



Hrvatska agencija za
poljoprivredu i hranu

Croatian Agency for
Agriculture and Food

L'Agence Croate pour
l'Agriculture et l'Alimentation

ZNANSTVENO IZVJEŠĆE
O POJAVNOSTI ARISTOLOHIČNE KISELINE
KAO UZROČNIKA ENDEMSKE NEFROPATIJE U
REPUBLICI HRVATSKOJ

Danijela Stražanac, Andrea Gross – Bošković, Jasenka Ćosić, Maja Peraica, Bojan Šarkanj,
Martina Jurković, Sanja Miloš, Dražen Knežević

CENTAR ZA SIGURNOST HRANE

Ivana Gundulića 36b, 31000 Osijek, tel: +385 31 214 900, e-mail: csh@hapih.hr, www.hapih.hr

MB:2528614, OIB: 35506269186, IBAN: HR1210010051863000160

Dokument izrađen temeljem zahtjeva Centra za sigurnost hrane

Usvojeno 22.08.2022.

Dostupno na: <https://www.hapih.hr/csh/upisnik-znanstvenih-misljenja/>

DOI: 10.5281/zenodo.7398068

Korespondencija: info.csh@hapih.hr

Klasa: 641-02/21-01/00001

Ur. broj: 396-08-22-40

ČLANOVI AD HOC RADNE GRUPE - AUTORI

1. Danijela Stražanac, dipl. ing., Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu
2. Andrea Gross - Bošković, dipl. ing. preh. teh. i bioteh., Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu
3. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
4. Dr. sc. Maja Peraica, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
5. Izv. prof. dr. sc. Bojan Šarkanj, Sveučilište Sjever, Sveučilišni centar Koprivnica

VANJSKI ČLANOVI

1. Dr. sc. Martina Jurković, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu
2. Dr. sc. Sanja Miloš, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu
3. Dr. sc. Dražen Knežević, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu

Izjave o sukobu interesa:

Autori nisu bili u izravnom ili neizravnom, financijskom, gospodarskom ili bilo kojem drugom osobnom interesu koji bi se mogao smatrati štetnim za njihovu nepristranost i neovisnost u okviru izrade ovog dokumenta.

Zahvale:

Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Centar za sigurnost hrane zahvaljuje se prof. dr. sc. Jasni Bošnjir s Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „dr. Andrija Štampar“ na sudjelovanju u istraživačkom dijelu projekta kao i svim članovima *ad hoc* Radne grupe na doprinosu prilikom izrade ovog Znanstvenog izvješća.

Predloženo citiranje:

Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, *Ad hoc* radna grupa, Stražanac D, Gross-Bošković A, Ćosić J, Peraica M, Šarkanj B, Jurković M, Miloš S, Knežević D (2022): Znanstveno izvješće o pojavnosti aristolohične kiseline kao uzročnika endemske nefropatije u Republici Hrvatskoj.

Sažetak

Aristolohična kiselina obuhvaća skup prirodno prisutnih nitrofenantrenskih karboksilnih kiselina, a uglavnom se misli na aristolohičnu kiselinu I (AK I) i II (AK II). Nalazi se u stabljici i sjemenkama biljaka iz roda *Aristolochia spp.* (vučja stopa) koje su rasprostranjene svugdje u svijetu. Smatra se da je aristolohična kiselina odgovorna za nastanak endemske nefropatije (EN). To je kronična tubulointersticijska nefropatija ljudi koja se nakon višegodišnjeg asimptomatskog razdoblja klinički očituje terminalnim bubrežnim zatajenjem.

Aristolohična kiselina je dokazano nefrotoksična, mutagena i karcinogena, a karakteristično zahvaća dva ciljna tkiva: stanice proksimalnog bubrežnog tubula i urotelne stanice. Međunarodna agencija za istraživanje raka (*engl. The International Agency for Research on Cancer, IARC*) 2012. godine je aristolohičnu kiselinu uvrstila u grupu 1, odnosno kao karcinogenu za ljude jer su zaključili da postoji dovoljno dokaza da izaziva karcinom bubrežne nakapnice i mokraćovoda.

Na području Republike Hrvatske u zapadnoj brodskoj Posavini nalazi se žarište endemske nefropatije. Budući da nedostaju podaci o izloženosti populacije Republike Hrvatske aristolohičnoj kiselini, a posebice populacije u endemskom kraju Znanstveni odbor za kemijske opasnosti Hrvatske agencije za hranu (sadašnja Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu) predložio je trogodišnje istraživanje pod nazivom „*Citrinin i aristolohična kiselina kao kontaminanti žitarica i potencijalni uzročnici endemske nefropatije*“ u žitaricama (pšenica, ječam, kukuruz) u četiri hrvatske županije (Brodsko-posavske, Osječko-baranjske, Koprivničko-križevačke i Međimurske). Rezultati navedenog istraživanja korišteni su u izradi ovog Znanstvenog izvješća.

Rezultati istraživanja pokazuju kako je utvrđen vrlo visoki postotak uzoraka u kojima je koncentracija aristolohične kiseline I ispod granice kvantifikacije (LOQ), te da je samo 4,17 % uzoraka bilo iznad LOQ u koncentracijama od 1,36 mg/kg do 93 mg/kg. Također, u ovom istraživanju nije nađen niti jedan uzorak žitarica kontaminiran aristolohičnom kiselinom II s koncentracijom većom od LOQ (1 mg/kg).

Usporedbom rezultata koncentracije aristolohične kiseline u uzorcima koji su prikupljeni 2017., 2018. i 2019. godine, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji aristolohične kiseline I ($p=0,25$) tijekom te tri godine. Nadalje, statističkom analizom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika između kontaminiranosti različitih vrsta žitarica ($p=0,4953$), kao i da nema statistički značajne razlike u distribuciji pozitivnih uzoraka po županijama ($p=0,65$). Statistička analiza podataka provedena je upotrebom Statistika 13.3. softverskog paketa.

Stoga, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da se pojavnost aristolohične kiseline I ne može povezati s pojavom endemske nefropatije u Republici Hrvatskoj te da kontaminiranost žitarica aristolohičnom kiselinom I i II ne predstavlja zdravstveni rizik za ljude.

Ključne riječi: endemska nefropatija, aristolohična kiselina, žitarice, pojavnost, Republika Hrvatska

Summary

Aristolochic acid includes a group of naturally occurring nitro phenanthrene carboxylic acids, but usually this refers to aristolochic acid I (AA I) and aristolochic acid II (AA II). It could be found in the stem and seeds of plants from the genus *Aristolochia* spp., which are widespread all over the world. It is believed that aristolochic acid is responsible for the development of endemic nephropathy (EN). This is a chronic tubulointerstitial nephropathy in humans, which is clinically manifested by terminal renal failure after an asymptomatic period of several years.

Aristolochic acid is proven to be nephrotoxic, mutagenic and carcinogenic. Characteristically it affects two target tissues: cells of the proximal renal tubule and urothelial cells. In 2012 the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified aristolochic acid in group 1, i.e. as a human carcinogen, because there were sufficient evidence that it causes cancer of the renal tubule and ureter.

On the territory of the Republic of Croatia, more precisely in west Brod of Posavina, a center of endemic nephropathy was found. Since there is a lack of data on the exposure of the population of the Republic of Croatia to aristolochic acid, especially the population in the endemic area, the Scientific panel on chemical hazards of the Croatian Food Agency (now the Croatian Agency for Agriculture and Food) proposed a three-year research study entitled "Citrinine and aristolochic acid as cereal contaminants and potential agent of endemic nephropathy" in cereals (wheat, barley, corn) in four Croatian counties (Brod-Posavina, Osijek-Baranja, Koprivnica-Križevci and Međimurje). The results of the research were used for preparation of this scientific report.

The research results show a very high percentage of samples with the concentration of AA I below the limit of quantification (LOQ), and only 4,17% of the samples were above the LOQ in concentration ranging from 1.36 mg/kg to 93 mg/kg. Also, in this research a sample contaminated with AA II with a concentration higher than the LOQ (1 mg/kg) was not found.

By comparing the results of the concentration of aristolochic acid in samples collected in 2017, 2018 and 2019, no statistically significant difference in the concentration of aristolochic acid I ($p=0.25$) was found. Furthermore, the statistical analysis found that there is no statistically significant difference between the contamination of different types of cereals ($p=0.4953$), as well as that there is no statistically significant difference in the distribution of positive samples by counties ($p=0.65$). Statistical data analysis was performed using Statistics 13.3. software package.

Therefore, the results of this research indicate that the occurrence of aristolochic acid I (AA I) cannot be associated with endemic nephropathy in the Republic of Croatia and the contamination of cereals with aristolochic acid I and II does not pose a health risk for humans.

Key words: endemic nephropathy, aristolochic acid, cereals, occurrence, Republic of Croatia

SADRŽAJ

Sažetak	1
Summary	2
1. Uvod.....	4
1.1. Pozadina slučaja	6
2. Podatci i metode.....	7
2.1. Podatci o rezultatima analiza aristolohične kiseline	7
2.1.1. Uzorkovanje	7
2.1.2. Analiza uzoraka.....	8
2.1.3. Rezultati analiza aristolohične kiseline	8
2.2. Metode statističke obrade podataka	9
3. Rezultati	10
4. Zaključci	13
5. Literatura	14
6. Rječnik	15
7. Skraćenice	16

1. Uvod

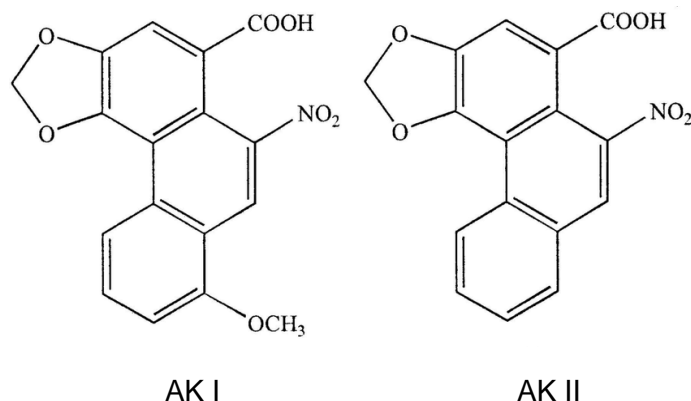
Na području Republike Hrvatske nalaze se geografski ograničena područja na kojima se pojavljuje endemska nefropatija. Endemska nefropatija (EN), poznata još i kao balkanska endemska nefropatija, je kronična tubulointersticijska nefropatija koja se nakon višegodišnjeg asimptomatskog tijeka klinički očituje terminalnim bubrežnim zatajenjem (Dika, 2012; Čević i sur., 1996).

Službeni naziv endemska nefropatija prihvatila je i Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World health organisation, WHO*) još 1964. godine kada su određeni i prvi dijagnostički kriteriji. Prema tada prihvaćenoj definiciji radi se o nefropatiji od koje obolijeva starije stanovništvo, poglavito poljoprivrednici u pojedinim selima smještenim u žarištima koja se nalaze u nizinama velikih pritoka rijeke Dunav na području današnjih zemalja Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Bugarske, Rumunjske i Srbije. Oboljeli od EN imaju znatno veću učestalost karcinoma prijelaznog epitela mokraćovoda.

U Hrvatskoj je bolest prvi put opisana 1959. godine, premda postoje i klinički opisi i iz 1948. godine, a prema zapisima iz crkvenih knjiga bubrežna bolest bila je učestala i prije Drugoga svjetskog rata. Prvo zahvaćeno selo koje se u Hrvatskoj spominje jest Slavonski Kobaš te se bolest u narodu zvala i kobaška bolest (Jelaković i sur., 2015). Bolest nije uočena kod djece, već samo kod osoba starijih od 18 godina, što upućuje da su oboljeli dugotrajno izloženi uzročnicima ove bolesti.

Tijekom zadnjih 50-ak godina koliko se istražuje i prati ova bolest, razmatrane su brojne hipoteze o njezinim uzročnicima. Tako su redom odbačene teorije o teškim metalima, virusima, imunskim poremećajima, kao i o nasljeđu. Međutim, Voice i sur. (2006) su u svom istraživanju mogućih okolišnih čimbenika koji bi mogli biti uzrok endemske nefropatije izdvojili aristolohičnu kiselinu (AK) i okratoksin A, dok se kao mogući etiološki uzročnik EN spominje i citrinin (Pavlinić i sur., 2010; Cvitković, 2012; Đurović, 2015; Čulig i sur., 2017). Danas se smatra da je aristolohična kiselina, fitotoksin iz biljke vučje stope glavni rizični čimbenik i uzročnik EN i pridruženih karcinoma prijelaznog epitela mokraćnog sustava (Dika, 2012; Jelaković i sur., 2015; Halinčić, 2019), pri čemu još uvijek nije jasno zbog čega se EN javlja u geografski ograničenim područjima te je li populacija u tim područjima više izložena aristolohičnoj kiselini.

Aristolohična kiselina obuhvaća skup prirodno prisutnih nitrofenantrenskih karboksilnih kiselina. Nalazi se u stabljici i sjemenkama biljaka iz roda *Aristolochia spp.* (vučja stopa) koje su rasprostranjene svugdje u svijetu i prepoznata je kao toksin odgovoran za endemsku nefropatiju i nefropatiju kineskih trava (Grollman, 2009; Halinčić, 2019). Kada se govori o aristolohičnoj kiselini uglavnom se misli na aristolohičnu kiselinu I (AK I) i II (AK II) (Slika 1). Istraživanja su pokazala da je za promjene koje dolaze na bubrežnom tkivu odgovorna AK I (Jelaković i sur., 2015).



Slika 1. Kemijska struktura aristolohične kiseline I i II

Aristolochia clematitis je korovna i ruderalna biljna vrsta koja nije prisutna samo u Posavini u područjima na kojima se javlja endemska nefropatija, već je riječ o biljci koju nalazimo širom Hrvatske, ali i u mnogim zemljama svijeta (raširena je na širokom prostoru srednje Europe, na otocima Sredozemlja, u Aziji i Sjevernoj Americi). Naraste od 80 do 90 cm, a na stabljici ima sroljike listove u čijim su pazušcima žuti cvjetovi. Plod u obliku tobolca veličine oraha ima sjemenke koje sazrijevaju krajem ljeta i početkom jeseni, to jest nakon žetve žitarica. Svi dijelovi biljke, a osobito sjemenke sadržavaju otrovni alkaloid aristolohin i aristolohičnu kiselinu. Biljka ima neugodan miris i okus te je životinje na paši izbjegavaju, iako sasušenu i pomiješanu sa sijenom ipak pojedu (Čeović, 2019). Postoji teoretska mogućnost da se sjemenke vučje stope mogu pomiješati sa sjemenkama pšenice prilikom žetve te se pretpostavlja da ljudi mogu biti izloženi aristolohičnoj kiselini konzumirajući pšenicu odnosno kruh proizveden u domaćinstvu (Jelaković i sur., 2019).

Aristolohična kiselina je dokazano nefrotoksična, mutagena i karcinogena, a karakteristično zahvaća dva ciljna tkiva: stanice proksimalnog bubrežnog tubula i urotelne stanice (Karanović, 2015). Međunarodna agencija za istraživanje raka (*engl. The International Agency for Research on Cancer, IARC*) 2012. god. je aristolohičnu kiselinu uvrstila u grupu 1, odnosno kao karcinogenu za ljude jer su zaključili da postoji dovoljno dokaza da izaziva rak bubrežne nakapnice i mokraćovoda.

Aristolohična kiselina I i II u ljudskom se organizmu metaboliziraju i izlučuju kao inertni neaktivni metaboliti. No, kod nekih osoba sa predispozicijom reaktivni neutronske oblike metabolita aristolaktama veže se kovalentnom vezom za purinske baze adenin i gvanin. Nastali adukti, posebno deoksiadenozin-aristolaktam I, odgovorni su za mutagena i karcinogena svojstva AK. Mogu se koristiti kao biljezi prethodne izloženosti AK jer u organizmu ostaju doživotno (Halinčić, 2019). Sljedeća faza metabolizacije AK rezultira prisutnošću metabolita AK u urinu i fecesu u konjugiranoj formi poput glukuronida, sulfata ili acetatnih estera (Karanović, 2015).

Dijagnoza nefropatije uzrokovane aristolohičnom kiselinom može se smatrati sigurnom kod osobe koja boluje od bubrežnog zatajenja u kombinaciji sa 2 od 3 sljedeća kriterija:

hipocelularna intersticijska fibroza s kortikomedularnim gradijentom, anamneza konzumacije biljnih pripravaka koji sadrže AK te prisutnost aristolaktam-DNA adukata ili specifične A:T→T:A mutacije na TP53 genu. Dijagnoza je vrlo vjerojatna ako je prisutan samo 1 od 3 navedena kriterija.

Na EN treba posumnjati kod osoba koje žive u kućanstvu zajedno s osobom oboljelom od EN-a te imaju neki od kliničkih znakova (tubularna proteinurija, smanjen eGFR, karcinom prijelaznog epitela, anemija). Cjelokupnu odraslu populaciju endemskih sela trebalo bi podvrgnuti probiru za EN svakih 5 godina na kojem bi se provjeravala tubularna proteinurija, eGFR, crvena krvna slika, analiza urina test trakicom i citologija urina. Članovi kućanstava u kojima žive osobe oboljele od EN-a i osobe za koje se sumnja da boluju od EN-a trebale bi se testirati jednom godišnje. Pacijenti sa zatajenjem bubrega nepoznatog uzroka iz neendemskih naselja i članovi njihovih kućanstava trebali bi se također testirati zbog sporadičnog EN-a. Liječenje EN-a u završnom stadiju bubrežne bolesti zahtijeva nadomještanje bubrežne funkcije peritonejskom dijalizom, hemodijalizom ili transplantacijom bubrega. No, osobe koje boluju od EN-a su pod rizikom za razvoj karcinoma prijelaznog epitela pa bi im prije transplantacije trebalo učiniti bilateralnu nefroureterektomiju (Halinčić, 2019).

1.1. Pozadina slučaja

Republika Hrvatska je jedna od zemalja u kojoj je registrirana endemska nefropatija, a čiji je naziv 1964. godine prihvatila i Svjetska zdravstvena organizacija. Radi se o tubulointersticijskoj nefropatiji od koje oboljeva starije stanovništvo, poglavito poljoprivrednici u pojedinim selima, dok kod djece takve promjene na bubrezima nisu evidentirane. Bolest je zabilježena i u Bugarskoj, Bosni i Hercegovini, Rumunjskoj i Srbiji. Istraživanja su dovela do saznanja da postoje vanjski čimbenici koji kroz dulje vrijeme izloženosti uzrokuju promjene na bubrezima koje dovode do EN-a. Posljednja istraživanja su pak pokazala da EN često prati izloženost i fitotoksinu aristolohičnoj kiselini koju proizvodi *Aristolochia clematitis* (vučja stopa) čije sjeme može dospjeti u brašno žitarica.

Budući da se na području Republike Hrvatske nalaze i područja na kojima se pojavljuje endemska nefropatija, a do sada nije provedeno niti jedno istraživanje o kontaminiranosti žitarica aristolohičnom kiselinom, Znanstveni odbor za kemijske opasnosti Hrvatske agencije za hranu (sadašnja Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu) predložio je trogodišnje istraživanje pod nazivom „*Citrinin i aristolohična kiselina kao kontaminanti žitarica i potencijalni uzročnici endemske nefropatije*“ u žitaricama (pšenica, ječam, kukuruz) u četiri hrvatske županije (Brodsko-posavske, Osječko-baranjske, Koprivničko-križevačke i Međimurske).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost citrinitina i aristolohične kiseline u uzorcima pšenice, ječma i kukuruza u odabranim hrvatskim županijama, a sve u svrhu prikupljanja podataka o mogućoj pojavnosti ovih kontaminanata.

Za potrebe izrade ovog izvješća 2021. godine osnovana je ad hoc Radna grupa za evaluaciju i usvajanje *Znanstvenog izvješća o citrinitinu i aristolohičnoj kiselini kao kontaminantima žitarica i potencijalnim uzročnicima endemske nefropatije* koja je zaključila kako će se ova dva kontaminanta promatrati i raspisati u dva odvojena Znanstvena izvješća.

2. Podatci i metode

2.1. Podatci o rezultatima analiza aristolohične kiseline

2.1.1. Uzorkovanje

Uzorci tri vrste žitarica (pšenica, ječam, kukuruz) roda 2017., 2018. i 2019. godine uzorkovani su u četiri županije: Osječko-baranjskoj, Brodsko-posavskoj, Virovitičko-podravskoj i Međimurskoj županiji. Uzorkovanje su obavili djelatnici Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, nakon čega su se uzorci podvrgnuli laboratorijskim analizama na aristolohičnu kiselinu I i aristolohičnu kiselinu II. Za aristolohičnu kiselinu I i II granica kvantifikacije (LOQ) iznosi 1 mg/kg.

Uzorkovano je ukupno 360 uzoraka (po 120 uzoraka godišnje). Raspodjela broja uzoraka u kojima je mjerena koncentracija aristolohične kiseline I i II prema godinama, županiji i vrsti žitarice prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1: Raspodjela broja uzoraka prema godini uzorkovanja, županiji i vrsti žitarice

Županija	Ječam	Pšenica	Kukuruz
2017. godina			
Brodsko-posavska	7	8	15
Osječko-baranjska	6	9	15
Međimurska	7	8	15
Virovitičko- podavska	5	10	15
Ukupno	25	35	60
2018. godina			
Brodsko-posavska	10	10	9
Osječko-baranjska	10	10	10
Međimurska	10	10	10
Virovitičko- podavska	8	13	10
Ukupno	38	43	39
2019. godina			
Brodsko-posavska	10	10	10
Osječko-baranjska	10	10	10
Međimurska	10	9	11
Virovitičko- podavska	10	10	10
Ukupno	40	39	41

2.1.2. Analiza uzoraka

Analize uzoraka na prisustvo aristolohične kiseline provedene su u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe – Referentnom centru za analize zdravstvene ispravnosti hrane Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske.

Uzorak za određivanje koncentracije aristolohične kiseline pripremljen je na način da se u 10 g homogeniziranog uzorka dodalo 100 mL 75 % metanola. Nakon 20 min ekstrakcije na magnetskoj miješalici, uzorak je filtriran kroz membranske filtere od 0,45 µm.

Koncentracije aristolohične kiseline (AK I i AK II) izmjerene su na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) pomoću UV-Vis detektora koja se pokazala kao dobra tehnika za određivanje ovih spojeva u sličnim istraživanjima. Primijenjena metoda je razvijena u laboratoriju (in-house) NZZJZ „Dr. Andrija Štampar“.

Uvjeti kromatografiranja:

Kolona: Eclipse XDB 250 x 4,6 mm, 5 µm

Temperatura pećnice: 30°C

Mobilna faza: metanol: voda:octena kiselina (73:26:1)

Protok: 1 ml/min

Valna duljina: 250 nm

Volumen injektiranja: 20 µL

Retencijsko vrijeme: AK I 6,9 min; AK II 5,9 min

Iskorištenje metode: 97 %

RSD: 3,2

2.1.3. Rezultati analiza aristolohične kiseline

U Tablici 2 prikazan je ukupan broj uzoraka pšenice, ječma i kukuruza koji su uzorkovani tijekom 2017., 2018. i 2019. godine, te je vidljivo kako je od ukupno 360 analiziranih uzoraka njih 345 bilo ispod granice kvantifikacije, što iznosi 95,83 %.

U 2019. godini je u odnosu na 2017. i 2018. bio najveći udio uzoraka ječma ispod granice kvantifikacije (100 %), dok su uzorci kukuruza u 2017. godini imali najveći udio uzoraka ispod granice kvantifikacije.

Tablica 2: Broj uzoraka po vrsti žitarice te broj uzoraka ispod granice kvantifikacije (LOQ)

Vrsta žitarice	Ukupan broj uzoraka	Broj uzoraka ispod LOQ ^(a)	Udio uzoraka ispod LOQ (%) ^(b)
2017. godina			
ječam	25	23	92,00
pšenica	35	35	100,00
kukuruz	60	60	100,00
Ukupno 2017.g.	120	118	98,33
2018. godina			
ječam	38	34	89,47
pšenica	43	43	100,00
kukuruz	39	35	89,74
Ukupno 2018.g.	120	112	93,33
2019. godina			
ječam	40	40	100,00
pšenica	39	36	92,31
kukuruz	41	39	95,12
Ukupno 2019.g.	120	115	95,83
Ukupno	360	345	95,83

(a): LOQ (engl. *limit of quantitation*) granica kvantifikacije;

(b): Udio uzoraka u kojima aristolohična kiselina I nije kvantificirana

Za aristolohičnu kiselinu II svi su uzorci bili ispod granice kvantifikacije koja iznosi 1 mg/kg te stoga nisu prikazani u Tablici 2.

2.2. Metode statističke obrade podataka

Statistička analiza podataka provedena je upotrebom Stastika 13.3. softverskog paketa. Na početku analize ispitana je normalnost distribucije podataka pomoću Shapiro-Wilksovog *W* testa, te homogenost varijance pomoću Levenovog testa.

Zbog izuzetno malog broja pozitivnih (kvantificiranih) rezultata iznad limita detekcije, distribucija podataka je značajno zamaknuta i nije bilo normalne distribucije ($p < 0,05$).

Levenov test je također pokazao da varijanca nije homogena te su sukladno s tim rezultatima primijenjeni neparametrijski testovi. U ovom istraživanju mjerene su koncentracije aristolohične kiseline I i aristolohične kiseline II, ali budući da nije bilo uzoraka koji su sadržavali aristolohičnu kiselinu II ti rezultati nisu mogli biti statistički obrađeni.

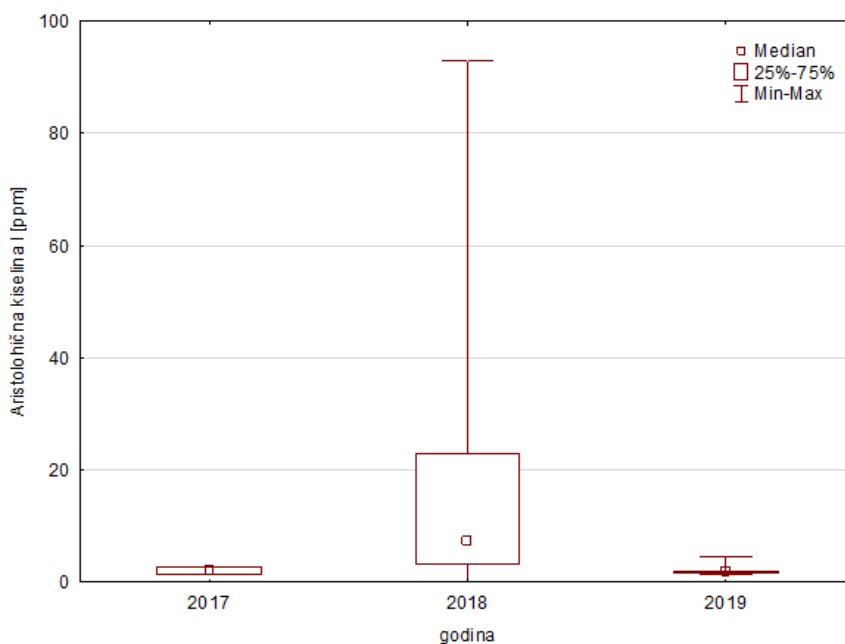
S obzirom na to da izuzetno mali broj pozitivnih rezultata za aristolohičnu kiselinu I u pojedinim podatkovnim skupinama (godine, vrsta žitarice, županije) uzrokuje veliku nesigurnost, ta je činjenica uzeta u obzir prilikom donošenja zaključaka.

Za usporedbu razlike u distribuciji podataka o koncentraciji aristolohične kiseline I između ispitivanih godina, različitih vrsta žitarica i županija korišteni su Kruskal-Wallis ANOVA test i Mann-Whitney U test.

3. Rezultati

Obrada podataka pokazala je da postoji statistički značajna razlika u distribuciji podataka kod utvrđene koncentracije aristolohične kiseline I između ispitivanih godina (2017.-2019., $p=0,25$).

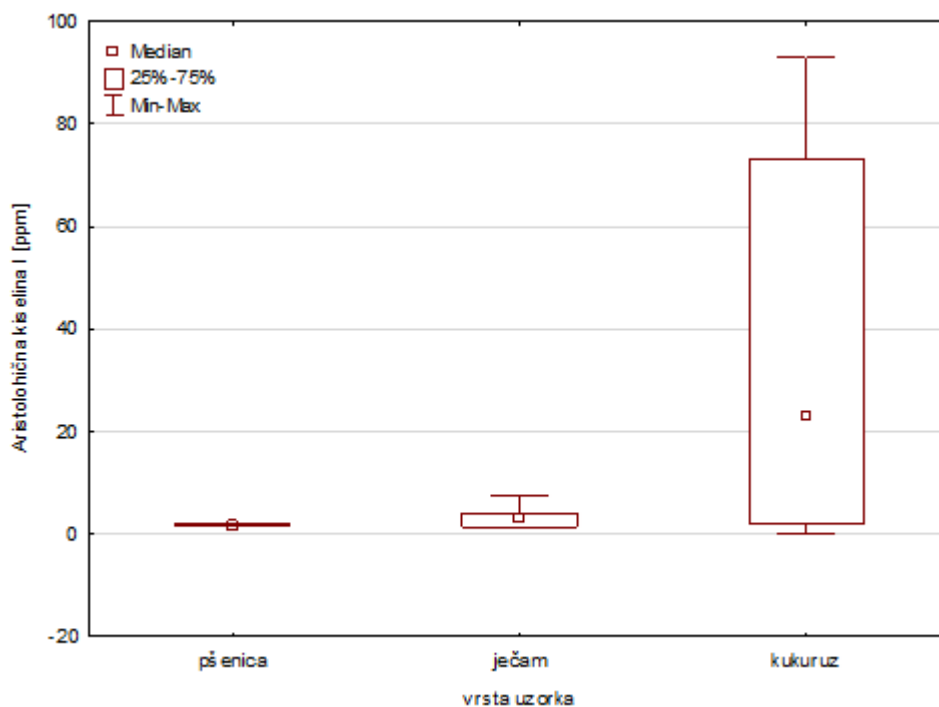
Iz Slike 2. vidljivo je da je 2017. godine bilo samo dva pozitivna rezultata, dok je 2018. godina imala najviše rezultate, medijan i interkvartilnu vrijednost. Ukoliko se izbací 2017. godina kao godina sa premalo podataka za statističku analizu, usporedbom 2018. i 2019. godine pomoću Mann-Whitney U testa opet nije dobivena statistički značajna razlika u distribuciji podataka koncentracije aristolohične kiseline I između dviju godina ($p=0,18$).



Slika 2. Usporedba koncentracije aristolohične kiseline I prema godinama uzorkovanja

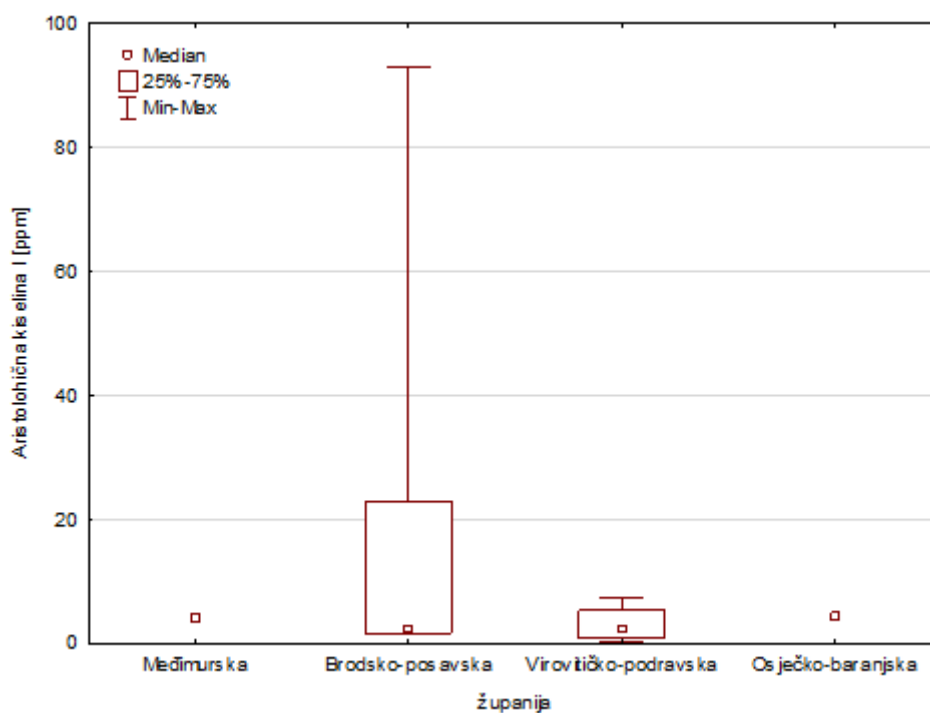
Pomoću Kruskal-Wallis ANOVA testa uspoređene su i razlike u distribuciji podataka između različitih vrsta žitarica. Test je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika između različitih vrsta žitarica ($p=0,4953$), što je prikazano u kutijastim dijagramom na Slici 3. Vidljivo je kako je najviša koncentracija i najviši medijan detektiran na uzorcima kukuruza, dok su uzorci pšenice imali najniži medijan i interkvartilni raspon. Treba napomenuti da su nađena samo tri pozitivna uzorka pšenice, što nije dovoljno za statističku obradu te bi bilo potrebno ponoviti istraživanje s većim brojem uzoraka ili osjetljivijom metodom, kako bi se dobio dostatan broj uzoraka s pozitivnim rezultatima za statističku analizu. Kad se usporede samo

ječam i kukuruz Mann-Whitney U testom, i dalje se ne dobije statistički značajna razlika ($p=0,17$) iako postoji velika razlika u medijalnoj vrijednosti i interkvartalnom rasponu koji je značajno viši kod kukuruza.



Slika 3. Usporedba koncentracije aristolohične kiseline I u različitim vrstama uzoraka žitarica

Usporedbom distribucije podataka o koncentraciji aristolohične kiseline I u uzorcima iz različitih županija Kruskal-Wallis ANOVA testom potvrđeno je da nema statistički značajne razlike između distribucije podataka po županijama ($p=0,65$). Iz Slike 4. može se vidjeti da su županije s najvišim detektiranim vrijednostima Brodsko-posavska i Virovitičko-podravska, dok Međimurska i Osječko-baranjska županija imaju samo jedan pozitivan rezultat. Korištenjem dodatnog statističkog Mann-Whitney U testa, kojim su uspoređeni podaci samo za Brodsko-posavsku i Virovitičko-podravsku županiju, također se zaključuje kako ne postoji statistički značajna razlika između rezultata ($p=0,29$).



Slika 4. Usporedba koncentracije aristolohične kiseline I u uzorcima sakupljenim u različitim županijama

4. Zaključci

Rezultati mjerenja koncentracije aristolohične kiseline I i II pokazuju veliki postotak uzoraka u kojima je koncentracija aristolohične kiseline bila ispod LOQ vrijednosti. Utvrđen je vrlo visoki postotak uzoraka u kojima je koncentracija aristolohične kiseline I ispod granice kvantifikacije (LOQ), a samo 4,17 % uzoraka je bilo iznad LOQ u koncentracijama od 1,36 mg/kg do 93 mg/kg. Osim toga, nije utvrđen niti jedan uzorak žitarica kontaminiran aristolohičnom kiselinom II s koncentracijom većom od LOQ (1 mg/kg).

Usporedba rezultata analize uzoraka sakupljenih godine 2017., 2018. i 2019. pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji aristolohične kiseline I ($p=0,25$) u navedenim godinama. Nadalje, statističkom analizom je utvrđeno da ne postoji statistički značajna razlika između kontaminiranosti različitih vrsta žitarica ($p=0,4953$), kao i da nema statistički značajne razlike u distribuciji pozitivnih uzoraka po županijama ($p=0,65$).

Razlog opadanja broja uzoraka žitarica u kojima je utvrđena aristolohična kiselina zasigurno je pristup zaštiti od korova koji je danas značajno drugačiji u konvencionalnoj i integriranoj proizvodnji od onoga prije 20 (30) i više godina. Danas se usjevi intenzivno štite od korova herbicidima, polja su vrlo slabo zakorovljena tako da je i vjerojatnost kontaminacije zrna sjemenkama *A. clematitis* mala. U prilog navedenom govore i rezultati istraživanja Hranjec i sur. (2005) koji navode da su oboljeli s područja gdje se EN javljala prije 30-40 godina uvijek ili često pronalazili biljke *A. clematitis* u usjevu pšenice, dok je ove biljke u vrijeme provođenja istraživanja bilo značajno manje.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da se pojavnost aristolohične kiseline I ne može povezati s pojavom endemske nefropatije u Republici Hrvatskoj te da kontaminiranost žitarica aristolohičnom kiselinom I i II ne predstavlja zdravstveni rizik za ljude.

5. Literatura

Cvitković A (2012): Međudjelovanje dijagnostičkih biljega endemske nefropatije. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Čeović S, Miletić Medved M (1996): Epidemiological features of endemic nephropathy in focal area of Brodska Posavina, Croatia. U: Čvorišćec, Čeović, Stavljenić-Rukavina, ur. Endemic nephropathy in Croatia, Zagreb: Academia Croatica scientiarum medicarum.

Čeović S (2019): Dugogodišnje praćenje i istraživanje endemske nefropatije i prijepori oko njezine etiologije. *Liječnički Vjesnik*, 141:45–47.

Čulig B, Bevardi M, Bošnjir J, Serdar S, Lasić D, Racz A, Galić A, Kuharić Ž (2017): Presence of citrinin in grains and its possible health effects. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(3): 22–30.

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

Đurović I (2015): Citrinin u dodacima prehrani na bazi crvene riže – potencijalni rizik za zdravlje ljudi. Diplomski rad. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Grollman AP, Scarborough J, Jelaković B (2009): Aristolochic acid nephropathy: an environmental and iatrogenic disease. *Advances in Molecular Toxicology*, 3:211–27.

Halinčić M (2019): Toksične nefropatije. Diplomski rad. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Hranjec T, Kovač A, Kos J, Mao W, Chen JJ, Grollman AP, Jelaković B (2005): Endemic nephropathy: the case for chronic poisoning by Aristolochia. *Croatian Medical Journal* 46:116-125.

IARC, International Agency for Research on Cancer <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/>

Jelaković B, Dika Ž, Karanović S, Vuković-Lela I (2015): Endemska nefropatija u Hrvatskoj. *Liječnički Vjesnik*, 137:100-108.

Karanović S (2015): Molekularno profiliranje karcinoma prijelaznog epitela gornjega dijela mokraćnoga sustava u nefropatiji aristolohične kiseline. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb.

Pavlinić I, Puntarić D, Bošnjir J, Lasić D, Barušić L, Jergović M, Miškulin M, Puntarić I, Katarina Vučić K (2010): Istraživanje okratoksina A u ječmu – doprinos mikotoksinskoj hipotezi nastanka endemske nefropatije. *Medica jadertina*, 40(3-4):59-65.

Voice TC, Long DT, Radanović Z, Atkins JL, McElmurry SP, Niagolova ND, Dimitrov P, Petropoulos EA, Ganev VS (2006): Critical evaluation of environmental exposure agents suspected in the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Int J Occup Environ Health*, 12:369–76.

6. Rječnik

LOQ	Minimalna koncentracija tvari koja se može odrediti kvantitativno s prihvatljivom točnošću i dosljednošću. LOQ može biti ekvivalentan LOD-u ili može biti na mnogo višoj koncentraciji. LOQ ne može biti manji od LOD-a. Često je LOQ približno 3 puta veći od LOD-a.
NDK	Zakonski određena najveća dopuštena količina nekog kontaminanta u hrani i hrani za životinje.
NOAEL	Najveća koncentracija ili količina tvari, pronađena eksperimentom ili promatranjem, koja ne uzrokuje štetne promjene morfologije, funkcionalnih sposobnosti, rasta i razvoja organizma.

7. Skraćenice

DHMZ	Državni hidrometeorološki zavod
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane
EN	Endemska nefropatija
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka
LOQ	granica kvantifikacije
NDK	najveća dopuštena količina
NOAEL	najveća koncentracija tvari koja ne uzrokuje štetne promjene
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija