no added value. On the

other side, there was no predictive value of HGF for the decline in renal function in 7-year follow up.

Key words: endemic nephropathy, aristolochic acid nephropathy, markers of tubular kidney injury, KIM-1, HGF, IP-10

10. POPIS LITERATURE

1. Tanchev Y, Evstatiev Z, Dorossiev D, Pencheva J, Tzvetkova G. Studies on the nephritides in the district of Vratza. *Savremena Medicina*. 1956;7:14-29.
2. Pichler O, Bobinac E, Miljuš B, Sindik A. O učestaloj pojavi bubrežnih oboljenja u okolici Slavanskog Broda. *Liječ Vjesn*. 1959;81:295-306.
3. Danilović V, Đurišić M, Mokranjac M, Stojimirović B, Živojinović J, Stojaković P. Porodična oboljena bubrega u selu Šopić izazvana hroničnom intoksikacijom olovom. *Srp Arhiv*. 1957;85:1115-25.
4. Bruckner I, Zosin C, Lazarescu R, Paraskiv D, Manescu N, Serban M, i sur. A clinical study of nephropathy of an endemic character in the Republic of Romania. U: *International Symposium on Endemic Nephropathy*;1965.Str.25.
5. Radonić M, Radošević Z, Zupanić V. Endemic nephropathy in Yugoslavia. U: Mostofi F, Smith D, ur. *The kidney*. Baltimore: Williams and Wilkins Co;1966. Str.503–22.
6. Čeović S, Radonić M, Hrabar A. Endemska nefropatija. *Arh Hig Rada*. 1974;25:381-405.
7. Djukanović L, Radovanović Z. Balkan Endemic NEphropathy. U: DeBroe M, Porter GBW, Verpooten G, ur. *Clinical Nephrotoxins*; 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2003. Str. 587-601.
8. Dimitrov P, Simeonov V, Stein A. Balkan endemic nephropathy in Vratza, Bulgaria, 1964-1987: an epidemiologic analysis of population-based disease registers. *Eur J Epidemiol*. 2001;17:847-53.
9. Radovanović Z. Epidemiology and etiology of endemic nephropathy. U: Radovanović Z, Sindić M, Polenaković M, Đukanović L, Petronić V, ur. *Endemic nephropathy*. Belgrade: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2002. Str. 22-135.
10. Trnačević S, Halilbašić A, Imamović G, Mesić E. Balkan endemic nephropathy in Bosnia and Herzegovina. *Facta Universitatis Series Medicine and Biology*. 2002;9:31-3.
11. Čeović S, Miletić-Medved M. Epidemiological features of endemic nephropathy in focal area of Brodska Posavina, Croatia. U: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, ur. *Endemic nephropathy in Croatia*. Zagreb: Academia Croatica Scientiarum Medicarum; 1996. Str. 7-21.
12. Radonić M, Radošević Z. Clinical features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol*. 1992;30:189–92.
13. Ivić M. The problem of etiology of endemic nephropathy. *Liječ Vjesn*. 1969;91:1273-81.
14. Tatu C, Orem W, Finkelman R, Feder G. The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers. *Environ Health Perspect*. 1998;106:689-700.
15. Miletić Medved M, Jelaković B, Bistrovic D. Epidemiološke osobitosti endemske nefropatije u Hrvatskoj 2005. godine. *Acta Med Croat*. 2007;61:141-8.

16. Čeović S, Hrabar A, Radonić M. An etiological approach to Balkan endemic nephropathy based on the investigation of two genetically different population. *Nephron*. 1985;40:175-9.
17. Organization WH. Memorandum. The endemic nephropathy of South-Eastern Europe. *Bull World Health Organ*. 1965;32:441-8.
18. Ciba Foundation Study Group No 30. The Balkan nephropathy. U: Wolstenholme G, Knight J, ur.; 1967; Boston: Ciba Foundation.
19. Cvitkovic A, Vukovic-Lela I, Edwards K, Karanovic S, Juric D, Cvoriscec D, i sur. Could disappearance of endemic (Balkan) nephropathy be expected in Forthcoming Decades? *Kidney Blood Press Res*. 2012;35(3):147-52.
20. Čeović S, Hrabar A, Sarić M. Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol*. 1992;30:183-8.
21. Čvorišćec D, Čeović S, Boršo G, Stavljenić Rukavina A. Endemic Nephropathy in Croatia (Review). *Clin Chem Lab Med*. 1998;36(5):271-7.
22. Čukuranović R, Petrović B, Čukuranović Z, Stefanović V. Balkan endemic nephropathy: a decreasing incidence of the disease. *Pathol Biol*. 2000;48:558-61.
23. Dimitrov P, Simeonov V, Ganey V, Karmaus W. Is the incidence of Balkan endemic nephropathy decreasing? *Pathol Biol*. 2002;50(1):38-41.
24. Bukvić D, Janković S, Arsenović A, Djukanović L. Prevalence of Balkan endemic nephropathy has not changed since 1971 in the Kolubara region in Serbia. *Kidney Blood Press Res*. 2007;30:117-23.
25. Jelaković B, Vuković Lela I, Karanović S, Dika Ž, Kos J, Dickman K, i sur. Chronic dietary exposure to aristolochic acid and kidney function in native farmers from a croatian endemic area and bosnian immigrants. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10:215-23.
26. Stefanović V, Radovanović Z. Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2008;5:105-12.
27. Miletić-Medved M, Domijan A, Peraica M. Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia. *Wien Clin Wochenschr*. 2005;117(17):604-9.
28. Bukvić D, Janković S, Đukanović L. Urinary tract tumors in Kolubara region. *Facta Universitatis*. 2004;11(1):5-10.
29. Petković S. Epidemiology and treatment of renal and ureteral cancer. *Journal of Urology*. 1975;114:858.
30. Voice T, Long D, Radovanović Z, Atkins J, McElmurry S, Niagolova M, et al. Critical evaluation of environmental exposure agents implicated in the etiology of Balkan endemic

- nephropathy. U: Proceedings of the 8th International Conference on Environmental Science and Technology; 2003; Lemnos Island: Society of Environmental Science and Technology.
31. Weden R. Environmental renal disease: lead, cadmium and Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 1991;34:54-8.
 32. Aleraj B. A study of the viral etiology of endemic nephropathy. U: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, ur. *Endemic nephropathy in Croatia*. Zagreb: Academia Croatica Scientiarum Medicarum; 1996. Str. 73-5.
 33. Čikeš N, Radošević Z, Vuletić S. Some population genetic aspects of endemic nephropathy. U: Strahnjić S, Stefanović V, ur. *Proceedings of the 4th Symposium on the endemic (Balkan) nephropathy*; 1979; Niš: University of Niš. Str. 241-5.
 34. Maksimović Z. Selenium deficiency and Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 1991;34:12-4.
 35. Fuchs R, M P. Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Aditiv Contam.* 2005;22(S1):53-7.
 36. Krogh P, Hald B, Pleština R, Čeović S. Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1977;85:238-40.
 37. Phol-Leszkovicz A, Petkova-Bocharova T, Chemozemsky I, Castegnaro M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and potential role of mycotoxins. *Food Adit Contam.* 2002;19:282-302.
 38. EFSA 2006. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain of the EFSA on a request from the Commision related to ochratoxin A in food. *EFSA J.* 2006;365:1-56.
 39. Grollman A, Jelaković B. Role of environmental toxins in endemic (Balkan) nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:2817–23.
 40. Dumić A. Trovanja konja Vučjom Stopom (*Aristolochia Clematitis*). Izdanje Vojnotehičkog Glasnika. 1954. Str. 3-45.
 41. Martinčić M. Toxische Einwirkungen der *Aristolochia Clematitis* auf die Niere des Pferdes. *Vet Arhiv.* 1957;27:51-9.
 42. Ivić M, Lovrić B. Carcinogenic action of *Aristolochia* (in serbian). *Acta Medica Medicine.* 1967;5:1-3.
 43. Vanherweghem J, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, i sur. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet.* 2003;341:387–91.

44. Nortier J, Martinez M, Schmeiser H, Arlt V, Bieler C, Petein M, i sur. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med*. 2000;342(23):1686-92.
45. Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P, Vanherweghem J. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet*. 1994;343:174.
46. Schmeiser H, Bieler C, Wiessler M, van Ypersele de Strihou C, Cosyns J. Detection of DNA adducts formed by Aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Res*. 1996. 1;56(9):2025-8.
47. Cosyns J, Dehoux J, Guiot Y, Goebbels R, Robert A, Bernard A, i sur. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy? *Kidney Int*. 2001;59(6):2164-73.
48. Debelle F, Nortier J, De Prez E, Garbar C, Vienne A, Salmon I, i sur. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(2):431-6.
49. Cosyns J, Jadou IM, Squifflet J, De Plaen J, Ferluga D, van Ypersele de Strihou C. Chinese herb nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int*. 1994;45:1680-8.
50. Cosyns J. Aristolochic acid and 'Chinese herbs nephropathy'. A review of the evidence to date. *Drug Saf*. 2003;26:33-48.
51. Debelle F, Vanherweghem J, JL N. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney Int*. 2008;74:158-69.
52. Nortier J, Vanherweghem J. For patients taking herbal therapy – lessons from aristolochic acid nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:1512-7.
53. Hranjec T, Kovač A, Kos J, Mao W, JJ C, Grollman A, i sur. Endemic nephropathy: the case for chronic poisoning by *Aristolochia*. *Croat Med J*. 2005;46(1):116-25.
54. Grollman A, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U, i sur. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Nat Acad Sci*. 2007;104:12129–34.
55. Grollman A, Scarborough J, Jelaković B. Aristolochic acid nephropathy: an environmental and iatrogenic disease. *Adv Mol Tox*. 2009;3:211–27.
56. Jelaković B, Karanović S, Vuković-Lela I, Miller F, Edwards K, Nikolić J, i sur. Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney Int*. 2012;81:559–67.
57. Lord G, Hollstein M, Arlt V, Roufosse C, Pusey C, Cook T, i sur. DNA adducts and p53 mutations in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2004;43:11-7.

58. Feldmeyer N, Schmeiser H, Muehlbauer K, Belharazem D, Knyazev Y, Nedelko T, et al. Further studies with a cell immortalization assay to investigate the mutation signature of aristolochic acid in human p53 sequences. *Mutat Res.* 2006;608:163–8.
59. Schmeiser H, Kucab J, Arlt V, Phillips D, Hllstein M, Gluhovschi G, i sur. Evidence of exposure to aristolochic acid in patients with urothelial cancer from a Balkan endemic nephropathy region of Romania. *Environ Mol Mutagen.* 2012;53(8):636-41.
60. Chen C, Dickman K, Moriya M, Zavdil J, Sidorenko V, Edwards K, i sur. Aristolochic acid-associated urothelial cancer in Taiwan. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(21):8241-6.
61. Jonge H, Vanrenterghem Y. Aristolochic acid: common culprit of Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23:39-41.
62. De Broe M. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney Int.* 2012;81(6):513-5.
63. Phau W, Schmeiser H, Wiessler M. 32P-postlabelling analysis of the DNA adducts formed by aristolochic acid I and II. *Carcinogenesis.* 1990;11:1627-33.
64. Robisch G, Schimmer O, W G. Aristolochic acid is a direct mutagen in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research.* 1982;105:201-4.
65. Schmeiser H, Pool B, Wiessler M. Mutagenicity and in vitro metabolism of aristolochic acid. *Biochem Pharmacol.* 1985;34:455-6.
66. Schmeiser H, Janssen J, Lyons J, Scherf H, Pfau W, Buchmann A, i sur. Aristolochic acid activates ras genes in rat tumors at deoxyadenosine residues. *Cancer Res.* 1990;50:5464-9.
67. Schmeiser H, Scherf H, Wiessler M. Activating mutations at codon 61 of the c-Ha-ras gene in thin-tissue sections of tumors induced by aristolochic acid in rats and mice. *Cancer Lett.* 1991;59:139–43.
68. International Agency for Research on Cancer (IARC). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphtalene and styrene. U: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemical to Humans. Lyon: IARC Press; 2002. Str. 69-129.
69. Sato N, Takahashi D, Chen S, Tsuchiya R, Mukoyama T, Yamagata S, i sur. Acute nephrotoxicity of aristolochic acids in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56(2):221-9.
70. Shibutani S, Dong H, Suzuki N, Ueda S, Miller F, Grollman A. Selective toxicity of aristolochic acids I and II. *Drug Metab Dispos.* 2007;35:1217–22.
71. Pozdzik A, Salmon I, Debelle F, Decaestecker C, Van den Branden C, D V, i sur. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int.* 2008;73(5):595-607.

72. Shibutani S, Bonala R, Rosenquist T, Rieger R, Suzuki N, Johnson F, i sur. Detoxification of aristolochic acid I by O-demethylation: less nephrotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid Ia in rodents. *Int J Cancer*. 2010;127:1021-27.
73. Dickman K, Sweet D, Bonala R, Ray T, Wu A. Physiological and Molecular Characterization of Aristolochic Acid Transport by the Kidney. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(2):588–97.
74. Čvorišćec D, Stavljenić Rukavina A. Laboratory diagnosis of endemic nephropathy. U: Čvorišćec D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, ur. *Endemic nephropathy in Croatia*. 1996. Str. 77-86.
75. Radonić M. b2 -Microglobulin in Balkan endemic nephropathy. *Pathol Biol*. 1978;26:317–20.
76. Stefanović V, Jelaković B, Čukuranović R, Bukvić D, Nikolić J, Lukić L, i sur. Diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy: proposal by an international panel. *Ren Fail*. 2007;29(7):867-80.
77. Jelaković B, Nikolić J, Radovanović Z, Nortier J, Cosyns J, Grollman A, i sur. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29: 2020-7.
78. Jadot I, Decleves A, Nortier J, Caron N. An integrated view of aristolochic acid nephropathy: update of the literature. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2):297.
79. Pleština R. Some features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol*. 1992;30:177-81.
80. Belicza M, Dubravić A, Leniček T, Pavić I, Tomić K, Jakovina K, 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(11):68.
81. Medverec Z, Lucic D, Martinovic M, Dittrich D, Perkovic A. Endemic nephropathy – the urologists' point of view. *Coll Antropol*. 2006;30(11):70.
82. Čvorišćec D. Early diagnosis of endemic nephropathy. *Clinica Chimica Acta*. 2000;297:85–91.
83. Hrabar A, Aleraj B, Čeović S, Čvorišćec D, Vacca C, PW. H. A fifteen year cohort based evaluation of b 2-microglobulin as an early sign of Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int*. 1991;40(34):41-3.
84. Čvorišćec D, Radonić M, Čeović S, Aleraj B. Characteristics of proteinuria in endemic nephropathy. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983;21:569–71.
85. Bistrović 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 D, Čeović S, Stavljenić-Rukavina A, ur. *Endemic nephropathy in Croatia*. 1996. Str. 87-95.

86. Cosyns J, van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs and other rare causes of interstitial nephropathy). U: Davison A, Cameron J, Grünfeld J, Ponticelli C, Ritz E, Winearls C i sur, ur. Oxford Textbook of Clinical Nephrology. New York: Oxford University Press; 2005. Str. 1103-8.
87. Danilović V. Diagnosis of endemic nephropathy. Radovi XLVII AN BiH. 1973;17:53-64.
88. KDIGO. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. Kidney Int. 2013;3(1):1-163.
89. Ichimura T, Bonventre J, Bailly V, Wei H, Hession C, Cate R, i sur. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. J Biol Chem. 1998;273(7):4135-42.
90. Bailly V, Zhang Z, Meier W, Cate R, Sanicola M, Bonventre J. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. J Biol Chem. 2002;277(42):39739-48.
91. Ichimura T, Asseldonk E, Humphreys B, Gunaratnam L, Duffield J, Bonventre J. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. J Clin Invest. 2008;118(5):1657-68.
92. Bonventre J. Kidney injury molecule-1: a translational journey. Trans Am Clin Climatol Assoc. 2014;125:293-9.
93. Ichimura T, Hung C, Yang S, Stevens J, Bonventre J. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. Am J Physiol Renal Physiol. 2004;286:552-63.
94. Vaidya V, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla N, Bonventre J. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. Am J Physiol Renal Physiol. 2006;290:517-29.
95. Zhou Y, Vaidya V, Brown R, Zhang J, Rosenzweig B, Thompson K, i sur. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. Toxicol Sci. 2008;101(1):159-70.
96. Vaidya V, Ozer J, Dieterle F, Collings F, Ramirez V, Troth S, i sur. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. Nat Biotechnol. 2010;28(5):478-85.
97. Han W, Wagener G, Zhu Y, Wang S, Lee H. Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery. Clin J Am Soc Nephrol. 2009;4:873-82.
98. Damman K, Van Veldhuisen D, Navis G, Vaidya V, Smilde T, Westenbrink B, i sur. Tubular damage in chronic systolic heart failure is associated with reduced survival independent of glomerular filtration rate. Heart. 2010;96:1297-302.

99. Vaidya V, Waikar S, Ferguson M, Collings F, Sunderland K, Gioules C, i sur. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clin Transl Sci.* 2008;1(3):200-8.
100. Han W, Alinani A, Wu C, Michaelson D, Loda M, McGovern F, i sur. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(4):1126-34.
101. Szeto C, Kwan B, Lai K, Lai F, Chow K, Wang G, i sur. Urinary expression of kidney injury markers in renal transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(12):2329-37.
102. Humphreys B, Xu F, Sabbisetti V, Grgic I, Movahedi Naini S, Wang N, i sur. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J Clin Invest.* 2013;123(9):4023-35.
103. Ko G, Grigoryev D, Linfert D, Jang H, Watkins T, Cheadle C, i sur. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(6):1472-83.
104. Prozialeck W, Vaidya V, Liu J, Waalkes M, Edwards J, Lamar P, i sur. Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2007;72(8):985-93.
105. Waanders F, Vaidya V, van Goor H, Leuvenink H, Damman K, Hamming I, i sur. Effect of renin–angiotensin–aldosterone system inhibition, dietary sodium restriction, and/or diuretics on urinary kidney injury molecule 1 excretion in nondiabetic proteinuric kidney disease: a post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* 2009;53(1):16-25.
106. Sabbisetti V, Waikar S, Antoine D, Smiles A, Wang C, Ravisankar A, i sur. Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(10):2177-86.
107. Xu P, Zhang J, Chen M, Lv J, Liu G, Zou W, i sur. Urinary kidney injury molecule-1 in patients with IgA nephropathy is closely associated with disease severity. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(10):3229-36.
108. Gardiner L, Akintola A, Gang C, Catania J, Vaidya V, Burghardt R, i sur. Structural equation modeling highlights the potential of KIM-1 as a biomarker for chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2012;35(2):152-63.
109. Peralta C, Katz R, Bonventre J, Sabbisetti V, Siscovick D, Sarnak M, i sur. Associations of urinary levels of kidney injury molecule 1 (KIM-1) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) with kidney function decline in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Kidney Dis.* 2012;60(6):904-11.
110. Alderson H, Ritchie J, Pagano S, Middleton R, Pruijm M, Vuilleumier N, i sur. The Associations of blood kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase–associated lipocalin with progression from CKD to ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(12):2141-9.

111. Dubin R, Judd S, Scherzer R, Shlipak M, Warnock D, Cushman M, i sur. Urinary tubular injury biomarkers are associated with ESRD and death in the REGARDS study. *Kidney Int Repo.* 2018;3(5):1183-92.
112. Peters H, Waanders F, Meijer E, van den Brand J, Steenbergen E, van Goor H, i sur. High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy. 2011;26(11):3581-8.
113. Bonventre J, Yang L. Kidney injury molecule-1. *Curr Opin Crit Care.* 2010;16(6):556-61.
114. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;122:1450-9.
115. Nakamura T, Nawa KIA. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *FEBS Lett.* 1988;224:311-8.
116. Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem.* 1996;119:591-600.
117. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;239:639-44.
118. Bottaro D, Rubin J, Faletto D, Chan A, Kmieciak T, Vande Woude G, i sur. Identification of hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science.* 1991;251:802-4.
119. Nakamura H, Tashiro K, Nakamura T, Shiokawa K. Molecular cloning of *Xenopus* HGF cDNA and its expression studies in *Xenopus* early embryogenesis. *Mech Dev.* 1995;49:123-31.
120. Yang X, Park M. Expression of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor tyrosine kinase is localized to epithelia in the adult mouse. *Lab Invest.* 1995;73:483-91.
121. Roletto F, Galvani A, Cristiani C, Valsasina B, Landonio A, Bertolero F. Basic fibroblast growth factor/scatter factor secretion by human mesenchymal cells. *J Cell Physiol.* 1996;166:105-11.
122. Shimizu MTY, Nitta S. Study of stimulation-secretion coupling in a flow culture system: Periodic secretion of hepatocyte growth factor by interleukin-1 alpha stimulated human embryonic lung fibroblasts. *Biochem Biophys Acta.* 1995;1244:357-62.
123. Shiota G, Kawasaki H, Nakamura T, Schmidt E. Characterization of double transgenic mice expressing hepatocyte growth factor and transforming growth factor alpha. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1995;90:17-24.
124. Borset M, Waage A, Sundan A. Hepatocyte growth factor reverses TGF-beta-induced growth inhibition of CCL-64 cells: a novel bioassay for HGF and implications for TGF-beta bioassay. *J Immunol Methods.* 1996;189:59-64.

125. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 1995;373:699-702.
126. Kaido T, Yamaoka S, Seto S, Funaki N, Kasamatsu T, Tanaka J, i sur. Continuous hepatocyte growth factor supply prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in rats. *FEBS Lett*. 1997;411:378-82.
127. Woolf A, Kolatsi-Joannou M, Hardmna P, Andermacher E, Moorby C, Fine L, i sur. Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and the met receptor in the early development of the metanephros. *J Cell Biol*. 1995;128:171-84.
128. Karp S, Ortiz-Ardian A, Li S, Neilson E. Epithelial differentiation of metanephric mesenchymal cells after stimulation with hepatocyte growth factor or embryonic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:5286-90.
129. Yo Y, Morishita R, Yamamoto K, Tomita N, Kida I, Hayashi S, i sur. Actions of hepatocyte growth factor as a local modulator in the kidney: potential role in pathogenesis of renal disease. *Kidney Int*. 1998;53:50-8.
130. Igawa T, Kanda S, Kanetake H, Saitoh Y, Ichihara A, Tomita Y, et al. Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;174:831-8.
131. Joannidis M, Spokes K, Nakamura T, Faletto D, Cantley L. Regional expression of hepatocyte growth factor/c-met in experimental renal hypertrophy and hyperplasia. *Am J Physiol*. 1994;267:231-6.
132. Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:4357-61.
133. Ishibashi K, Sasaki S, Sakamoto H, Hoshino Y, Nakamura T, Marumo F. Expression of receptor gene for hepatocyte factor in kidney after unilateral nephrectomy and renal injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187:1454-9.
134. Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in mouse model of a chronic renal disease. *J Clin Invest*. 1998;101:1827-34.
135. Libetta C, Rampino T, Esposito C, Fornoni A, Semeraro L, Dal Canton A. Stimulation of hepatocyte growth factor in human acute renal failure. *Nephron*. 1998;80:1-41.
136. Taman M, Liu Y, Tolbert E, Dworkin L. Increase urinary hepatocyte growth factor excretion in human acute renal failure. *Clin Nephrol*. 1997;48:241-5.
137. Vargas G, Hoeflich A, Jehle P. Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality. *Kidney Int*. 2000;57:1426-36.

138. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.
139. Segerer S, Nelson P, Schlöndorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(1):152-76.
140. Rovin B. Chemokine blockade as a therapy of renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000;9(3):225-32.
141. Fiorina P, Ansari M, Jurewicz M, Barry M, Ricchiuti V, Smith R, et al. Role of CXC chemokine receptor 3 pathway in renal ischemic injury. *JASN*. 2006;17(3):716-723.
142. Luster A, Ravetch J. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med*. 1987;166:1084-97.
143. Neville L, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10kD (IP-10): A novel pleiotropic member of the CXC chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997;8:207-19.
144. Qin S, Rottman J, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cell associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*. 1998;101:746-54.
145. Dufour J, Dziejman M, Liu M, Leung J, Lane T, Luster A. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP 10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol*. 2002;168:3195-204.
146. Schaub S, Nickerson P, Rush D, Mayr M, Hess C, Golian M, et al. Urinary CXCL9 and CXCL10 levels correlate with the extent of subclinical tubulitis. *Am J Transplant*. 2009;9:1347-53.
147. Ishibashi N, Weisbrot-Lefkovitz M, Reuhl K, Inouye M, Mirochnichenko O. Modulation of chemokine expression during ischaemia/reperfusion in transgenic mice overproducing human glutathione peroxidases. *J Immunol*. 1999;163:5666-77.
148. Ruster C, Wolf G. The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy. *Front Biosci*. 2008;1(13):944-55.
149. Tang W, Qi M, Warren J, Van G. Chemokine expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *J Immunol*. 1997;159(2):870-6.
150. Vielhauer V, Anders H, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, et al. Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC Chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *JASN*. 2001;12(6):1173-87.

151. Han G, Koike H, Nakatsue T, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, i sur. IFN-inducible protein-10 has a differential role in podocyte during Thy 1.1 glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:3111-26.
152. Panzer U, Steinmetz O, Reinking R, Meyer T, Fehr S, Schneider A, i sur. Compartment-specific expression and function of the chemokine IP-10/CXCL10 in a model of renal endothelial microvascular injury. *JASN.* 2006 17;2:454-64.
153. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, i sur. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European society of hypertension (ESH) and of the European society of cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2013;31(7):1281-357.
154. Đukanović L, Ležaić V, Miljković Đ, Momčilović M, Bukvić D, Marić I, i sur. Transforming growth factor- 1 in Balkan endemic nephropathy. *Nephron Clin Pract.* 2009;111(2):127-32.
155. Đukanović L, Marinković J, Marić I, Ležaić V, Dajak M, Petronić D, i sur. Contribution to the definition of diagnostic criteria for Balkan endemic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(12):3932-8.
156. Levey A, Stevens L, Schmid C, Zhang Y, Castro A, Feldman H, i sur. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-12.
157. Wuyts B, Bernard D, Van Den Noortgate N, Van De Walle J, Van Vlem B, Smet D, i sur. Reevaluation of formulas for predicting creatinine clearance in adults and children using compensated creatinine methods. *Clin Chem.* 2003;49(6):1011-4.
158. Hsu C, Xie D, Waikar S, Bonventre J, Zhang X, Sabbisetti V, i sur. Urine biomarkers of tubular injury do not improve upon the clinical model predicting chronic kidney disease progression. *Kidney Int.* 2017;91(1):196-203.
159. Waikar S, Sabbisetti V, Ärnlöv J, Carlsson AC, Coresh J, Feldman HI, i sur. Relationship of proximal tubular injury to chronic kidney disease as assessed by urinary kidney injury molecule-1 in five cohort studies. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(9):1460-70.
160. Bhavsar N, Köttgen A, Coresh J, Astor B. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule 1 (KIM-1) as predictors of incident CKD stage 3: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Am J Kidney Dis.* 2012;60(2):233-40.
161. Dika Ž, Juras J, Kos J, Edwards K, Fištrek M, Premužić V, i sur. Prevalence, treatment and control of hypertension in a Croatian endemic nephropathy area. *Kidney Blood Press Res.* 2012;35(6):678-86.
162. Dika Ž. Evaluacija dijagnostičkih kriterija za endemsku nefropatiju [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagreb, Medicinski fakultet; 2012.

163. Seibert F, Sitz M, Passfall J, Haesner M, Laschinski P, Buhl M, i sur. Prognostic value of urinary calprotectin, NGAL and KIM-1 in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2018;43(4):1255-62.
164. Liu Y, Yang J. Hepatocyte growth factor: new arsenal in the fights against renal fibrosis? *Kidney Int.* 2006;70(2):238-240.
165. Garlo K, White W, Bakris G, ZAnnad F, Wilson C, Kupfer S, i sur. Kidney biomarkers and decline in eGFR in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(3):398-405.
166. Koyner J, Vaidya V, Bennett M, Ma Q, Worcester E, Akhter S, i sur. Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(12):2154-65.
167. Foster M, Coresh J, Bonventre J, Sabbisetti V, Waikar S, Mifflin T, i sur. Urinary biomarkers and risk of ESRD in the atherosclerosis risk in communities study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(11):1956–63.
168. Graves D, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6(2):109-18.

11. ŽIVOTOPIS

Jelena Kos rođena je 14.08.1980. godine u Osijeku gdje je završila osnovnu i srednju školu. Nakon mature u osječkoj III. gimnaziji 1998. godine, upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje je i diplomirala 2004. godine. Obvezni pripravnički staž odradila je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb 2005. godine i potom položila državni ispit. U srpnju 2006. godine započela je specijalizaciju iz interne medicine. Poslijediplomski studij "Biomedicina i zdravstvo" upisala je 2007.godine. Specijalistički ispit iz interne medicine položila je u prosincu 2010. godine i od tada radi kao specijalist internist u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju KBC-a Zagreb. U svibnju 2011. godine započela je subspecijalizaciju iz nefrologije te je subspecijalistički ispit položila u svibnju 2013. godine.

Koautor je ukupno 16 znanstvenih i stručnih radova od kojih je 7 publicirano u časopisima citiranim u Current Contentsu. Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih kongresa.

Članica je Hrvatskoga liječničkog zbora, Hrvatskoga društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Hrvatskoga društva za hipertenziju, Europskoga društva za hipertenziju i Društva za razvitak nefrologije "Prof.dr.Milovan Radonić".