

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

Srđan Živojinov

**RAZVOJ ANIMALNOG MODELA
NEFROTOKSIČNE TUBULOINTERSTICIJALNE
LEZIJE**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2016 godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Srđan Živojinov
Mentor: MN	Prof. dr Dušan Lalošević
Naslov rada: NR	Razvoj animalnog modela nefrotoksične tubulointersticijalne lezije
Jezik publikacije: JP	srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp./eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016

Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Republika Srbija, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	Rad sadrži 8 poglavlja, 110 stranica, ilustrovan sa 18 slika, 40 tabela, 10 grafikona i 161 literaturnih navoda
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Urologija
Predmetna odrednica, ključne reči:	Aristolohija; Biljni ekstrakti; Bubrežni kanali; Aristolohična kiselina + toksičnost; Bubrežne bolesti + hemijski izazvane; Balkanska nefropatija; Animalni modeli
UDK	616.61:615.322.099]-091.8 612.085.1:598.323.4
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>U eksperimentalnem postupku disertacije miševi NMRI soja su tretirani infuzom biljke <i>Aristolochia clematidis</i>. Sasušeni listovi, grane i plodovi biljke potopljeni su u ključalu vodu i ostavljeni 3-5 sati da stoje, a potom su profiltrirani kroz filter papir. Pravljen je rastvor biljke/vode od 10g/ 1000ml (1%), 20g/ 1000ml (2%) i 40g/ 1000ml (4%). Različite koncentracije infuza su date miševima da piju u neograničenoj količini u periodu od 7 nedelja. Tako su formirane tri ispitne grupe, prva koja je primala 1% infuz, druga 2% infuz i treća 4% infuz i kontrolna grupa koja je dobijala samo vodu da pije. U svakoj grupi je bilo 20 životinja. Tako je razvijen animalni model hronične toksičnosti.</p> <p>Na kraju eksperimenta je urađena patohistološka analiza bubrega, makroskopski pregled organa i merenje diureze tokom trajanja eksperimenta. Urađena je kompletna analiza urina koja podrazumeva utvrđivanje: boje, izgleda, pH, specifične težine, proteina i sedimenta urina.</p>

Analize urina ponavljane su na svakih 7 dana u toku 7 nedelja istraživanja. Na kraju eksperimenta urađena je analiza biohemijskih parametara (glukoza, urea, kreatinin, mokraćna kiselina, ukupni bilirubin, direktni bilirubin, ukupni tj. totalni proteini, natrijum i kalijum) i analiza kompletne krvne slike.

Utvrđeno je da je *Aristolochia clematitis* izrazito nefrotoksična biljka. Utvrđene su patohistološke promene tubula i intersitijuma NMRI miša, koje su bile najveće u ispitnoj grupi koja je primala najaču dozu. Ustanovljene patohistološke promene su slične opisanim patohistološkim promenama tubulointerstitijuma bolesnika obolelih od Balkanske endemske nefropatije. Nije ustanovljeno postojanja karcinoma gornjeg urotrakta. Makroskopskim pregledom prilikom obdukcije eksperimentalnih životinja nisu ustanovljene značajnije promene bubrega. Došlo je prvo do izrazitog porasta diureze u prvoj, odnosno drugoj nedelji praćenja, kod druge i treće eksperimentalne grupe, da bi nakon 7 nedelja istraživanja diureza u svim ispitnim grupama bila manja od kontrolne grupe. Postoji porast ureje na kraju istraživanja, koji je dvostruko veći u trećoj eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu. Postoji izrazit pad mokraćne kiseline na kraju istraživanja kod eksperimentalne grupe 3. Postoji izrazit pad granulocita u leukocitarnoj formuli u svim ispitnim grupama, a najveći je u trećoj ispitnoj grupi. Kako je došlo do pada relativnih vrednosti granulocita, tako je došlo do porasta relativnih vrednosti limfocita u prvoj i drugoj ispitnoj grupi. U trećoj ispitnoj grupi je pad granulocita praćen izrazito velikim povećanjem relativnog broja bazofilnih granulocita. Postoji značajan pad specifične težine urina na kraju istraživanja u drugoj i trećoj eksperimentalnoj grupi. Proteinurija je bila čest nalaz svim eksperimentalnim grupama, dok je bila odsutna ili samo u tragu u kontrolnoj grupi. Na kraju eksperimenta je utvrđen znatni porast broja kristala fosfata u eksperimentalnim grupama. Cilindri su se pojavljivali samo u nalazu urina u trećoj ispitnoj grupi. Najveći broj promena urina je utvrđen u trećoj eksperimentlanoj grupi.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	29.04.2010. godine
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>

UNIVERSITY OF NOVI SAD

MEDICAL FACULTY NOVI SAD

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Indentification number: INO	
Document type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Textual material, printed
Contents code: CC	Ph.D.thesis
Author: AU	Srdjan Živojinov
Menthor: MN	Prof. dr Dušan Lalošević
Title: TI	The development of animal model of nephrotoxic tubulointerstitial lesion
Language of text: LT	serbian (Roman) (scr)
Language of abstract: LA	serbian (Roman) (scr) / English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina

Publication year: PY	2016
Publisher IZ	Author's reprint
Publ. Place: PP	Serbia, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	The paper contains 8 chapters, 110 pages, illustrated with 18 pictures, 40 tables, 10 charts and 161 literature citations
Scientific field: SF	Surgery, Urology
Subject/Key words: SKW	Aristolochia; Plant Extracts; Kidney Tubules; Aristolochic Acid + toxicity; Kidney Diseases + chemically induced; Balkan Nephropathy; Models, Animal
UDC	616.61:615.322.099]-091.8 612.085.1:598.323.4
Holding data: HD	Library of the Faculty of Medicine, Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>In the experimental procedure of dissertation, NMRI strain mice were treated with infusion of plants <i>Aristolochia clematidis</i>. Dried leaves, branches and fruit plants are submerged in boiling water and left to stand for 3-5 hours, and then filtered through filter paper. It was made a solution of the plant / water of 10g / 1000ml (1%), 20g / 1000ml (2%) and 40g / 1000ml (4%). Different concentrations of infusions were given to mice to drink an unlimited amount for a period of 7 weeks. So we formed the three test groups, the first who received 1% infusion, the second received 2% infusion and third received 4% infusion and a control group that received only water to drink. In each group there were 20 animals. Thus, developed an animal model of chronic toxicity.</p> <p>At the end of the experiment was performed histopathological analysis of kidneys, macroscopic examination of organs and measuring urine output during the experiment. We performed a complete analysis of urine, which is the determination of: color, appearance, pH, specific gravity, protein and urine sediment. Urinalysis were repeated every 7 days during the 7 weeks of the study. At the end of the experiment were analyzed for biochemical parameters</p>

(glucose, urea, creatinine, uric acid, total bilirubin, direct bilirubin, total proteins, sodium and potassium) and analysis of the complete blood count.

It has been found that *Aristolochia clematitis* is extremely nephrotoxic plant. Identified histopathological changes of tubules and interstitium of NMRI mouse, which were the biggest in the test group receiving biggest dose. Established histopathological changes are similar to those described by pathological changes of tubulointerstitial injury of patients with Balkan endemic nephropathy. Not established the existence of cancer of the upper urinary tract. Macroscopic examination at autopsy of experimental animals, did not determine significant changes in the kidneys. There is first an enormous increase in diuresis in the first and second week of follow-up, in the second and third experimental groups retrospectively, that after 7 weeks of research, diuresis in all test groups was lower than the control group. There is an increase of urea at the end of the research, which is twice higher in the third experimental group compared to the control. There is a marked decrease in uric acid at the end of the research in the experimental group 3. There is a marked decrease in granulocytes in the leukocyte formula in all test groups, and the highest in the third test group. As the decline in the relative values of granulocytes, so there has been a rise in the relative values of lymphocyte in the first and second test group. In the third test group, granulocyte drop was accompanied by a extremely large increase in the relative number of basophils. There is a significant drop in specific gravity of urine at the end of the research in the second and third experimental group. Proteinuria is a common finding to all experimental groups, while it was absent or only in traces in the control group. At the end of the experiment was determined to increase significantly the number of phosphate crystals in the experimental groups. The cylinders have appeared only in the urine in the third test group. The greatest number of changes in the urine is determined in the third experimental group.

Accepted by the Scientific Board on: ASB	29.04.2010. godine
Defended on: DE	
Thesis defense board: DB	<hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>

Iskreno se zahvaljujem,

Prof. dr Dušanu Laloševiću,

Mom mentoru,

na svesrdnoj pomoći, znanju i stručnim savetima, bez kojih ovaj doktorat ne bio bio moguć.

Prof. dr Igoru Mitiću,

zbog pravih saveta u izboru teme i naziva doktorata.

Prof. dr Vuku Sekuliću i Prof. dr Jasenku Doziću,

na velikom profesionalizmu i spremnosti da uvek pomognu.

Dr Dejanu Miljkoviću i dr Ivanu Čapu,

Na aktivnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimenta i obradi materijala.

Kolegama sa katedre za histologiju, katedre za patologiju i Pasterovog zavoda.

Svim neimenovanim,

koji su doprineli u izradi ove disertacije.

Supruzi Mirjani, Dušanu i Milošu, mojim roditeljima Nadi i Dušanu, na ogromnoj želji i pomoći da privedem kraju izradu doktorata i neizmernom strpljenju.

Srdan Živojinov

SKRAĆENICE

A

ATN	Akutna tubularna nekroza
Ac	Acidum
AAN	(od engl. Aristolochic acid nephropathy)
AC	(od lat. Aristolochiae clematitidis)
A	(od engl. Aristolochia)
AA	(od engl. Aristolochic acid)

B

BEN	Balkanska endemska nefropatija
BA	(od engl. basophils)

C

CHN	(od engl. Chinese Herb Nephropathy)
-----	-------------------------------------

D

D	Direktni
DNA	(od engl. deoxyribonucleic acid)

E

EO	(od engl. eosinophils)
----	------------------------

G

GFR (od engl. glomerular filtration rate)

GI gastrointestinalni trakt

H

HTN hronični tubulointersticijski nefritis

Hgb Hemoglobin

J

JGA jukstaglomerularni aparat

K

KKS Kompletna krvna slika

L

LY (od engl. lymphocytes)

M

MCV (od engl. mean cell volume)

MCH (od engl. mean corpuscular hemoglobin)

MCHC (od engl. mean corpuscular hemoglobin *concentration*)

MO (od engl. monocytes)

N

NE (od engl. neutrophils)

P

PDGF (od engl. Platelet-derived growth factor)

PLT (od engl. platelets)

R

RBC (od engl. red blood cells)

T

TGF- β (od engl. Transforming growth factor beta)

T Totalni

U

Uk Ukupni

W

WBC (od engl. white blood cells)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Anatomija bubrega.....	1
1.1.1. Spoljašnji izgled i odnosi bubrega.....	1
1.1.2. Omotači bubrega.....	2
1.1.3. Građa bubrega.....	3
1.1.4. Vaskularizacija bubrega.....	4
1.1.5. Inervacija bubrega.....	4
1.2. Fiziologija bubrega.....	5
1.2.1. Glomerul.....	11
1.2.2. Tubul.....	14
1.2.2.1. Permeabilnost tubula i uloga proteina u reapsorpciji vode i čestica	15
1.2.2.2. Jukstaglomerularni aparat.....	17
1.2.2.3. Održavanje homeostaze.....	18
1.3. Bolesti tubula i intersticijuma bubrega.....	20
1.3.1. Hronični tubulointersticijski nefritis (HTN).....	22
1.3.2. Kineska biljna nefropatija.....	23
1.3.3. Balkanska endemska nefropatija (BEN).....	23
1.4. Histološke karakteristike bubrega.....	25
1.5. Aristolochia.....	29
1.5.1. Vrsta <i>Aristolochia clematitis</i> L.....	29
1.5.2. Osnovne karakteristike aristolohične kiseline	31
2. Ciljevi rada.....	32
3. Hipoteze.....	32
4. Materijali i metode.....	33
5. Rezultati.....	37
5.1. Patohistološka analiza.....	37
5.2. Makroskopski pregled nakon autopsije eksperimentalnih životinja.....	46
5.3. Rezultati merenja diureze.....	47
5.4. Rezultati merenja biohemijskih parametara krvi.....	50

5.5. Rezultati merenja kompletne krvne slike (KKS).....	57
5.6. Rezultati kompletnog pregleda urina.....	62
6. Zaključci.....	85
7. Diskusija.....	86
8. Literatura.....	97

I UVOD

1.1 ANATOMIJA BUBREGA

Bubreg je paran organ u sklopu urinarnog sistema, koji luči i kolektuje mokraću. Urinom se iz krvne plazme odstranjuju produkti metabolizma (urea, kreatinin, mokraćna kiselina i drugi), koji na organizam deluju toksično, te se na taj način obavlja funkcija deputacije, odnosno uklanjanja, koja ima esencijalni značaj za organizam. Osim navedenog, bubrezi uklanjaju iz krvne plazme višak materija, koji predstavljaju normalne sastojke krvi, ali se ponekad nalaze u suvišku, te remete ravnotežu unutrašnje sredine organizma (joni natrijuma, kalijuma i drugi). Bubreg poseduje i sposobnost sinteze nekih hormona (angiotenzin, eritropoetin) [1,2].

Ukupna količina parenhima oba bubrega, pod normalnim okolnostima znatno prevazilazi funkcionalne potrebe organizma. Navedena činjenica je veoma bitan parametar u urologiji, što znači da gubitak jednog bubrega neće poremetiti ukupnu funkciju, ako je očuvana funkcionalna sposobnost drugog bubrega [1].

1.1.1 Spoljašnji izgled i odnosi bubrega

Bubreg je organ crvenosmeđe boje, čvršće konzistencije, a oblika zrna pasulja. Težak je oko 140 grama, visine 10-12 cm, širine 5 cm, a debljine 2-3cm. Ima dve strane, prednja (facies anterior) i zadnja (facies posterior), dva pola, gornji i donji, (polus s. Extremitas superior et inferior) i dve ivice, spoljašnju (margo lateralis) i unutrašnju (margo medialis). Na sredini unutrašnje ivice bubrega se nalazi unutrašnji otvor ili hilus bubrega (hilus renalis), putem kojeg prolazi sudovno-mokraćna peteljka, ka središnjem delu bubrega (sinus renalis). Unutrašnja ivica desnog bubrega je u odnosu sa donjom šupljom venom, a unutrašnja ivica levog bubrega sa aortom abdominalis. Na gornjem polu leži nadbubrežna žlezda, a donji pol desnog bubrega je

udaljen od cristae iliaca 3 cm, a donji pol levog bubrega 5 cm. Gornji polovi oba bubrega su udaljeni 8 cm, a donji polovi 12 cm [1,2].

Bubreg je smešten u retroperitonealnom prostoru, u visini 12 torakalnog pršljena i 1-2 lumbalnog pršljena. Gornje 2/3 prednje strane desnog bubrega prekriva jetra, a donju 1/3 desni ugao kolona. Levi bubreg je sa prednje strane prekriven: repom pankreasa, slezinom, želucem, levim uglom kolona i vijugama jejunuma. Zadnja strana naleže na muskulaturu zadnjeg trbušnog zida (m. psoas major i m. quadratus lumborum) i u odnosu je sa 12 rebrom i donjim pleuralnim sinusom, zbog čega prilikom operacije bubrega treba voditi računa, da ne bi došlo do otvaranja pleuralne šupljine i nastanka pneumotoraksa. Iznad 12 rebra, zadnja strana počiva na slabinskom delu dijafragme. Između slabinskih snopova i rebarnih snopova nalazi se zjap, preko kojeg se mogu širiti zapaljenski procesi s bubrega na pleuru. Preko prednje strane prelazi parijetalni peritonum [1,2].

Navedene karakteristike bubrega i odnosi sa drugim anatomskim elementima su vaoma bitni za hiruršku tehniku, kao i za razumevanje simptoma bubrežnih oboljenja i širenja procesa na susedne organe.

S obzirom da je bubreg retroperitonealni organ, ne poseduje peritonealne veze, već bubreg u ležištu održavaju sledeći elementi: bubrežna sudovno-živčana peteljka, bubrežni omotači, vezivno tkivo i intraabdominalni pritisak, koji prevashodno zavisi od tonusa mišića prednje-bočnog trbušnog zida [2].

1.1.2 Omotači bubrega

Idući od površine ka dubini, bubreg obavijaju tri omotača: bubrežna fascija (fascia renalis), masna čaura (capsula adiposa) i fibrozni omotač (capsula fibrosa) [1,2,3,4,5].

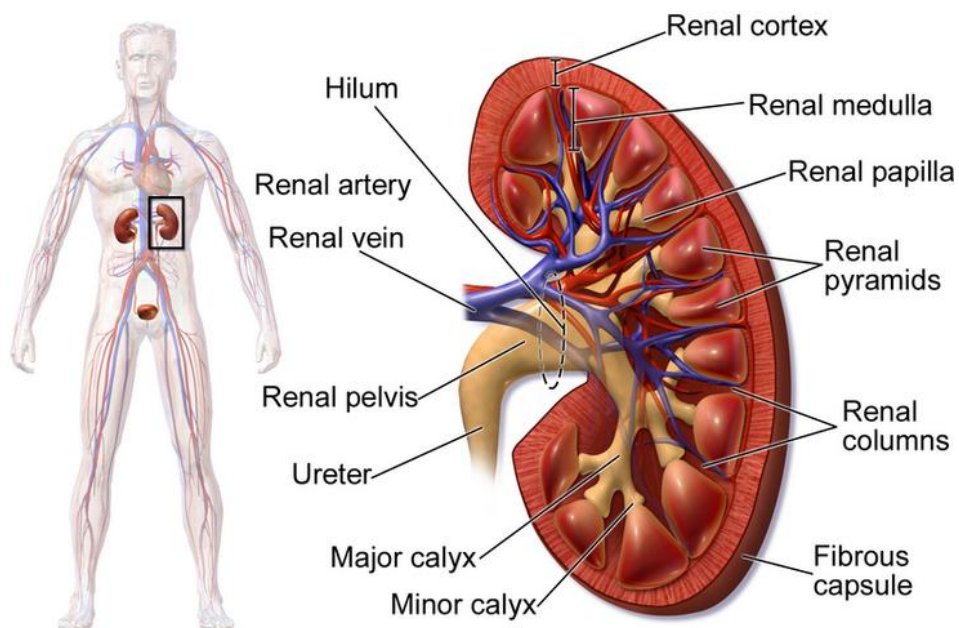
Fascia adiposa je produžetak fascie transversalis, koja oblaže zidove abdomena i sastoji se od dva lista: prednjeg (prerenalnog) i zadnjeg (retrorenalnog). Listovi su spojeni iznad gornjeg pola, obavijajući nadbubreg, a ispod donjeg su rastavljeni i tako može nastati lutajući bubreg – ren mobile. Fascijalne lože ne komuniciraju međusobno, tako da se perinefritis ne propagira na kontralateralnu stranu.

Capsula adiposa odvaja renalnu fasciju od spoljašnje površine bubrega i ona se kod živog čoveka nalazi u polutečnom stanju. Zbog svojih karakteristika, ona amortizuje štetno mehaničko dejstvo faktora u toku pada ili udara u predeo slabina, omogućava lekarski pregled bubrega i održava bubreg u normalnom položaju (in situ). U toku gubitka telesne težine može da nestane znatan deo masne kapule, što će dovesti do spuštanja bubrega u malu karlicu (ren mobile).

Capsula fibrosa je najdublji deo tri omotača i direktno oblaže bubrežni parenhim, a karakteriše se velikom čvrstinom i nerastegljivošću, što onemogućava ekspanziju bubrežnog parenhima u toku izvesnih patoloških procesa. Kompresija nabujalog bubrežnog tkiva, unutar nerastegljive kapsule, može da spreči bubrežnu sekreciju i ponekad dovede do anurije [1,2].

1.1.3 Građa bubrega

Bubreg čini bubrežno tkivo ili parenhim, na čijim se preseku razlikuju dva dela: srž bubrega (medulla renalis) i kora (cortex renalis) (Slika 1). Histološka građa parenhima biće opisana u jednom od narednih poglavlja [1,2,3,4,5,6].



Kidney Anatomy

Slika 1. Anatomija bubrega.

Preuzeto: site Wikipedia slobodno.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/35/Blausen_0593_KidneyAnatomy_02.png/800px-Blausen_0593_KidneyAnatomy_02.png

1.1.4 Vaskularizacija bubrega

Bubreg vaskularizuju arterija renalis i vena renalis. Bubrežna arterija je visceralna grana trbušne aorte i ne predstavlja samo nutritivni, već i funkcionalni krvni sud bubrega, jer kroz nju, u bubrežni filter, dolazi celokupna količina cirkulišuće krvi.

U bubrežnom sinusu završne grane a. renalis se dele na segmentne arterije, a one dalje na međurežanjske arterije (aa. interlobares), a koje prodiru u bubrežni parenhim.

Sve segmentne arterije bubrega su u funkcionalnom smislu terminalne, te njihova opstrukcija ili ligatura dovodi do infarkta odgovarajućeg bubrežnog segmenta. Varijacija distribucije a. renalis na segmentne arterije je od izuzetnog značaja za parcijalnu nefrektomiju. Najčešći modalitet je bubreg sa 5 segmenata (gornji, dva prednja, donji i zadnji) [1,2,4].

Vene bubrežnog parenhima su pratilje istoimenih arterija.

Limfni sudovi bubrega odnose limfu u paraaortalnu grupu limfnih čvorova, odgovarajuće strane. Veoma je značajno, zbog diseminacije malignih tumora, da se limfni sudovi bubrega anastomoziraju sa limfnim vodovima susednih organa i to limfnom mrežom donje strane jetre, ushodnog kolona, cekuma i apendiksa. Oni takođe anastomoziraju sa limfnim sudovima testisa, odgovarajuće strane [1,2,4].

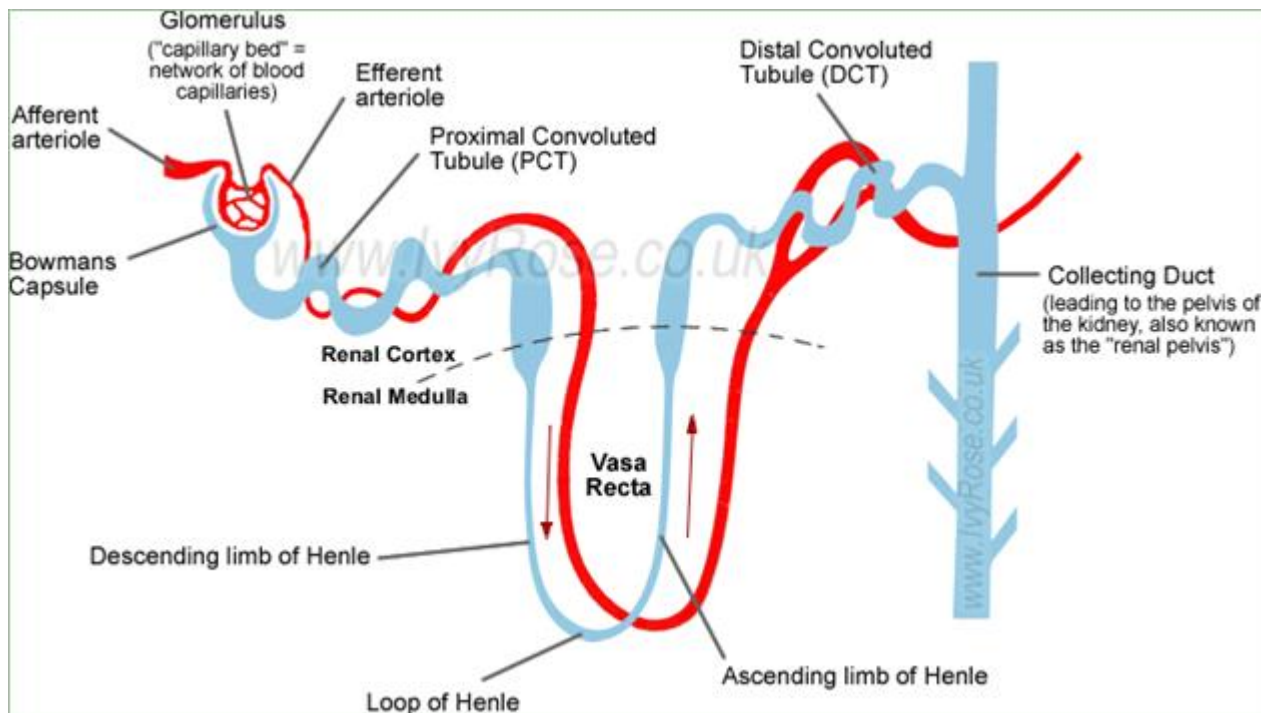
1.1.5 Inervacija bubrega

Bubreg inerviše bubrežni splet (plexus renalis), koji grade grane plexus-a celiacusa, plexus-a aorticusa abdominalisa, kao i nn. splanchnici lumbales. Plexus renalis leži iza početnog dela stabla a. renalis. Njegove grane ulaze u bubreg, prateći završne grane a. renalis i ispoljavaju uglavnom vazomotorno dejstvo.

Bubrežni splet daje grane, koje inervišu mokraćovod (ureter), kao i spermatične grane, odnosno ovarijalni nervni splet [1,4].

1.2 FIZIOLOGIJA BUBREGA

Osnovna strukturna i funkcionalna jedinica bubrega naziva se nefron, koji je prikazan na Slici 2. Nefron se sastoji od glomerula, koji predstavlja deo za filtriranje nefrona, i tubula, koji je odgovoran za povraćaj većine filtrata i eliminaciju dela filtrata koji mora da se izlučuje. Glomerul se sastoji od mreže kapilarnih petlji; svaki kapilar se sastoji od jednoslojnog epitela koji leži na bazalnoj membrani i ovako zajedno predstavljaju jedinstveno modifikovanu epitelnu ćeliju poznatu kao podocit.

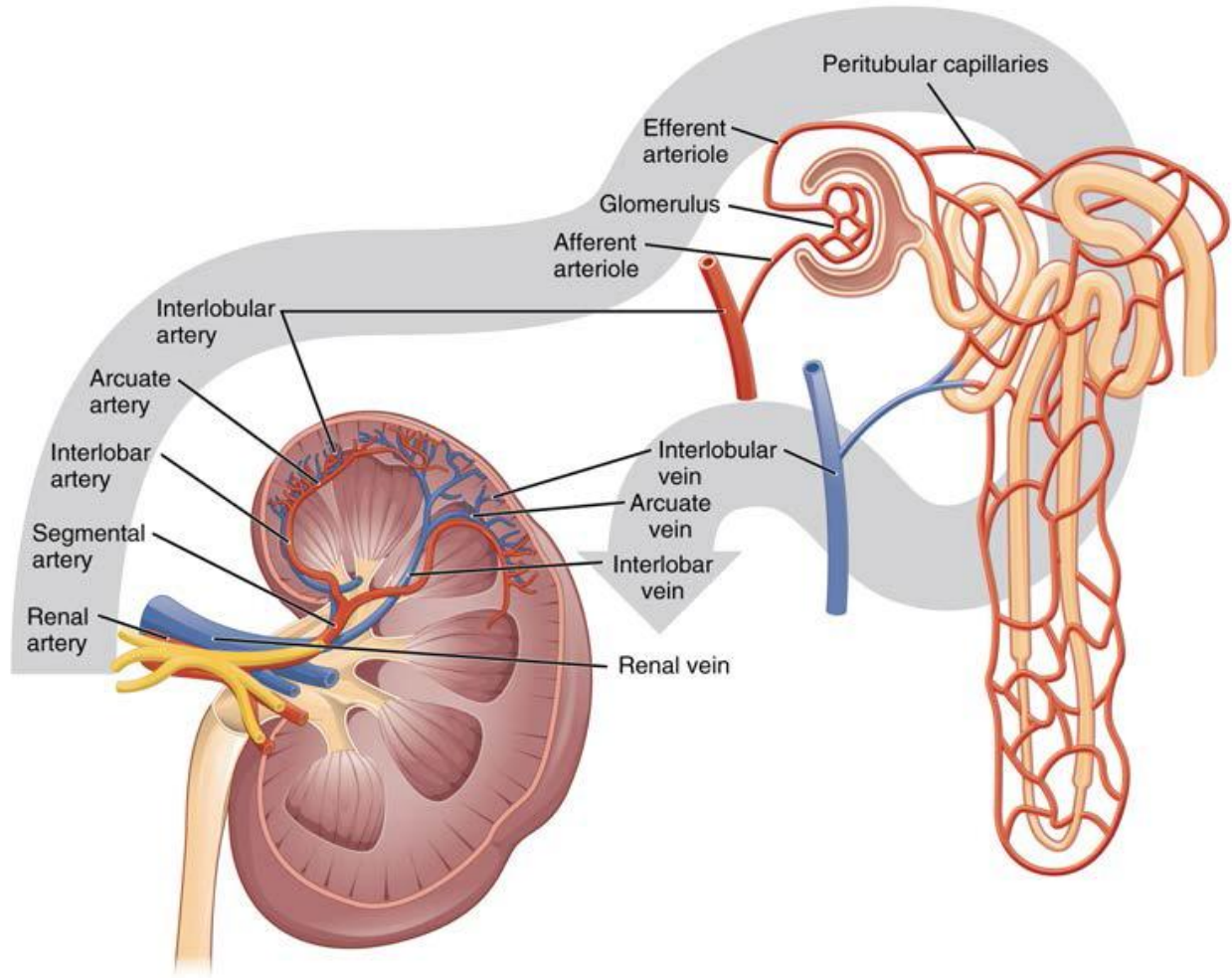


Slika 2. Pojednostavljen izgled nefrona. Baziran na sličnom dijagramu iz [Oxford Concise Colour Medical Dictionary](#).

Strukturno, bubrežni tubul je duga cev koja međusobno povezuje epitelne ćelije. Kako se tubul približava renalnom sabirnom sistemu bubrega, epitel se menja i predstavlja kolektorni kanal. Nefron i proksimalni delovi sabirnog sistema nastaju od različitog embrionalnog pupoljka u odnosu na bubrežnu karlicu i urogenitalni sistem. U ranom razvoju, pupoljak uretera nastaje iz mezonefričkog kanala, raste prema metanefričkoj kapi. Pupoljak uretera na kraju oblikuje uretere, bubrežnu karlicu i distalne delove sabirnog sistema, dok će metanefrička kapa formirati nefron i proksimalne tubule. To je vrlo važno, jer tkivo koje potiče iz pupoljka uretera je bogato inervisano (te boli, kada je povređeno), dok veći deo metanefričke kape nije bogato inervisan [7].

Renalni krvni sudovi moraju osigurati tri ključne funkcije: 1) dotok kiseonika i hranjivih materija tkivu bubrega, 2) održati adekvatni krvni pritisak u kapilarama specijalizovanim za filtriranje krvi, i 3), održava gradijent osmolarnosti (što je presudno za apsorpciju vode i elektrolita iz tubula) u bubrežnoj meduli.

Bubrežna arterija nastaje iz abdominalne aorte, odmah ispod gornje mezenterične arterije. Blizu hilusa bubrega, bubrežna arterija deli se u nekoliko segmentnih grana, koje odlaze do bubrežnog parenhima i napreduje do između režnjeva i piramida. Tamo se pretvaraju u arkuatne arterije, koje teku vodoravno duž površine od bubrega, uz spoj između kore i medule. Od arcuatnih arterija nastaju interlobularne arterije koje penetriraju u korteks i dele se u aferentne arterije koje snabdevaju glomerul (Slika 3).



Slika 3. Anatomska građa i vaskularizacija bubrega.

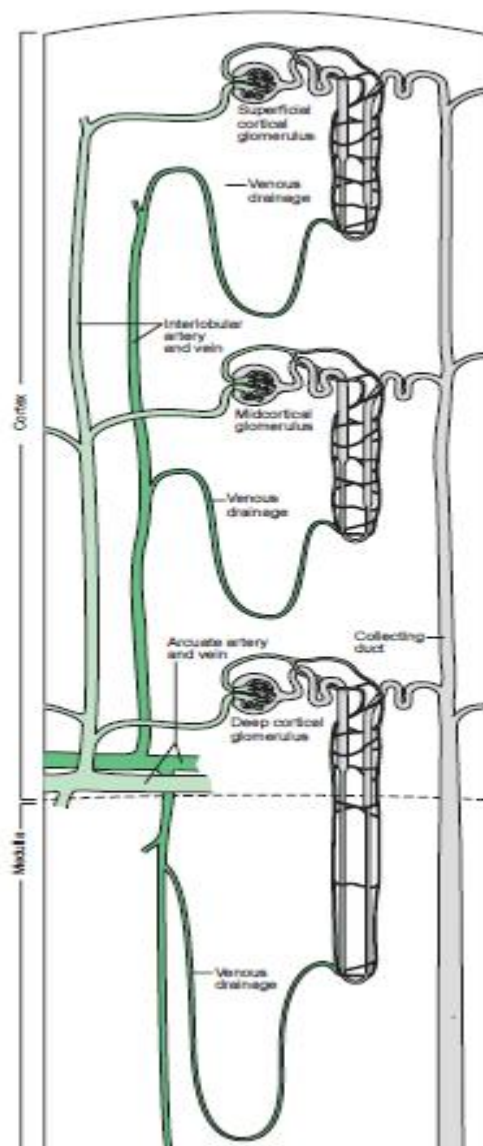
Download for free at <http://cnx.org/content/col11496/latest/>.

Slično drugim arterijama, proksimalni delovi aferentih arterija tj arteriola sastoje se od tankog endotelnog sloja ispod kojeg se nalaze glatke mišićne ćelije. Mišićni sloj je inervisan od simpatičkih živaca koji dozvoljavaju kontrakciju i relaksaciju aferentne arteriole, što omogućuje regulaciju perfuzijskog pritiska glomerula. U daljim delovima tj. u distalnim partijama aferentnih arteriola, kako se arteriola približava glomerulu, glatke mišićne ćelije bivaju zamenjene

granuliranim ćelijama. Te ćelije imaju mogućnost proizvodnje renina, regulatornog peptida važnog u regulaciji natrijuma.

Odmah po ulasku u glomerul, kao što se vidi na slici 3, aferentna arteriola se deli u čipkastu mrežu kapilara. Za razliku od aferentnih arteriola, koje su ograđene od strane bilo glatkih mišića ili zrnastih ćelija, kapilarne petlje su napravljene od tankih endotelnih ćelija bez okolne potporne strukture. Ovo kapilara je mesto filtracije krvi i tačka ulaska filtrirane tečnosti u bubrežne cevčice. Kapilarne petlje se prazne u eferentne arteriole, koje zatim izlaze iz glomerula. Eferentne arteriole variraju u prečniku, u zavisnosti od njihove lokacije unutar bubrega, i mogu da imaju relativno velike količine glatkih mišića kao podršku. Važno je napomenuti da ovaj segment aferentna arteriola – kapilarna petlja – eferentna arteriola, je prilično jedinstvena u ljudskom telu, jer se obično arterijski sudovi nakon kapilarne mreže nastavljaju venskim, a ovde ponovo arterijskim. U glomerulu, kapilarni pleksus je slab jer mu nedostaje potpora vaskularnih glatkih mišićnih ćelija, praktično je u sendviču između dve arterije koje imaju mišićni zid. Mišićni sloj arterija je inervisan i zato može da odgovori na veliki broj neurohormonalnih stimulansa. Shodno tome, balans između vazokonstrukcije i vazodilatacije aferentne i eferentne arteriole je regulisan pritiskom u kapilarnoj petlji. Interakcija između aferentne i eferentne arteriole pomaže da se održi relativno stalan filtracioni pritisak u glomerulu uprkos oscilacijama krvnog pritiska u organizmu. Eferentne arteriole se granaju u sekundarnu kapilarnu petlju, poznatu kao vasa recta. Ovi kapilari sastoje se od ravnog endotela sa velikim otvorima (fenestracijama) i nemaju glatke mišiće koji bi dozvolili kontrakciju. Fenestracije i nizak hidrostatički pritisak u okviru ovih sudova, čine vasa rectu idealnom da apsorbuje tečnost i vitalne molekule iz renalnog intersticijuma. Za razliku od glomerularnog dela petlje, vasa recta se sastoji od kapilarnog pleksusa niskog pritiska, poput onih u drugim delovima tela, i odvodi krv direktno u venski sistem. Vasa recta ima nekoliko važnih uloga. S jedne strane, obezbeđuje kiseonik i hranljive sastojke mnogim strukturama bubrežnog parenhima, a sa druge strane, pruža strukturu za reapsorpciju oko 180 litara filtrata koji se formira svaki dan. Odnos ova dva kapilarna kreveta je važno da razumemo. Ako ovo pokušamo da objasnimo izrazima koji se koriste u elektrici, kapilarna mreža glomerula i vasa recta su serijski povezani provodnici. Vasa recta zavisi od protoka krvi u glomerulu. Protok krvi u glomerulima je veoma regulisan, i u mnogim okolnosti, mišićna eferentna arterija će vazokonstrukcijom održavati određeni pritisak u glomerulu. Navedeni manevar može da zaštiti glomerularnu filtraciju,

međutim istovremeno će ograničiti protok u vasa recta, čime može izmeniti resorpciju filtriranog materijala iz tubula. Za prosečnu ljudsku osobu, početni pritisak u aferentnim arteriolama je približno 100 mm Hg. Arterijski otpor prigušuje sistemski pritisak, tako da smanjuje pritisak na oko 60 mm Hg. Pritisak preko eferentne arteriole varira između 60 i 20 mm Hg, i balans između ova dva sistema arteriola određuje pritisak unutar kapilarne petlje. Kada krvotok stigne do vasa recta, pritisak je i dalje prilično nizak i pada, na oko 10 mm Hg kada dostigne do renalne vene. Vasa recta mora da obezbedi kiseonik i hranljive materije tubulima, koji su veoma aktivna i energetski zavisna struktura. Apsorpcija elektrolita i vode iz tubularnog fluida često zahteva značajne količine ATP, kao što ćemo raspravljati u nastavku. Neka stanja mogu da stvore dvostruki problem, u kojoj protok kroz vasa recta biva smanjen zbog vazokonstrukcije eferentne arteriole, i u isto vreme zbog toga raste potrošnja energije u tubulima. Zbog toga kada dolazi do smanjenja protoka krvi i kiseionika do tubula, raste i potrošnja kiseionika. To se može videti u ambijentu krvarenja ili drugih stanja kada dolazi do hipotenzije, kada glomerularna petlja nastoji da održi glomerularnu filtraciju i tubuli su tada stimulisani da reabsorbuju više natrijuma. Takve situacije i fiziološki odgovor bubrega na hipotenziju, mogu dovesti do povrede tubula, koja se klinički označava kao akutna tubularna nekroza (ATN). U nekim delovima bubrega, posle vasa recta, bubrežni krvni sudovi formiraju petlju u vidu ukosnice koja se spušta u dublje delove srži pre ulivanja u renalnu venu i izlaska iz bubrega. Ovaj aspekt vaskularnih struktura je izuzetno značajan za održavanje osmolarnog gradijenta unutar renalne medule. Do sada je opisivano samo snabdevanje krvi jednog nefrona. U stvarnosti, vaskularna arhitektonika bubrega pokazuje veliku heterogenost, sa tri glavna tipa sudova, koji su definisani protokom u vasa recta (slika 4).



Slika 4. Crtež tri različita puta vaskularnih sudova

U prvom tipu sudova, vasa recta, nakon napuštanja eferentne arteriole glomerula koji se nalazi subkapsularno, kreće se u smeru bubrežne kapsule. Snabdeva hranjivim materijama i resorbuje filtrat iz proksimalnih tubula i zadnjih vijugavih tubula subkapsularnih glomerula. U glomerulima koji se nalaze u središnjem delu cortexa bubrega (midcortical), vasa recta nakon izlaska od eferentne arteriole silazi niže do arkuatnih vena na kortikomedularnoj granici, bez spuštanja prema srži tj meduli. U ovom drugom tipu sudova, vasa recta snabdeva nutritientima i drenira nefrone iz središnjeg dela cortexa, kao i dublje tubularne delove subkapsularnih nefrona.

Treći tip vaskularnih puteva snabdeva najdublju, jukstamedularnu grupu nefrona. Za razliku od druga dva tipa vaskularnih puteva, ovde se vasa recta spušta duboko u medulu. Poslednji tip ima jedinstvenu strukturu, petlju, koja sprečava smanjenje koncentracije intersticijalne tečnosti medule (što je neophodno za reapsorpciju vode iz sabirnih kanala), a istovremeno ovi sudovi sprovode krvotok do najdubljih struktura bubrega (Slika 4). Među ova tri različita tipa, vasa recta koji snabdeva subkortikalne nefrone, kao i nefrone u središnjem delu korteksa (midcortical) su najviše zastupljeni u bubregu. U ovom regionu nalazi se najveći broj proksimalnih tubula u koje se reabsorbuje najveći deo tečnosti i elektrolita filtriranih u glomerulu. Mnogo manji broj vasa recta se spušta u medulu, a time je i značajno različita raspodela protoka krvi unutar bubrega. Ako posmatramo ukupni protok krvi kroz bubreg, skoro 90% cirkuliše kroz vasa recta površnih i midcortical glomerula, dok samo 10% stiže do srži. Samo 1% do 2% od ukupnog renalnog protoka krvi dostigne u najdublje delove srži. Ovakva organizacija bubrežnog krvotoka je važna u zaštiti medularnog gradijenta koncentracije, ali takođe dovodi do relativne hipoksije u ovom regionu [7].

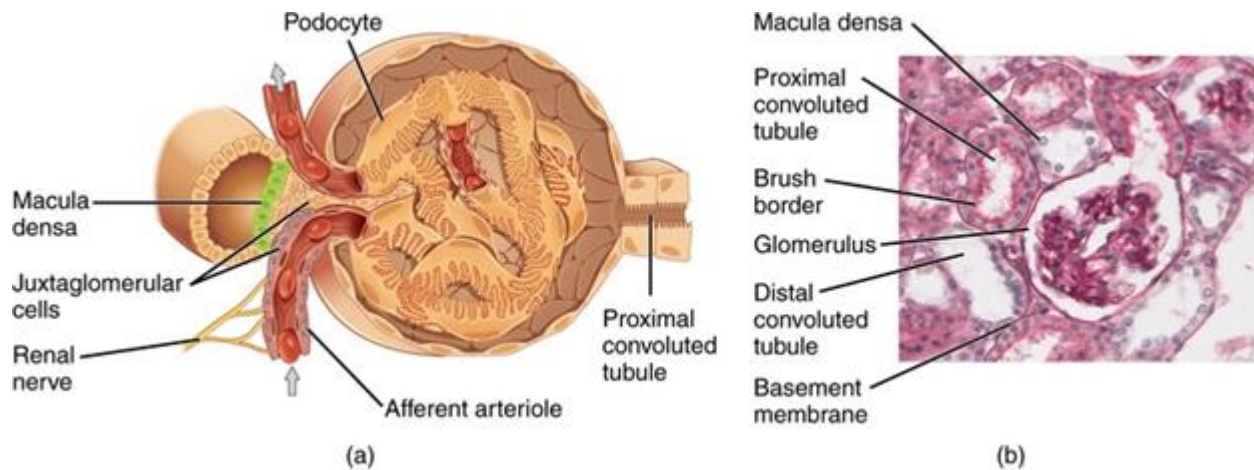
1.2.1 Glomerul

Glomerul je spona između protoka krvi u bubrežima i fluida koji ispunjava lumen tubula.

U fiziološkim uslovima, kod čoveka, gradijent hidrostatskog transkapilarnog pritiska normalno iznosi 35-40 mmHg, zbog kojeg dolazi do oblikovanja fluida, bez prisutnih ćelija i proteina, koji predstavlja urin koji zatim izlazi iz organizma. Filtriranje je konstantni proces u glomerulima. U proseku, približno 120 ml filtrata se formira svaki minut, ili skoro 180 litara dnevno. Pojam koji definiše navedeni proces naziva se stopa glomerularne filtracije (**glomerular filtration rate - GFR**).

Glomerul se sastoji iz tri sloja, endotelne ćelije sudova sa jedne strane, bazalne membrane formirane od kolagena koja čini središnji sloj i modifikovane epitelne ćelije nazvane podocit, koja formira treći sloj. Ova tri sloja, endotelna ćelija, bazalna membrana i podocit

zajedno čine barijeru, kojom čuvaju da krvne ćelije i proteini ostaju u krvotoku, a da tečnost i mali molekuli prelaze u urinarni prostor. Postoje i ćelije za podršku smeštene između kapilarnih petlji, poznate kao mezangijalne ćelije. Tačna uloga ovih ćelija je nejasna.



Slika 5. Građa glomerula

Preuzeto sa site Wikipedia slobodno.

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/28/Juxtaglomerular Apparatus and Glomerulus.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/28/Juxtaglomerular_Apparatus_and_Glomerulus.jpg)

Može se preuzeti (download for free at [http://cnx.org/content/col11496/latest/.](http://cnx.org/content/col11496/latest/))

Razumevanje osnovne povezanosti između ovih struktura je od ključnog značaja za sposobnost procene normalne fiziologije i bolesti bubrega. Jednoslojne epitelne ćelije formiraju kapilarnu petlju. Mnoge kapilarne petlje nastaju iz jedne aferentne arteriole i formiraju glomerularno klube, formaciju čipkaste strukture. Na bazi glomerularnog klubeta, gde je kapilarna struktura povezana za svoju arteriolu, nalaze se ćelije za podršku koje okružuju kapilarnu petlju. Ova oblast se zove mesangium (Slika5). Kao što je već rečeno, stalni protok krvi kroz aferentne i eferentne arteriole podešava pritisak u okviru kapilarne petlje da održi efikasnu filtraciju. Pritisak u kapilarnoj petlji je veoma visok, ako isti poredimo sa pritiskom u kapilarnim mrežama drugih delova tela. Glomerularna kapilarna petlja bi se mogla predstaviti, s obzirom na jednostavnu, a opet delikatnu endotelijalnu strukturu, kao baštensko crevo pod

visokim pritiskom, kada je voda uključena. Dodatnu stabilnost petlje daje bazalna membrana koja se nalazi ispod endotela, a za koju su usidrene prstolike strukture podocita. Bazalna membrana i podociti čine spoljašnju površinu glomerula i filtrat koji prolazi ove strukture se smatra da je izvan glomerula. Bazalna membrana je složena struktura izgrađena od kolagena tipa IV. Bazalna membrana se prvenstveno sastoji alfa lanaca 3, 4, i 5, koji su raspoređeni u trostrukoj strukturi spirale, povezane s kraja na kraj, i povezane još jedna sa drugom disulfidnim vezama. Jedinstvena struktura bazalne membrane omogućava da deluje kao filter, sprečava neke čestice da prolaze, ali dozvoljava drugima da zajedno sa vodom, slobodno prolaze. Stepen do kojeg se bazalna membrana ponaša kao barijera za kretanje čestica je određen pre svega veličinom čestica i nabojem. Veće čestice, tipično veće od 10 nm u prečniku, obično ne mogu proći ovu barijeru. Naboj čestice značajno utiče na permeabilnost. Negativno naelektrisane čestice, na primer, nisu u stanju da prođu kroz bazalnu membranu. Zbog postojanja selektivnosti membrane koja je zavisna od naboja i veličine čestice, ćelije i veći proteini ostaju u kapilarnom krvnom sudu, a voda i mali joni prolaze slobodno. Prihvaćena je činjenica da proteini, kao što su albumini, zbog svoje veličine i negativnog naelektrisanja, se ne filtriraju, mada je još uvek predmet rasprava.

Poslednji ćelijski sloj glomerula se sastoji od podocita, koji predstavljaju modifikovane epitelne ćelije koje formiraju mrežu. Podociti imaju prstolike produžetke inkorporisane u bazalnu membranu, čime se obezbeđuje strukturna podrška. Ako je prethodno glomerul opisan kao nabrano baštensko crevo pod visokim pritiskom kada je uključena voda, podociti predstavljaju strukturu koja sidri glomerul i sprečava da se uvija i odmotava pod pritiskom. Otvori između prstolikih produžetaka podocita nazivaju se filtracioni prorezi i glomerularni filtrat prolazi kroz ove pukotine na putu ka urinarnom prostoru. Podociti imaju važnu ulogu u određivanju karakteristika filtracione barijere glomerula, ali tačna priroda interakcije između podocita i bazalne membrane je i dalje neizvesna. Bolesti koje primarno utiču na podocite, u velikoj meri mogu uticati na glomerularnu filtraciju, omogućavajući prolaz velikih proteina kao što je albumin. Stoga je verovatno da obe strukture, bazalna membrana i podociti imaju važnu ulogu u određivanju glomerularne filtracije, posebno u pogledu proteina [7].

1.2.2 Tubul

Kao što je već navedeno, oko 120 cc / min (180 l / dan) filtrata prelazi preko glomerula u sistem tubula. Velika većina (u proseku, sve osim 2 litre) ove tečnosti se povraća i preseli nazad u telo. Tako, tubuli učestvuju u konstantnom vraćanju čestica i tečnosti iz lumena tubula natrag u intersticijalni prostor bubrega, odakle se vraćaju u vaskularni prostor. Tubul je šuplja cev obložena epitelnim ćelijama. Filtrat teče duž tubula, od glomerula prema sabirnom sistemu. Tubul se tradicionalno deli u segmente, na osnovu strukturalnih razlika i funkcionalne uloge. Prvi deo tubula naziva se proksimalni tubul. Zadužen je za povraćaj 75% do 80% filtrirane tečnosti i ima važne strukturne karakteristike da olakšaju ovaj proces. Proksimalni tubul je pun vijuga što povećava površinu za reapsorpciju. Pošto je reapsorpcija čestica energetski zavistan proces, proksimalni tubuli su puni mitohondrija koji obezbeđuju ovu energiju. Proksimalni tubul se nadovezuje na Henleovu petlju. Naziva se petljom jer pravi strukturu sličnu ukosnici. Petlja se sastoji od tanke nishodne grane i debele ushodne grane. Debela ushodna grana ima važnu ulogu u pumpanju jona protiv gradijenta koncentracije, a samim tim, njegove ćelije takođe imaju visoku koncentraciju mitohondrija. Henleova petlja igra važnu ulogu u čuvanju vode. Učestvuje u vraćanju oko 5% do 10% filtrata. Nakon Henleove petlje nastaju zadnji vijugavi tubuli, a na samom kraju je sabirni kanal. U sabirnom kanalu se reapsorbuje veoma mali procenat filtrata. Sabirni kanal ima jedinstveni osetljivost na široki spektar hormonskih stimulansa, koje menjaju permeabilnost vode i čestica. Sabirni kanal ima funkciju "finog tjunera". Ovde naš organizam odlučuje koliko natrijuma, kalijuma i vode želi da sačuva, a koliko da pusti urinom da izađe iz organizma.

Epitelne ćelije tubula su jedinstvene i imaju nekoliko važnih modifikacija koje na kraju utiču na njihovu funkciju. Za razliku od drugih epitelnih ćelija tela, one su relativno nepropusne. Tako da, voda i čestice ne mogu slobodno da prolaze kroz zid tubula. Prolazak se mora izvršiti preko transportera, ili prolaze kroz kanal ili prostor između susednih ćelija. Membrana u tubulima se sastoji od 2 sloja lipida, u koji su umetnuti protein i holesterol, od čije količine zavisi i propustljivost. Dugi lanci ugljenika u lipidnom dvosloju su otporni na vodu. Ovakvo čvrsto pakovanje lipida smanjuje vodopropusnost. Prisustvo ugrađenih molekula holesterola unutar dvosloja ima suprotan efekat, po mogućstvu narušavajući strukturni integritet membrane.

Povećanje koncentracije lipida u dvosloju čini tubularnu membranu manje propustljivu, a povećanje broja molekula holesterola povećava propustljivost. Epitel bubrežnih tubula je jedinstven u bogatstvu svog lipidnog dvosloja, čvrsto upakovan i sa fosfolipidnim česticama. Ovo arhitektonsko rešenje čini ćelijska membrana nepropusna za vodu. Naravno, tubulska membrana je takođe nepropusna za male molekule. Spojevi i granjanje između ćelija tubula su jedinstveni takođe. Postoje strukture koje čvrsto popunjavaju navedene prostore između ćelija i čine tubulsku membranu čvrstom i usklađenom rešetkom. Navedena čvorišta između ćelija tubula sastoje se od nekoliko proteina, uključujući i zonulu occludens. Čvorišta sprečavaju jone i vodu da prolaze tubulsku membranu paracelularnim putem. Navedeni proteini zapravo kontrolišu protok vode navedenim paracelularnim putem, jer je membrana tubula nepropusna. Debeli ushodni deo Henleove petlje i sabirni kanal ima najveću koncentraciju navedenih proteina. Tanki nishodni deo Henleove petlje ima najmanju koncentraciju ovih proteina. Posmatrano sa kliničke strane, možemo reći da je prolaz vode i malih jona paracelularnim putem najmanje verovatan u debelom ushodnom delu Henleove petlje i sabirnom kanalu. Kombinacija nepropustljivosti ćelijske membrane i prisustva čvrstih veza između susednih ćelija daje bubrežnim tubulima potencijal da budu nepropusni u nekim delovima. U tim segmentima, voda i čestice ne mogu prolaziti kroz ili oko epitelnih ćelija. Kako onda je moguće da tubuli tako efikasno povrate skoro sav glomerularni filtrat? Odgovor na ovo pitanje se nalazi u proteinima ćelijske membrane koji omogućavaju prolazak čestica i kretanja vode preko tubula nazad u telo.

1.2.2.1 Permeabilnost tubula i uloga proteina u reapsorpciji vode i čestica

Membranski proteini imaju jedinstveni afinitet za pojedine čestice. **Transporter** je protein koji zahteva energiju, obično u obliku ATP-a, da pokreće čestice protivno gradijentu koncentracije. **Kanal** je protein koji jednostavno daje put za čestice koje se pasivno pomeraju duž svog elektrohemijskog gradijenta i za ovaj proces nije potrebna energija.

Da biste premestili čestice iz lumena tubula u telo, transportni proteini moraju biti organizovani na način koji olakšava navedeno kretanje, odnosno pokret čestica mora imati definisani pravac. Na primer, ako bi transportni proteini bili nasumično umetnuti u sve delove

tubulskih ćelija, bilo bi to čisto kretanje čestica, ali bez definisanog pravca. Da bi se olakšao protok, svi transportni proteini moraju se "postrojiti" da se organizuje jedan pravac kretanja. Da bi se postigla ova prostorna organizacija, bubrežni tubul ima "prednje i zadnje" strane, koji daju osećaj topografije. Ovaj koncept je poznat kao polaritet. Obe strane membrane su jedinstvene. Apikalni deo membrane tubula, koji je okrenut lumenu, i bazolateralni deo membrane, koji je okrenut intersticijumu, imaju različite funkcije. Polarnost omogućava tubulskoj membrani da usmeri određene proteine na apikalni deo membrane i ostale ka bazolateralnoj strani membrane. Funkcionalnost transportnih proteina određuje ćelijski polaritet. Tačno pozicioniranje ovih proteina je posledica dinamičkih ćelijskih procesa koje ili održavaju proteine unutar membrane ili ih vraćaju u citosol. Egzocitoza je proces koji omogućava pozicioniranje sintetizovanog proteina u ćelijsku membranu, dok je endocitoza je proces koji membranske proteine vraća nazad u citosol, često praćen proteinskom degradacijom. Kolektivno, ovi procesi se nazivaju **protein trafficking**, jer označavaju dinamičnu prirodu biologije navedenih proteina. Na svim tačkama sinteze proteina, od DNK transkripcije do pozicioniranja navedenih transportnih proteina u tubulskoj membrani, postoji veliki potencijal za regulaciju. Na ovaj način, rad transportera renalnog tubula može biti povećan ili smanjen, čime se omogućava velika varijacija u reapsorpciji pojedinih čestica iz tubula. Postoje dve glavne vrste membranskih proteina, oni koji olakšavaju reapsorpciju čestica i oni koje olakšavaju reapsorpciju vode. Transportni proteini su specifični za pojedine čestice. Na primer, postoji transporter glukoze, natrijuma i fosfata. Svaki od njih ima poseban afinitet za navedenu česticu. Voda, međutim, ne može da se kreće kroz ove proteinske transportere. Da bi došlo do reapsorpcije vode, voda mora proći ili duž paracelularnog puta ili preko voda - specifičnih kanala u ćelijskim membranama. Ovi kanali nazivaju se akvaporini, i samo obezbeđuju prolazak vode ali ne i čestica. Ukratko, iako je tubul suštinski nepropusan, ima sposobnost da sintetiše i pozicionira specijalizovani protein u ćelijske membrane okrenut ka lumenu. Navedeni transportni proteini, stvaraju prolaz za bilo čestice ili kretanja vode, i u velikoj meri menjaju propustljivost tubula. Opisani proces trgovine proteina se može kontrolisati raznim spoljašnjim stimulansima, omogućavajući na taj način da tubul menja svoju propusnost prema raznovrsnim situacijama i telesnim potrebama. Pod određenim uslovima, na primer, tubul se stimuliše da forsira reapsorpciju natrijuma. U drugim situacijama, reapsorpciju vode. Uprkos ogromnoj količini filtrata koji se svakodnevno stiže do

njih, tubuli imaju jedinstvenu sposobnost da selektivno vraćaju konkretne komponente i, na kraju, određuju sastav telesne tečnosti [7,8].

Rad membraniskih proteina je uglavnom energetski zavistan proces. Glomerularni filtrat teče od glomerula do tubula vođen, velikim delom visokim hidrostatskim pritiskom kapilarne petlje. Nasuprot tome, lumen tubula je izuzetno niskog pritiska. Sistem bubrežnih vena, koje prikupljaju reapsorbovani deo filtrata je takođe sistem niskog pritiska. Reapsorbovani deo filtrata se pomera iz lumena tubula, kroz epitelnu barijeru tubula, u intersticijum. Gradijent hidrostatskog pritiska ne može da obezbedi snagu za ovoj process. Alternativni izvor energije mora biti prisutan. Pumpe locirane duž bazolateralne strane tubulske membrane pružaju energiju za reapsorpciju filtrata. Ove pumpe, poznate kao Na / K ATP zavisne pumpe, postoje svuda na svim ćelijskim membranama. U mnogim mestima u telu, ove pumpe održavaju balans elektrolita između, unutar i van ćelije. U bubregu, međutim, Na / K ATP pumpa vrši dodatnu ulogu. U skladu sa polaritetom ćelije, Na / K ATP pumpa se nalazi isključivo na bazolateralnoj strani tubulske membrane i tima stvara pravac za kretanje čestica. Čestice imaju svoj naboj, a krajnji efekat kretanja molekula je stvaranje elektrohemijskog gradijenta kroz membranu ćelija. Kada se kombinuju efekti pojedinih ćelija, elektrohemijski gradijent se stvara duž celog tubula. Navedeni gradijent daje snagu koja vrši reapsorpciju.

1.2.2.2 Jukstaglomerularni aparat

Ogromne količine tečnosti se filtriraju preko glomerula, a zatim se vrši reapsorpcija duž tubula. Ovakav veliki sistem protoka je efikasan za čišćenje otpada u telu, ali tubulski sistem reapsorpcije mora biti pažljivo regulisan i koordinisan. Male nepravilnosti u funkcionisanju tubula mogu imati katastrofalne posledice, što bi dovelo do brzog gubitka telesne tečnosti i smrti. Srećom, bubrezi imaju lokalnog " psa čuvara " ovog procesa , koji pažljivo odmerava stopu filtracije i stopu reapsorpcije. Naziva se JGA (jukstaglomerularni aparat), i predstavlja kolekciju ćelija koja se nalazi u sendviču između glomerularnih arterija i u tubulima. Prisutnost JGA u delu gde dolazi krvotok do glomerula i pristupnost JGA u tubulima, omogućava ovom aparatu da prati i reguliše kako glomerularnu filtraciju, tako i tubulsku reapsorpciju. JGA se sastoji od dve vrste ćelija, makule densa i jukstaglomerularnih ćelija. Makula densa, je specijalizovana epitelijalna

ćelija tubula sa mogućnošću da prati protok u okviru lumena tubula. Jukstaglomerularne ćelije koje se nalaze na aferentnim arteriolama (slika 5), imaju jedinstvene modifikacije koje im omogućavaju da proizvedu i otpustite renin. Oslobođanje renina dovodi do formiranja i oslobađanja niza drugih transmitera, uključujući angiotenzin i aldosteron, koji imaju izuzetno važnu ulogu u regulisanju natrijuma (i, zbog toga, ukupne telesne tečnosti), krvnog pritiska, i renalnog protoka krvi. Jukstaglomerularne ćelije i makula densa, obezbeđuju komunikaciju između tubula i aferentnih arteriola. Smanjenje u tubularnom protoku, na primer, koji nastaje kada glomerularna filtracija pada, može da ukazuje na pad obima telesne tečnosti i može da stimuliše oslobađanje renina. Pored toga, nervna vlakna koja snabdevaju jukstaglomerularne ćelije obezbeđuju vezu sa ostatkom tela. Aktivacija simpatičkog nervnog sistema stimuliše oslobađanje renina. Pad krvnog pritiska, tubularnog protoka ili aktivnosti nervnog sistema, mogu da stimulišu oslobađanje renina. Sposobnost da modulira filtraciju i reapsorpciju, čini JGA posebno važnim u koordinaciji aferentnih arteriola i tubula, čime održava adekvatnu zapreminu tečnosti u telu [7,8].

1.2.2.3 Održavanje homeostaze

Anatomske modifikacije omogućavaju bubregu filtriranje krvi, ekskreciju nepotrebnih materija, a zatim reapsorpciju potrebne količine čestica i vode, koja omogućuje ravnotežu u telu. Da bi se to dogodilo, moraju postojati mehanizmi koji mogu da prate količinu i ravnotežu pojedinih čestica i vode. Drugim rečima mora postojati balans između unosa preko gastrointestinalnog trakta (GI) i gubitka preko različitih organa, koji pored bubrega uključuju i respiratorni sistem, gubitke preko kože putem znoja, i gubitke iz GI trakta u stolici. Bubrege mora biti u stanju da proceni ove različite iznose i adekvatno reaguje. Metabolizam vode, zajedno sa nekim česticama, kao što su natrijum i kalijum, je veoma regulisan (zahvaljujući senzorskom mehanizmu i mehanizmu za odgovor). Drugi, kao što je kreatinin, nisu regulisani.

Proteini i ugljeni hidrati sadržani u obroku biće progutani preko GI trakta, metabolisani, i dostavljeni ćelijama, gde će biti sproveden proces katabolizma u energiju i esencijalne aminokiseline. Proteinski katabolizam će stvoriti azotni otpad, koji će biti pretvoren u ureu. Urea je propusna u svim delovima ćelija, zbog svoje solubilnosti može se kretati kroz endotelijum i ćelijske membrane. Urea se takođe slobodno filtrira u tubulni prostor, odakle se konačno izlučuje kao otpad. Iako imamo osećaj gladi, što utiče na naš unos proteina i ugljenih hidrata, nije identifikovan receptor kao senzorski mehanizam koji bi procenio relativne količine proteina i ugljenih hidrata koje su potrebne našem telu. Stoga, unos ovih materija je određen količinom hrane koje pojedemo, dok izlučivanje uglavnom određuje bubrežna filtracija. Nijedan od ova dva procesa, kada govorimo o proteinima i ugljenim hidratima, nije precizno regulisan.

Međutim, metabolizam natrijuma je sasvim precizno regulisan. Natrijum dospeva kroz intestinalni epitel u intersticijalni i vaskularni prostor. Zbog dejstva ćelijske Na/K ATP pumpe, natrijum neće ostati u ćelijskom prostoru čak iako ulazi u ćeliju. U zavisnosti od toga koliko vode se proguta tokom obroka, unos natrijuma može dovesti do izotoničnog proširenja krvnih sudova i intersticijalnog prostora, ili ako se voda nije progutala (što se gotovo nikada ne dešava, jer postoji žeđ kada unosimo soljenu hranu), voda će preći iz intracelularnog u intersticijalni i vaskularni prostor. Konačno, cirkulacija će nositi natrijum ka bubregu, gde će biti filtriran u tubulni prostor. Zato što je velika količina natrijuma filtrirana, velika većina natrijuma se reapsorbuje. Međutim, homeostaza natrijuma se određuje balansom između unosa GI traktom i gubitka preko znoja, disanjem i gubitkom preko GI trakta. Koristeći širok spektar receptora i stimulansa, telo usmerava bubreg da vrati baš pravu količinu natrijuma iz filtrata i održi ravnotežu natrijuma. Ingestijom natrijum prvenstveno utiče na intravaskularni i intersticijalni prostor, koji čine svojevrsni receptor odgovoran za ravnotežu natrijuma u ovim prostorima. Postoje i receptori koji nakon toga rade precizniju regulaciju bilansa natrijuma i nalaze se u krvnim sudovima i JGA.

Metabolizam vode je opet drugačiji. Nakon unosa voda pasivno prolazi kroz GI trakt, zajedno sa resorpcijom hranjivih materija. Pošto je većina ćelijskih membrana propusna za vodu, voda ulazi u sve kompartmane tela. Po dolasku u glomerul, voda se filtrira u tubule u skladu sa Starlingovom hipotezom. U tubulima metabolizam vode zavisi od aviditeta tubula za vodu. Tubul ima sposobnost da izlučuje vodu (u vreme viška) ili povрати skoro svu vodu (u vreme deficita vode). Ovaj proces, međutim, može postojati nezavisno od reapsorpcije natrijuma i drugih

čestica. Na taj način se omogućava da telo reguliše homeostazu vode bez uticaja homeosteze čestica. Pošto se voda distribuira u svim delovima, kompartanima tela podjednako, receptor za homeostazu vode se nalazi u ćelijskom prostoru. Promena koncentracije u okviru ćelija pokazuje promenu koncentracije i drugde u telu [7,8].

1.2 BOLESTI TUBULA I INTERSTICIJUMA

Bolesti tubula i intersticijuma čine raznorodna grupa bolesti bubrega koje odlikuju zapaljenjske i ožiljne promene ograničene uglavnom na tubule i intersticijum uz oskudno oštećenje glomerula i krvnih sudova bubrega. Tubulointersticijske bolesti najčešće su uzrokovane toksinima, infektivnim agensima ili lekovima. Nakon oštećenja navedenim agensima nastaje zapaljenje kada u mogućem daljem razvoju oštećenja značajnu ulogu mogu imati i imuni mehanizmi. Mononuklearni infiltrati koji se pojavljuju u intersticijumu kao posledica oštećenja, dovode do oslobađanja različitih medijatora zapaljenja, koji menjaju uslove u tubulointersticijskom prostoru i uzrokuju smanjenje funkcije bubrega.

Istraživanja su otkrila veliki broj antigena, neki ekstrarenalnog, a neki porekla bubrega, koji mogu započeti proces oštećenja u tubulointersticijumu. Humoralni imuni odgovor retko izaziva intersticijske nefritise i uglavnom su izazvani lekovima. Ćelijski imuni odgovor je daleko značajniji u patogenezi intersticijskog nefritisa. Obično se infiltrati mononuklearnih ćelija sastoje od T limfocita. Preostale ćelije u infiltratu obično predstavljaju monocite, dok je udeo ostalih ćelija mali. Iako oštećenje može indukovati jedan klon ćelija imuniteta, krajnje oštećenje u pojedinim bolestima bubrega nastaje kao rezultat interakcije između različitih bubrežnih ćelija i ćelija u infiltratu.

Smatra se da postoji i efekat pojačanja zapaljenja kada je ono već nastalo, aktivacijom komplementa, oslobađanjem citokina, proteaza, aktivacijom brojnih efektnih nespecifičnih ćelija (makrofaga, eozinofila) koji produkuju nove medijatore zapaljenja.

U bubregu postoji nekoliko tipova intersticijskih ćelija na koje kao na ciljno tkivo deluju inflamatorni medijatori, a čija je aktivacija direktno odgovorna za sintezu ekstraćelijskog matriksa. To su intersticijski fibroblasti, epitelne ćelije i endotelne ćelije. Neki trombocitni faktori

(PDGF i TGF- β) rasta i C5 komponenta komplemента mogu snažno privlačiti fibroblaste u područje zapaljenja, a fibronektin i kolagen tipa I i II mogu povećati pokretljivost ćelija. Kretanje fibroblasta kroz ekstracelularni matriks dalje ubrzavaju metaloproteinaze oslobođene iz makrofaga ili samih fibroblasta.

Nakon pristizanja fibroblasta u region zapaljenja, fibroblasti započinju deponovanje fibronektinskog matriksa, što predstavlja osnovu za stvaranje kolagena. U početnoj fazi formiranja kolagena stvaraju se fibrile i više kolagen tipa III, a manje kolagen tipa I. Postoji čitav niz medijatora koji dalje pospešuju ili vrše inhibiciju stvaranja kolagena, ali su još uvek nepoznati specifični mehanizmi koji smanjuju ili blokiraju fibrogeni odgovor u tubulointercijumu. Nakon opisanih mehanizama oštećenja nastaje fibroza intersticijuma.

Proteinurija uzrokovana glomerulskim oštećenjem može da dovede do oštećenja tubulskih ćelija i intersticijuma različitim mehanizmima. Prvo, proteini sadrže gvožđe, a odvajanjem gvožđa od vezujućeg proteina, oslobađa se gvožđe koje može učestvovati kao katalizator u stvaranju reaktivnih slododnih radikala kiseonika. Navedenim mehanizmom, gvožđe vezano za proteine koje izbegne reapsorpciju u proksimalnim tubulima, može da ispolji toksično dejstvo u lumenu tubula. Drugi štetni mehanizam proteinurije može nastati kada dođe do razdvajanja lipida od albuminskog nosača za vreme reapsorpcije proteina. Ako je navedeni proces obiman, neki lipidi hemotaktički privlače ćelije zapaljenja i tako indukuju oštećenje tubulointercijuma. Postoji mogućnost da aminokiseline poreklom od reapsorbovanih proteina, u većoj koncentraciji ispolje toksično dejstvo. Na kraju prisustvo velike količine proteina mogu izazvati stvaranje cilindara prvenstveno u distalnim segmentima nefrona. Cilindri potom mogu opstruisati lumen i smanjiti filtraciju.

Nakon izlaganja nefrotoskičnom agensu, dolazi do hipertrofije epitela tubula i povećanja tubulske funkcije. Ova kompenzatorna hiperfunkcija tubulskog epitela može pri određenom stepenu da prestane da bude korisna, jer ograničava difuziju nutritivnih sastojaka u tubule, a toksičnih materija iz tubula. Pored toga, neke funkcionalne adaptacije se smatraju potencijalnim mehanizmima oštećenja tubulskih epitelnih ćelija u hroničnoj progresivnoj bubrežnoj bolesti. Prva takva funkcionalna adaptacija je povećanje stvaranja amonijuma u proksimalnim tubulima. Amonijum i njegove slobodne baze burno reaguju sa trećom komponentom komplemента koji dovode do aktivacije brojnih medijatora koji dalje dovode do oštećenja tubula i intersticijuma.

Hipertrofisani tubulski epitel zahteva za svoj rad i više energije i koristi velike količine kiseonika po jedinici preostalih nefrona. Tim procesom mogu nastati nusprodukti oksidativnog metabolizma (superoksidni radikali) koji mogu delovati štetno na epitel tubula. U mnogim progresivnim bubrežnim bolestima, posebno tubulointersticijskim bolestima, česti su depoziti kristala kalcijum oksalata ili fosfata, manje urata, koji nisu posledica primarnih oštećenja metabolizma navedenih materija. Navedeni kristali potom pokreću kaskadu različitih reakcija koje dovode do oštećenja tubula.

Postoji značajana korelacija između stepena bubrežne insuficijencije i izraženosti promena u tubulointersticijumu. Iako se progresija bubrežne insuficijencije izražava promenom GFR, progresija bolesti manje zavisi od promena u glomerulima, a više od fibroze intersticijuma. Obliteracija aferentne i eferentne arteriole uzrokovana fibrozom kompromituje protok krvi kroz glomerule i vodi smanjenju filtracije. Razvoj fibroze oko peritubulskih i postglomerulskih kapilara još više povećava ukupni eferentni otpor, što vodi ka progresivnom glomerulskom oštećenju. Tako oštećenje intersticijuma dovodi do skleroze glomerula [9].

1.3.1 Hronični tubulointersticijski nefritis (HTN)

Po toku oštećenje tubulointersticijuma može biti akutno i hronično. U ovom doktoratu je sproveden eksperiment hronične toksičnosti, te je zanimljiviji hronični tubulointersticijski nefritis (HTN). Za razliku od akutnog, bubrezi su u HTN normalni ili smanjeni. U patohistološkom preparatu HTN postoji atrofija tubulskih ćelija sa spljoštenim epitelnim ćelijama i dilatacijom tubula, fibroza intersticijuma i zone inflamatornog infiltrata u intersticijumu i između tubula. Tubulska bazalna membrana je često zadebljala. Neutorfilni leukociti ili limfociti se mogu videti u epitelu tubula sa mogućim stvaranjem celularnih cilindara. Inflamatorni infiltrat se sastoji od limfocita i samo slučajno prisutnim neutrofilnim leukocitima, plazma ćelijama i eozinofilima. Retko postoji intersticijski edem, hemoragije ili dominantni neutrofilni infiltrat. U početku hronične intersticijske lezije bubrega, glomeruli su očuvani, da bi progresijom HTN postalo vidljivo i glomerulsko oštećenje u vidu glomerulske fibroze i segmentne skleroze. Male arterije i arteriole pokazuju zadebljenje, ali vaskulitis ne spada u sliku HTN.

Dva najznačajnija oboljenja tubulointersticijuma ljudi koja se povezuju sa uticajem aristolohične kiseline su: kineska biljna nefropatija i balkanska endemska nefropatija (BEN) [9].

1.3.1 Kineska biljna nefropatija

Kineska biljna nefropatija (Chinese Herb Nephropathy – CHN) je progresivna intersticijalna fibroza bubrega, koja u većini slučajeva dovodi do urotelijalnog karcinoma [10,11]. Devedesetih godina kreće intenzivnije istraživanje [12,13]. Prvi put je definisana kao oboljenje, kada su opisani slučajevi trovanja preparatima za mršavljenje koji su u sebi greškom sadržali biljku *Aristolochia fungii*. Oboleli su bili izloženi hroničnom trovanju ovom biljkom, kada se razvila globalna hronična bubrežna insuficijencija. Potom je daljim istraživanjem utvrđeno da se ova bolest sporadično javlja u mnogim drugim zemljama. Smatra se da aristolohična kiselina dovodi do nastanka ovog oboljenja, jer je utvrđeno prisustvo AA-DNK jedinjenja u bubrezima i urotelijalnom traktu obolelih [14]. Kod ovih pacijenata, analiza krvi pokazala je tubularnu proteinuriju i glukozuriju. Ova tubularna proteinurija detektovana i kod asimptomatskih pacijenata, govori o tome da je smanjena funkcija proksimalnih tubula bubrega, nastala kao rezultat toksičnog dejstva aristolohične kiseline na ovaj organ [15]. Razvija se rapidni i progresivni fibrozirajući proces intersticijuma bubrega [16,17]. Takođe opisan je razvoj karcinoma urotela gornjeg urotakta nakon izlaganja dejstvu biljke, čak i bez razvoja uznapredovale bubrežne insuficijencije [18,19].

1.3.1 Balkanska endemska nefropatija (BEN)

BEN je hronična bubrežna tubulointersticijalna bolest koja pogađa stanovnike ruralnih naselja u pritokama Dunava u Bosni, Srbiji, Hrvatskoj, Bugarskoj i Rumuniji. Opisali su je nezavisno jedan od drugog Danilović [20]. i Tančev [21]. Danilović je radeći kao lekar opšte prakse u Lazarevcu 1941, prvi zapazio ovu pojavu i izvestio međunarodnu javnost što je doprinelo njenom daljem izučavanju [22,23]. BEN se javlja u Jugoistočnoj Evropi, najvećim delom duž pritoka Dunava, ali i uz pritoke reke Drim koja pripada Jadranskom slivu. To negira raniju tvrdnju da je bolest podunavska nefropatija. Broj zahvaćenih naselja nije sa sigurnošću utvrđen, ali postoje izveštaji da je u bivšoj Jugoslaviji bilo zahvaćeno 150 naselja, Rumuniji 40 i

Bugarskoj 56 naselja. Prevalenca oboljenja je retko iznad 10%, a stopa specifičnog mortaliteta je do 4%. To znači da mnogi slučajevi BENA, zbog dugog razvoja bolesti, ne završavaju u terminalnoj bubrežnoj insuficijenciji, nego umiru od drugih bolesti [24]. Obično se javlja od 30 do 60 godine, retko pre 20 godine života. Nema razlike u zastupljenosti polova. Oboleli od BENA su u najvećoj meri zemljoradnici, a drugi oboleli se po pravilu dodatno bave zemljoradnjom ili su iz endemskih sela. Stanovnici okolnih gradova obično ne oboljevaju. Posebno je od značaja njen porodični karakter [25,26]. Većina autora ističe značaj višegodišnje ekspozicije štetnom agensu i do 20 godina u endemskom žarištu. To potvrđuje da se bolest razvila kod nekih obolelih i nakon preseljenja iz endemskog područja, dok odseljeni u dečijem uzrastu izbegavaju rizik od dobijanja BEN. Posebna činjenica je da je BEN udružen sa izrazito visokom učestalošću karcinoma urinarnih puteva. Prevalenca malignoma je oko 100 puta veća u odnosu na neendemska područja. Etiologija BEN je nepoznata. Postoje brojni radovi i rasprave autora o mogućem uzročniku [27,28].

BEN odlikuje neinflamatorno tubulointersticijsko oboljenje bubrega udruženo sa pojavom karcinoma uretera i pijelona. Patohistološke promene nisu specifične i slične se nalaze i u nefrosklerozi, tubulointersticijskim bolestima izazvanim teškim metalima, mikotoksinom ochratoxinom A, ciklosporinom. Makroskopskim pregledom bubrega umrlih od BEN, konstatuju se smanjeni bubrezi. Kod 15% bolesnika se nalaze tumori gornjeg urotrakta, a kod 3,4% kongenitalne anomalije. Patohistološkim pregledom umrlih od BEN vidi se difuzna fibroza kortikalnog dela intersticijuma i tubulska atrofija bez postojanja značajnih intersticijskih infiltrata. Glomeruli su obično očuvani, delimično kolapsno izmenjeni ili eventualno postoji fokalna ili generalizovana skleroza [29,30].

Početak bolesti nikada nije akutan, jedva je primatan, sa nespecifičnim simptomima koji se učestalije javljaju sa pojavom globalne bubrežne insuficijencije i ne pokazuju nikakve specifičnosti za BEN. Činjenica je da se simptomi hronične bubrežne insuficijencije veoma dobro podnose do krajnjeg stadijuma bolesti. Prvi simptomi bolesti su bledilo kože i prisutnost ksantoze dlanova i tabana. Kasnije klinički znaci odgovaraju znacima i drugih hroničnih nefropatija, te nema puno karakterističnih odlika. Retko kada se javljaju otoci i pacijenti imaju uredan krvni pritisak.

Laboratorijski znaci su isto nespecifični. Izgled, boja i količina urina su nepromenjeni sve do pojave izražene bubrežne insuficijencije, kada se javlja poliurija. Proteinurija je oskudna, često intermitentna, a postaje izrazitija pojavom globalne bubrežne insuficijencije. Pojava eritrocita u urinu pobuđuje sumnju na tumor urinarnog trakta. Urinokulture su obično negativne, a ređe se nalazi nesignifikatna bakteriurija. Anemija se obično javlja u ranom stadijumu bolesti.

Laboratorijski parametri su manje značajni za prepoznavanje BEN i odgovaraju zapravo stepenu hronične bubrežne insuficijencije [9].

1.4.1 HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE BUBREGA

Kao što je opisano, na preseku tkiva bubrega, razlikuje se kora, cortex i srž, medulla. U srži se nalazi 8-15 Malpigijevih piramida, piramida renales, čija je baza usmerena ka korteksu, a vrh štrči u bubrežnu čašicu, calix renalis, koje je u sklopu papille renalis. Fereionove piramide su zrakaste, prstolike formacije, koje sa baze Malpigijevih piramida ulaze u koru. Između njih se nalazi kortikalna supstanca, Fereionove piramide se protežu prema meduli i uvlače se između Malpigijevih piramida. Fereionova piramida sa okolnom kortikalnom supstancom čini lobulus, a Malpigijeva piramida sa okolnom kortikalnom supstancom čini jedan lobus [3,4,5,6].

Kortikalnu i medularnu supstancu čine pojedini segmenti nefrona i sistema izvodnih kanala. Nefron je sekretorna jedinica bubrežnog parenhima i imai ih oko 2.000 000 u oba bubrega. Nefron je izgrađen od: corpusculum renis (Mapigijevo telašce), portio principalis, ansa Henlei i portio distalis. Izvodni kanali su: ductus reuniens, ductus colligens i ductus papillaris [4,5,6].

Malpigijevo telašce je oblika lopte i nalazi se u kortikalnoj sustanci, a poseduje dva pola: vaskularni i urinarni. Čini ga kapilarna petlja i Bovmanova kapsula. Bovmanova glomerularna čaura (capsula glomeruli Bowmani) obavlja arterijsko klupko, a čine je dva epitelna lista: spoljašnji i unutrašnji, između koji se nalazi kapilarna šuljina. Pri proticanju krvi kroz

glomerularno klupko, vrši se proces filtracije, pri čemu se iz krvi dobija glomerularni filtrat ili prvobitna, primarna mokraća (Slika 6).



Slika 6. Glomerul miša slikan elektronskim mikroskopom (uvećanje 1000x).

Preuzeto sa site Wikipedia slobodno pod uslovima **GNU Free Documentation License**.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4b/Glomerulum_of_mouse_kidney_in_Scanning_Electron_Microscope%2C_magnification_1%2C000x.GIF/800px-

[Glomerulum_of_mouse_kidney_in_Scanning_Electron_Microscope%2C_magnification_1%2C000x.GIF](#)

Ona se sakuplja u šupljini Bowmanovog prostora, a odatle odlazi u bubrežnu cevčicu u kojoj se iz glomerularnog filtrata, resorbuju izvesne supstance, a ostatak predstavlja definitivnu mokraću. Između kapilarnih petlji telašca nalaze se mezangijske ćelije [3].

Portio principalis čine dva dela: pars convoluta i pars recta. Kanali su obloženi ćelijama piramidalnog oblika, gusto granulirane tamne citoplazme sa mikroviloznim izdancima na apikalnom polu, koji grade četkasti pokrov. Lumen je veoma uzan. Izuvijani deo segmenta čini najveći deo kortikalne mase, dok pravi kanali ulaze u sastav Fereinovih piramida, zajedno sa pravim kanalima distalnog segmenta i sabirnim kanalićima [4].

Ansa-u Henlei (Henleova petlja) čine kanalići obloženi pločastim epitelom, koji su smešteni u meduli bubrega, unutar Malpigijevih piramida.

Portio distalis sačinjavaju pars convoluta i pars recta. Ćelije su svetlije citoplazme, u odnosu na portio principalis, niže su, lumen je širi i jasno uočljiv. Pars recta je deo Fereinovih piramida, a pars convoluta ulazi u sastav kortikalne supstance, između izuvijanih kanalića proksimalnog segmenta i korpuskula. Macula densa pripada izuvijanom delu distalnog segmenta, naleže na Malpigijevo telašće i obložena je visokoprizmatičnim ćelijama. Od izuvijanog kanalića distalnog segmenta polazi kratak sabirni kanalić lučnog oblika, ductus reuniens, čiji je epitel kockast, te ga je na poprečnom preseku teško razlikovati od izuvijanih kanalića iz predela nefrona. Sabirni kanal, ductus colligens, proteže se kroz Fereinove i Malpigijeve piramide, ali je najlakše uočljiv u predelu Malpigijevih piramida. Epitel od kockastog prelazi u visokocilindrični, kako se ide ka vrhu Malpigijevih piramida. Jedra su bazalno postavljena, citoplazma je svetla, a lumen jasno uočljiv [3,4,5,6].

U blizini papile nastaje ductus papillaris, obložen dvorednim prizmatičnim epitelom, koji se u predelu papile menja sa prelaznim epitelom, iz predela bubrežne čašice, calix renalis. Bazalna membrana bubrežne karlice je u kontinuitetu sa bazalnom membranom sabirnih kanalića, manjeg kalibra. Intersticijalno tkivo bubrega je slabije zastupljeno i teže se uočava, na standardnom HE bojenju. U meduli između Henleove petlje, sabirnih kanalića i krvnih sudova uočava se vezivo sa fibroblastima. Gomori metodom bojenja, srebrna impregnacija, uočavaju se retikularna vlakna, a Sudan bojenjem zamrznutih tkiva mogu se prikazati lipidne kapi, unutar pojedinih ćelija intersticijuma bubrežne medule [4,6].

Posmatrajući bubrežni morfološki i anatomske, idući od spolja ka unutra, nailazimo na tri čaure. Prethodno opisana, capsula fibrosa šalje veći broj vezivnih nastavaka, interlobularnih pregrada, prema masnoj kapsuli, ali su one samo tanje i kraćeg toka vezivne septe usmerene ka

bubrežnom parenhimu, tako da lobulacija odraslih nije izvršena pomoću veziva. Krvni sudovi čine osnov lobulacije bubrega. Kroz medulu, između Malpigijevih piramida prolazi arteria interlobaris. Na bazi piramide ona daje, pod pravim uglom arteriju, koja se nalazi na granici kore i srži. Od arteriae arcuatae ka kori se odvajaju arteriae interlobulares, sa tokom između Fereinovih piramida. Od njih potiču arteriollae afferentes, koje ulaze u corpusculum renis i rasipaju se u kapilarnu petlju. Krv izlazi iz glomerula putem arteriollae efferens. Od eferentnih arteriola juksamedularnih nefrona odvajaju se arteriollae medullares rectae spuriae, koje u najvećoj meri vaskularizuju srž bubrega. Manji deo vaskularizacije potiče od arteriollae medullares recae verae, koja se odvaja od a. arcuatae. Subkapsularno nalaze se venae stellatae, koje prelaze u venae interlobulares, prateći sve ogranke arterija, kao vv. arcuatae i vv. interlobulares. Upotrebom kontrasta vizualizuje se samo arterijski deo krvotoka [3,5,6].

1.5 ARISTOLOCHIA

Više od 2500 godina, biljke iz roda *Aristolochia* i familije *Aristolochiaceae*, koriste se u medicinske svrhe. U starim spisima je spominjana terapijska uloga ekstrakta ovih biljaka, koji su se koristili u lečenju: gihta, reumatizma, kostobolje, artritisa, gnojnih rana i astme. Svi delovi biljke korišćeni su za pripremu ekstrakta (koren, list, stablo i plod). Zanimljivo je to što pored terapijske upotrebe, u ovim starim dokumentima uopšte nije ukazivano na njihovo moguće toksično dejstvo. Danas je, međutim, poznato da se u gotovo svim vrstama roda *Aristolochia*, nalazi aristolohična kiselina koja je odgovorna za pojavu oboljenja kao što su: kineska biljna nefropatija i balkanska endemska nefropatija [31]. Obe bolesti su povezane sa poremećajima na nivou bubrega u smislu njihove fibroze i kancerogenim promenama urotela [32,33,34].

Familija *Aristolochiaceae* obuhvata preko 400 vrsta, klasifikovanih u osam rodova: *Apama*, *Aristolochia*, *Asarum*, *Euglypha*, *Holostylis*, *Lactoris*, *Saruma*, *Thottea* i *Hexastylis*, rasprostranjenih pretežno u Mediteranskim regionima Evrope. U okviru ove porodice, rod *Aristolochia* je najzastupljeniji i broji više od 300 vrsta. U Evropi je zastupljeno ukupno 18 različitih vrsta ovog roda, od kojih su tri autohtone i rastu u severozapadnoj Evropi. U Srbiji, prisutne su dve vrste roda *Aristolochia* a to su: *Aristolochia clematitis* i *Aristolochia palida* [35].

1.5.1 Vrsta *Aristolochia clematitis* L.

Vrsta *Aristolochia clematitis* L. je višegodišnja biljka sa kratkim puzećim, žučkastosmeđim, člankovitim, ponekad razgranatim rizomima. Stablo je uspravno, jednostavno, golo, neprijatnog mirisa. Pri osnovi ima nekoliko jajastih, smeđih priljubljenih ljuspi. Listovi su na dugačkim drškama, pri osnovi duboko su srcasti, trouglasto jajasti, po obodu su sitno nazubljeni. U pazuhu listova razvijaju se dva do osam cvetova sa kratkim peteljka. Za vreme cvetanja su uspravni, a kasnije su viseći. Cvetni omotač je sumporno žute boje, pri osnovi je trbušasto

proširen, u gornjem delu je u vidu jajastog jezička. Cev perigona je dvostruko duža od jezička, a sa unutrašnje strane ima dlake, koje su okrenute naniže (specifična prilagođenost za oprašivanje insektima). Plodnik je zelene boje, cilindrično je izdužen i potcvetan. Plod je višesemena čaura, zelene boje, kruškastog do loptastog oblika. Seme je kestenjasto, trouglastog oblika. Cveti od juna do septembra. Rasprostranjena je u čitavoj južnoj i srednjoj Evropi, kao i u severnoj Americi [34].



Slika 7. Crtež predstavlja *Aristolochia clematitis*, ilustruje faze sazrevanja biljke. Plod, kapula koja sadrži seme jeprikazana dole desno. Sa dozvolom od K. Stüber. Kurt Stüber's Online Library (www.biolib.de).

1.4.2 Osnovne karakteristike aristolohične kiseline

Kod vrsta roda *Aristolochia* (*A. clematitis*, *A. contorta*, *A. debilis*, *A. fangchi*, *A. indica*, *A. manshuriensis*, and *A. serpentaria*), prvenstveno je prisutna aristolohična kiselina (AA), koja pripada porodici nitrofenantrenskih karboksilinskih kiselina. Ona je zastupljena i u vrstama roda *Asarum*, koji pripada istoj porodici (*Aristolochiaceae*). Dva najvažnija derivata ove kiseline su: aristolohična kiselina I (AAI) i aristolohična kiselina II (AAII) (Shibutani i sar., 2007). Obe kiseline su genotoksični mutageni, jer imaju mogućnost da sa purinskom bazom DNK molekula stvaraju jedinjenja, nakon što se izvrši njihova metabolička aktivacija (Arlt i sar., 2006). Aristolohična kiselina se apsorbira preko gastrointestinalnog trakta i distribuira u druge delove tela. Prema dosadašnjim podacima, aristolohična kiselina I metaboliše se oksidativnim i reduktivnim putem, dok se aristolohična kiselina II, metaboliše samo reduktivnim putem. Metaboliti aristolohične kiseline I kod pacova i miša uključuju: aristolaktam I, aristolaktam Ia, aristolohičnu kiselinu Ia, aristolohičnu kiselinu I, 3,4-metilenedioksi-8-hidroksi-1-fenantrenkarboksiličnu kiselinu i dekarboksilovani metabolit. Metaboliti aristolohične kiseline II su: aristolaktam II, aristolaktam Ia i 3,4-metilenedioksi-1-fenantrenkarboksilična kiselina. Ovi metaboliti ekskretuju se putem urina i fecesa. Dokazano je da se metaboliti aristolohične kiseline, ekskretuju iz organizma za 24 h, dok se metaboliti aristolohične kiseline II zadržavaju u urinu 72 h [35,36,37].

Danas se koristi veliki broj metoda za identifikaciju prisustva aristolohične kiseline kao što su: tankoslojna hromatografija, gasna hromatografija, visokoperformantna tečna hromatografija (HPLC), nuklearna magnetna rezonanca i kapilarna elektroforeza.

II CILJEVI RADA

CILJEVI istraživanja su:

1. Istražiti uticaj Aristolochia clematitis na urinarni trakt, posebno bubreg eksperimentalnih životinja miševa soja NMRI, per os unosom infuza
2. Ispitati uticaj Aristolochia clematitis na razvoj tumorske proliferacije urinarnog trakta miševa soja NMRI.
3. Utvrditi sličnost eventualno pronađenih promena na urinarnom traktu eksperimentalnih životinja sa promenama koje se opisuju na urinarnom traktu pacijenata koji boluju od BEN-a.
4. Utvrditi promene u diurezi, biohemijskim parametrima, krvnoj slici i nalazu urina eksperimentalnih životinja

HIPOTEZE:

1. Nakon hronične intoksikacije sa Aristolochia clematitis mogu se očekivati promene na urinarnom traktu eksperimentalnih životinja miševa soja NMRI.
2. Nakon hronične intoksikacije Aristolochia clematitis mogao bi se očekivati razvoj tumorskih proliferacija urinarnog trakta.
3. Očekuje se da postoje sličnosti promena na urinarnom traktu kod eksperimentalnih životinja tretiranih Aristolochia clematitis i pacijenata koji boluju od BEN.

IV MATERIJAL I METODE

Biljni materijal, korišćen u ovom istraživanju, sakupljen je u toku maja meseca 2013. godine na lokacijama oko Novog Sada. Biljka pod nazivom vučja stopa (*Aristolochia clematitis*) je sušena na sobnoj temperaturi od 27 °C, u periodu od 30 dana. Sasušeni listovi, grane i plodovi biljke *Aristolochia clematitis* su potopljeni u ključalu vodu i ostavljeni 3-5 sati da stoje, a potom su profiltrirani kroz filter papir. Pravljen je rastvor biljka/voda; od 10g/ 1000ml (1%), 20g/ 1000ml (2%) i 40g/ 1000ml (4%). Različite koncentracije infuza su date miševima da piju u neograničenoj količini u periodu od 7 nedelja.

Eksperiment je izveden u Pasterovom zavodu u Novom Sadu na eksperimentalnim životinjama. Eksperimentalne životinje predstavljaju adultne bele laboratorijske miševe soja NMRI oba pola, približno jednake težine (25g) i uzrasta. Ukupan broj tretiranih miševa je 80 od čega je 40 jedinki ženskog pola, a preostalih 40 muškog pola. U odvojenim kavezima su se nalazili miševi ženskog i muškog pola, i tretirani su standardnim laboratorijskim uslovima u vivarijumu Pasterovog zavoda u Novom Sadu.

Eksperimentalne životinje

Životinje su podeljenje u četiri grupe po 20 jedinki :

Eksperimentalna grupa 1 – mužijaci, koji su dobijali infuz od 10g/ 1000ml, tj (1% infuz).

Eksperimentalna grupa 2 – ženke, koje sue dobijala infuz od 20g/ 1000ml, tj (2% infuz).

Eksperimentalna grupa 3 - mužijaci, koji su dobijali infuz od 40g/ 1000ml, tj (4% infuz).

Kontrolna grupa - ženke, koje su dobijala samo vodu.



Slika 8. Metabolički kavezi koji su korišćeni za sakupljanje urina.

Koristeći metaboličke kaveze (slika 8) sakupljana je dvadesetčetvoročasovna diureza od svih eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe. Određena je zapremina izlučenog urina kao i analiza urina koja podrazumeva utvrđivanje: boje, izgleda, pH, specifične težine, proteina i sedimenta urina. Merenja su ponavljana na svakih sedam dana, u trajanju od 7 nedelja koliko je eksperiment trajao, u Centru za laboratorijsku medicinu, Odeljenje za kliničku biohemiju Kliničkog centra Vojvodine. Nalaz urina je urađen standardnom trakicom za biohemijski pregled urina u okviru laboratorije i mikroskopskim pregledom sedimenta urina od strane laboranta u laboratoriji.

Na kraju istraživanja uzeti su uzorci krvi iz svake jedinke tretirane infuzom *Aristolochia clematitis*. Uzeta krv je korišćena za analizu standardne krvne slike i, biohemijskih parametara (glukoza, uree, kreatinin, mokraćna kisleina, ukupni bilirubin, direktni bilirubin, ukupni tj totalni proteini, natrijum i kalijum).

Za biohemijske parametre po standardima laboratorije koja je obrađivala uzorak bilo je potrebno 6-8 ml krvi za analizu. Pošto se navedena količina krvi nije mogla dobiti iz jedne jedinke miša, više jedinki eksperimentalnih životinja iz iste ispitne grupe, je žrtvovano da bi se dobila potrebna količina krvi samo za izračunavanje biohemijskih parametara. Tada je došlo do

mešanja krvi nekoliko životinja iz jedne ispitne grupe. Ispod su navedene referentne vrednosti kompletne krvne slike i biohemijskih parametara za miša.

Tabela 1. Referentne vrednosti za krv miša (Research Animal Resources, University of Minnesota, Reference Values for Laboratory Animals).

<http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>

RBC ($10^{12}/l$)	7-12,5
HCT (%)	36-54
Hgb (g/dl)	11-19,2
MCV (fl)	48-70
MCH (pg)	??
MCHC (g/dl)	40
WBC ($\times 10^9/l$)	6-18
NE (%)	10-30
LY (%)	65-85
MO (%)	0-5
EO (%)	0-6
BA (%)	0-1
PLT ($\times 10^9/l$)	500-1300

Glukoza (g/dl)	62-175
Urea (mg/dl)	8-33
Kreatinin (mg/dl)	0,2-0,9
Ac. uricum	??
Uk. bilirubin (mg/dl)	0-0,9
D. bilirubin	??
T. proteini (g/dl)	3,5-7,2
Natrijum (mEq/l)	140-160
Kalijum (mEq/l)	5-7,5

Tabela 2. Vrednosti laboratorijskih parametara krvne slike i biohemijskih parametra dobijeni analizom NMRI soja miša u radu Aleman CL i saradnici [38].

Variable	Sex	Mice		Variable	Sex	Mice	
		Mean	SD			Mean	SD
Haemoglobin (g/100 ml)	M	13.33	1.82	Glucose (mmol/l)	M	8.50	2.57
	F	14.38	0.81		F	6.89	2.94
Haematocrit (%)	M	42.00	5.85	Creatinine (μ mol/l)	M	50.94	11.69
	F	45.67	4.13		F	52.92	6.47
Neutrophils (%)	M	18	3	AST (iu)	M	88.29	23.40
	F	20	3		F	92.34	35.89
Lymphocytes (%)	M	83	2	ALT (iu)	M	47.00	15.68
	F	80	3		F	49.01	18.04
Monocytes (%)	M	2	1.3	Alkaline phosphatase (iu)	M	73.42	15.72
	F	2	3.1		F	53.46	13.73
Eosinophils (%)	M	3	3.4	Acid phosphatase (iu)	M	—	—
	F	3	3.7		F	—	—
Total (cells/mm ³)	M	5714.3	995.7	AChE (U)	M	0.73	0.08
	F	6050.0	554.1		F	0.96*	0.10

M = male; F = female; SD = standard deviation

Navedene vrednosti za krvnu sliku i biohemijske parametre miša, koji su navedeni, nisu direktno korišćeni za poredjenje u rezultatima, ali jesu korišćeni u diskusiji.

U toku eksperimenta šest jedinki je uginulo, dok su preostale žrtvovane etarskom anestezijom na kraju eksperimenta.

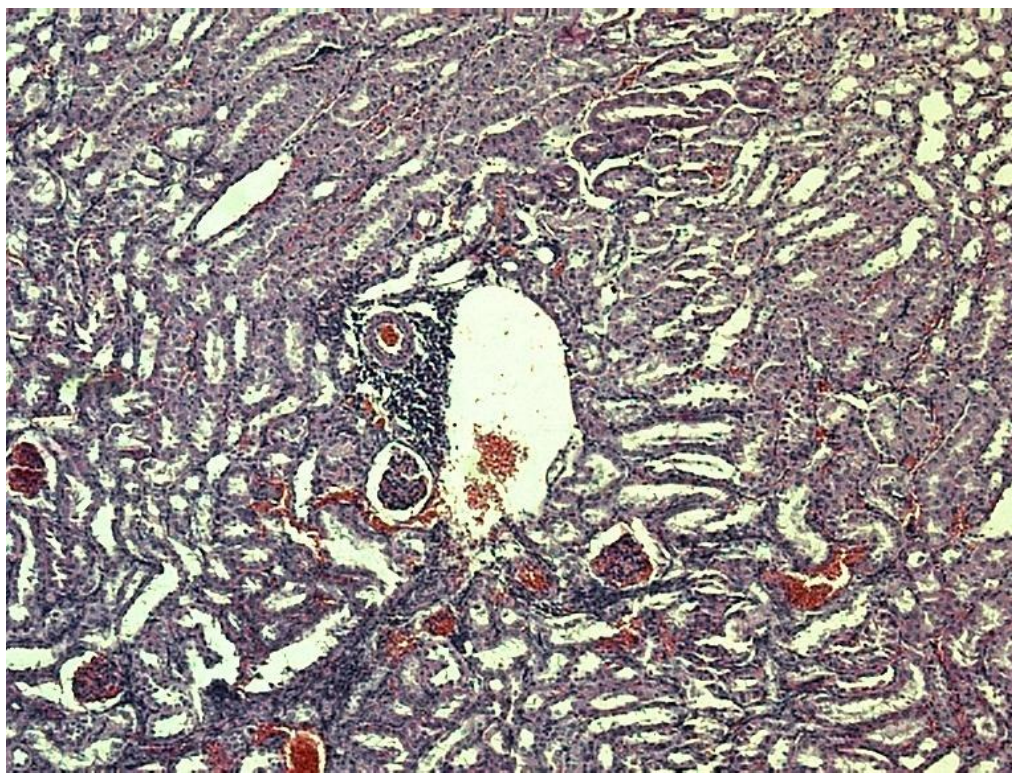
Patohistološka tehnika

Sve jedinke su detaljno obdukovane, dok su posebno odvojeni bubrezi i ceo urogenitalni sistem svake jedinke i fiksirani u 10% formalinu. Tkivo je zatim dehidrirano u 96% etanolu i izopropil alkoholu, kalupljeno u parafinu i sečeno sa rotacionim mikrotomom marke Leica na isečke debljine 3-5 μ m. Isečci su bojani histološkom metodom H&E.

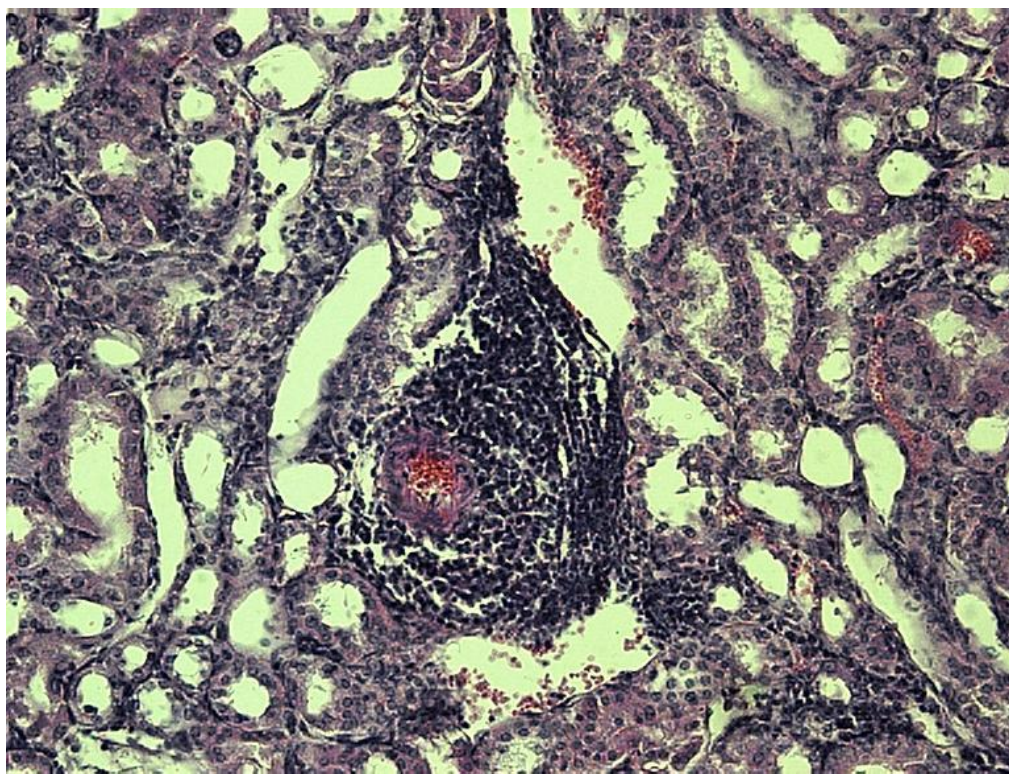
V REZULTATI

5.1.1 Patohistološka analiza

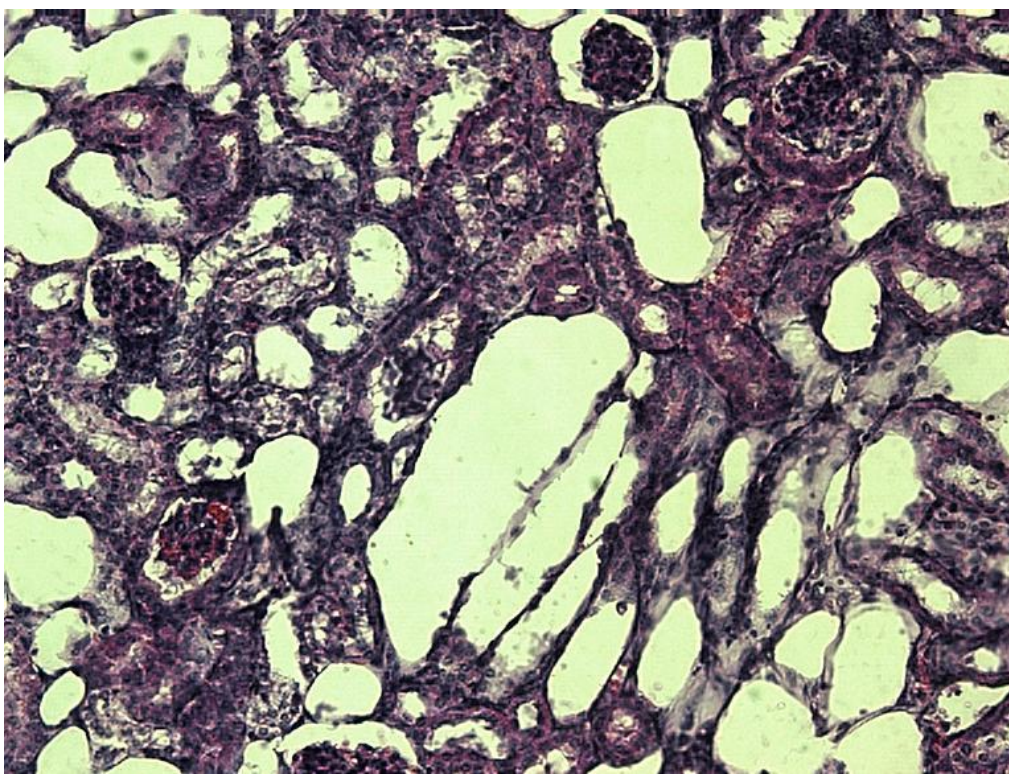
Kod svih eksperimentalnih grupa je uočena razlika u oštećenosti bubrežnog parenhima tako da je Eksperimentalna grupa 1 imala najmanje izražene promene (slika 2), Eksperimentalna grupa 2 je imala blago izražene promene (slika 3) dok je Eksperimentlana grupa 3 imala najveće promene na parenhimu tubula (slika 4).



Slika 9. Patohistološki preparat bubrega - *Eksperimentlana grupa 1*

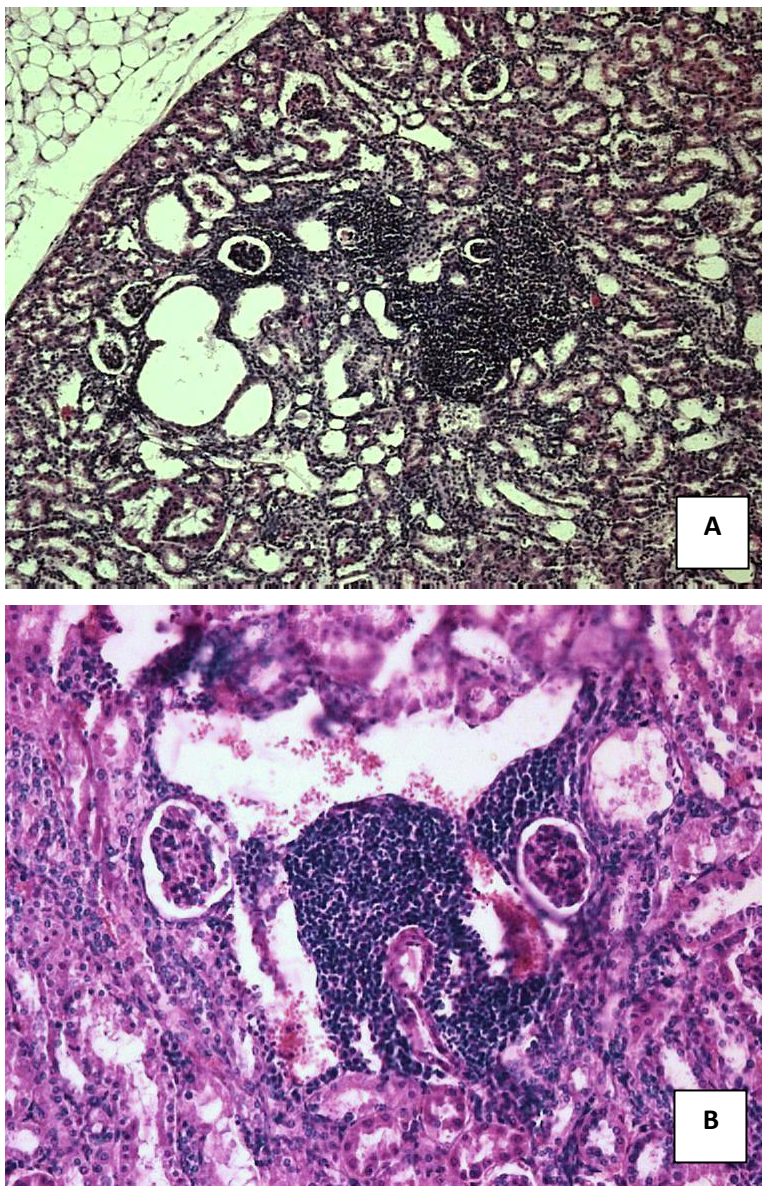


Slika 10. Patohistološki preparat bubrega - *Eksperimentlana grupa 2*

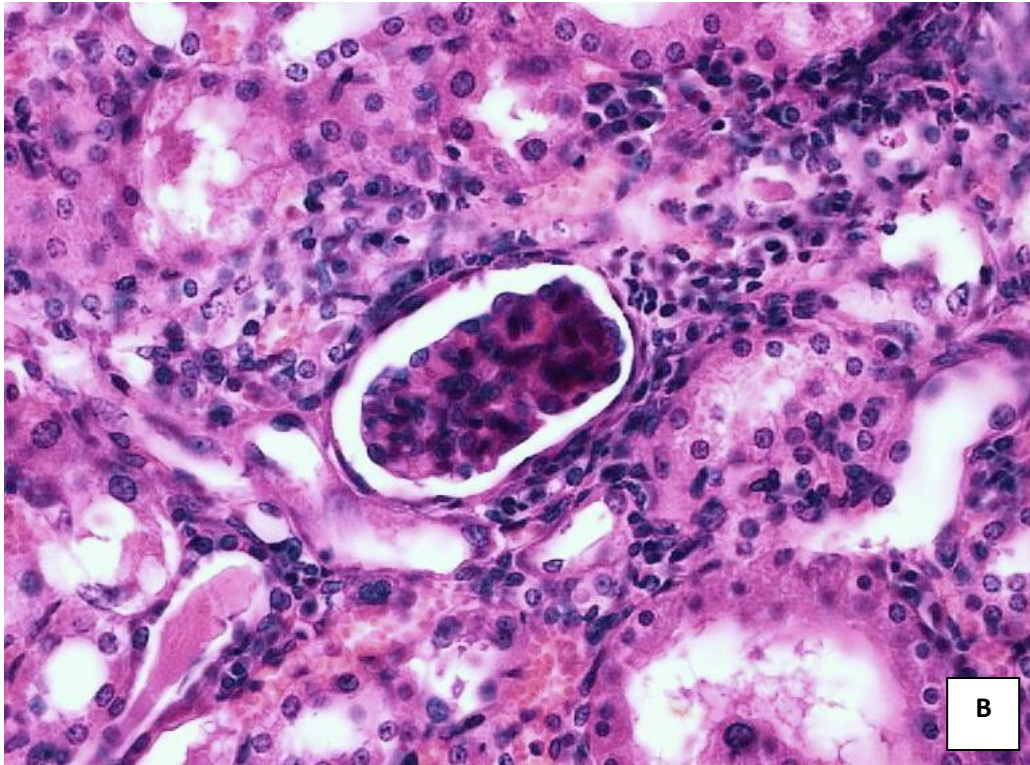
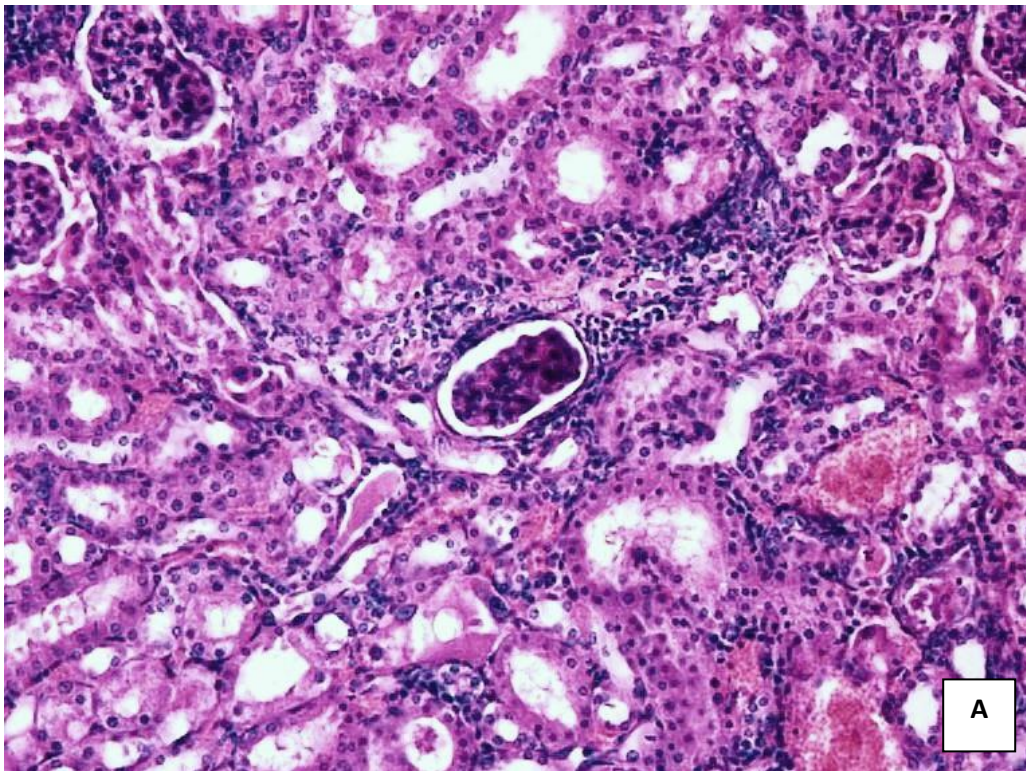


Slika 11. Patohistološki preparat bubrega - *Eksperimentlana grupa 3*

Karakteristične promene koje se javljaju kod svih eksperimentalnih jedinki predstavljaju difuzni intersticijalni nefritis. U kori bubrega se difuzno uočavaju kolabirani nefroni koji su okruženi sa infiltratom od limfocita i plazmocita (slike 12 i 13).

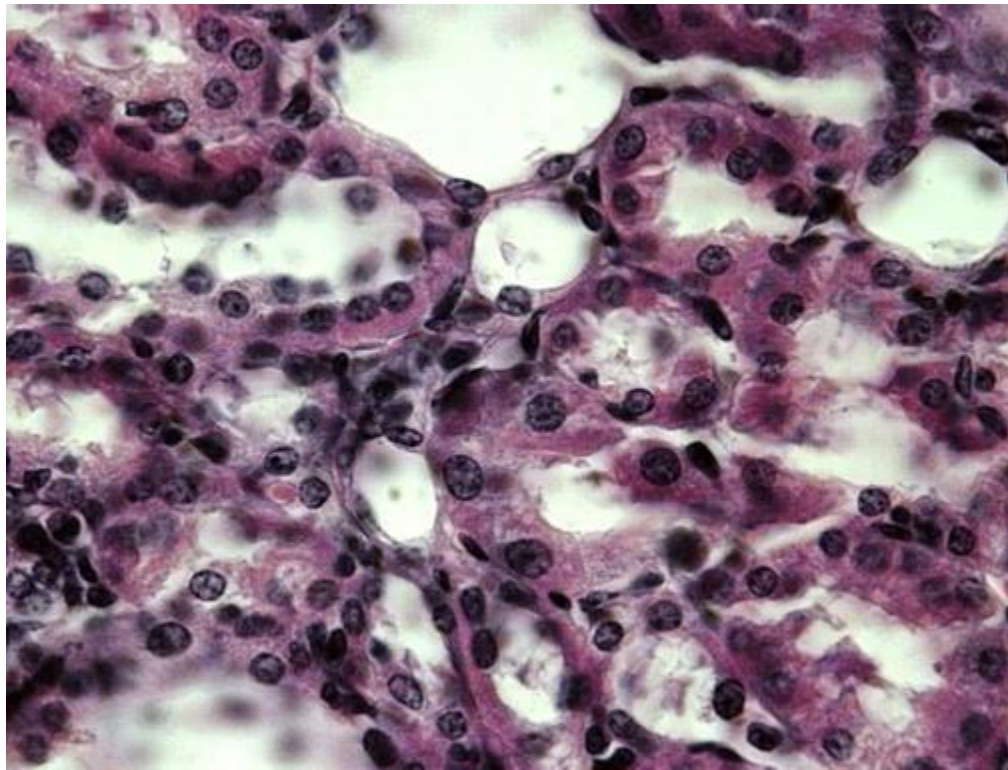


Slika 12. Limfocitni i plazmocitni infiltrat u kori bubrega, H&E; 100x (A), 200x (B)

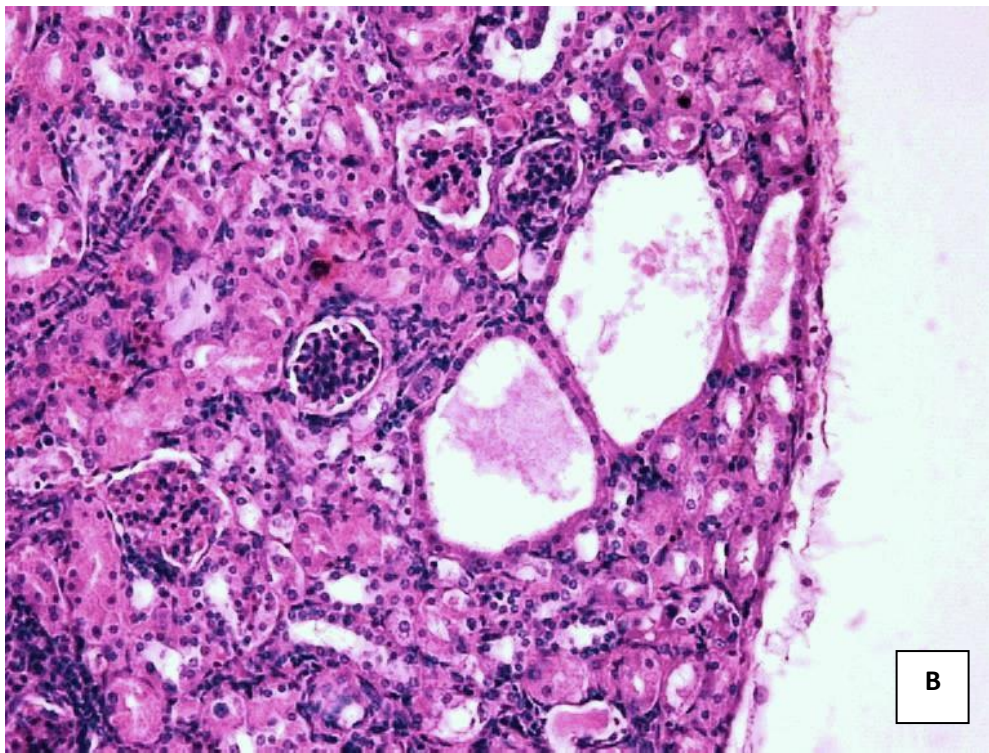
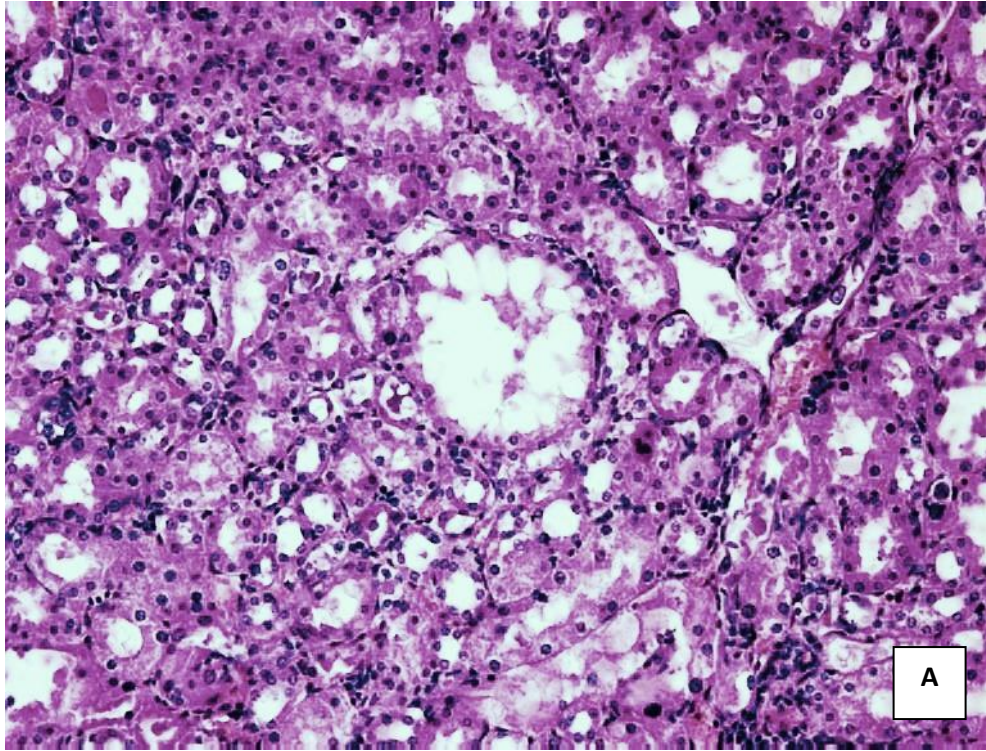


Slika 13. Kolabirani glomerul okružen zapaljenskim infiltratom, H&E; 200x (A), 400x (B)

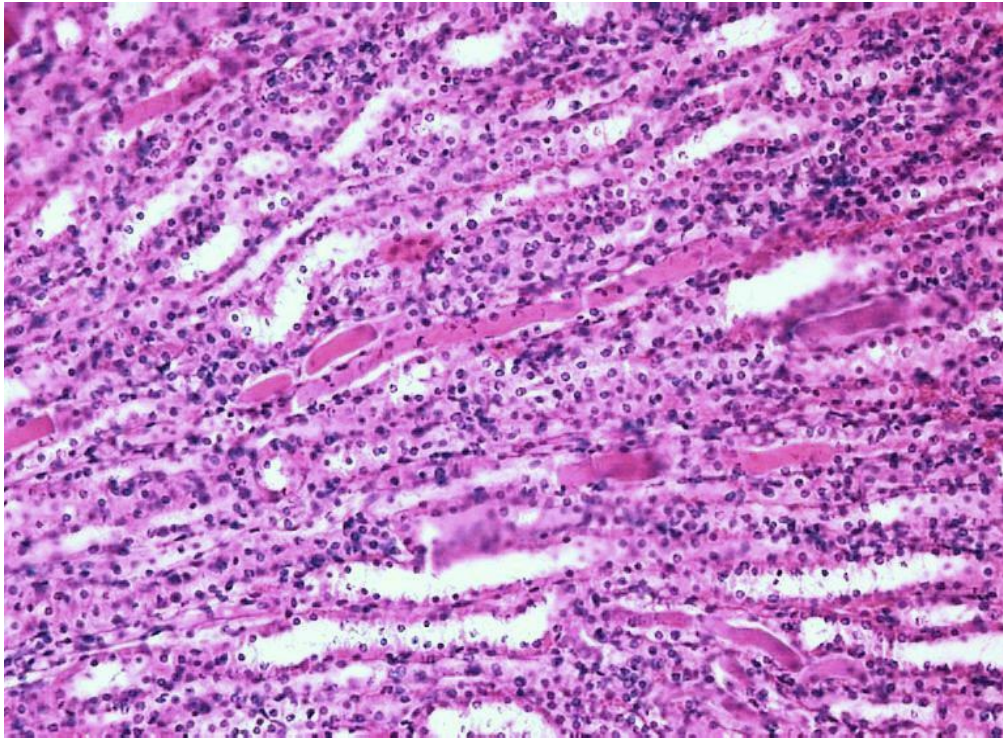
Proksimalni i distalni tubuli su parenhimatozno degenerisani (slika 14), pojedini cistično prošireni (slika 15) dok su mnogi sabirni kanalići ispunjeni hijalinim cilindrima (slika 16).



Slika 14. *Parenhimatozno degenerisani tubuli, H&E; 630x*



Slika 15. *Cistično degenerisani tubuli okruženi intersticijalnim zapaljenskim infiltratom, H&E; 200x (A), 200x (B)*



Slika 16. Sabirni kanalići ispunjeni hijalinim cilindrima H&E; 200x

Analizom patohistoloških preparata došlo se do sledećih rezultata:

Tabela 3. *Prikaz rezultata patohistoloških lezija tubulointersticijuma u ispitnim grupama*

	Eksperimentalna Grupa 1 (1% infuz)	Eksperimentalna Grupa 2 (2% infuz)	Eksperimentalna Grupa 4 (4% infuz)
Tubulska nekroza	2/35- 5,7%	0/7- 0%	28/28- 100%
Cilindri u tubulima	9/35- 25,7%	2/7- 28,5%	28/28- 100%
Fokusi inflamacije	31/35- 88,5%	7/7- 100%	28/28- 100%

Brojevi u tabelama predstavljaju broj pronađenih promena/ broj pregledanih preparata bubrega

Dominantna patohistološka promena je degeneracija i nekroza nefrocita proksimalnih tubula, dozno zavisna.

U grupi sa 1 i 2 % infuzom, promene su diskretne, morfološka arhitektonika bubrega je očuvana, a patološke promene su retke i zahvataju ispod 10% tubula. Nađe se hidropsna promena u pojedinim tubulima kao i **parenhimatozna degeneracija** mnogih proksimalnih tubula, naročito na kortikomedularnoj granici, gde se zapažaju i brojni nefrociti krupnih hiperhromnih jedara. Citoplazma nefrocita u ovim regijama je nabubrela, ispunjena acidofilnim zrnima, tako da je lumen tubula pukotinast. Kao reverzibilna promena parenhimatozna degeneracija nije kvantifikovana. **Nekroza nefrocita** nađena je u grupi sa 1% jako retko, u 5,7% slučajeva i to da zahvata manje od 10% tubula. Nekrotični nefrociti identifikovani su kao acidofilne citoplazmatske mase bez jedara. U grupi 2% nije registrovana nekroza. Retko se pojavljuju i pseudocistične formacije, delom obložene epitelom tubula, delom bez epitela koji je nekrotičan i deskvamovan.

Pojava **cilindara** u tubulima kao jasan morfološki kriterijum nađena je u grupi 1% u 25,7% eksperimentalnih životinja, a u grupi 2% u 28,5%, što nema statističke značajnosti. Intenzitet ove promene je kod svih životinja ispod 10% tubula.

U trećoj eksperimentalnoj grupi koja je primala 4% infuz, **tubulska nekroza** nalazi se kod svih životinja, 100%, a njen intenzitet je u svakom vidnom polju korteksa od 10-50% tubula. U preparatima ove grupe dominira tubulska nekroza, koja se vidi kao pretvaranje nefrocita u zrnastu acidofilnu masu bez jedara, sa disorganizacijom ili potpunim odsustvom ćelija. Vidi se i raširena hidropsna degeneracija, deskvamacija nefrocita u lumen tubula, ogoljene bazalne membrane tubula i granulirani i hijalini cilindri. Brojni tubuli bez epitela su prošireni, rupturiranog zida i sliveni u vidu nepravilnih šupljina.

Morfološki, **glomeruli** izgledaju očuvani, ali se vidi smanjenje broja usled ruptore tubula, kada nestaju i pripadajući glomeruli.

Cilindri, granulirani i hijalini i leukocitni, nalaze se kod svih životinja ispitne grupe 3, a intenzitet promene kreće se od 10-30% tubula, srednja vrednost 13,75% zahvaćenih tubula.

Fokusi inflamacije postoje kod sve tri grupe, od 88,5 do 100% i nisu statistički značajan kriterijum za ocenu patoloških promena. Broj fokusa po grupama:

Grupa 1: 77/35, tj. srednja vrednost 2,2 a broj fokusa po životinji 0-9

Grupa 2: 26/7, srednja vrednost 3,7 a broj fokusa po životinji 1-8

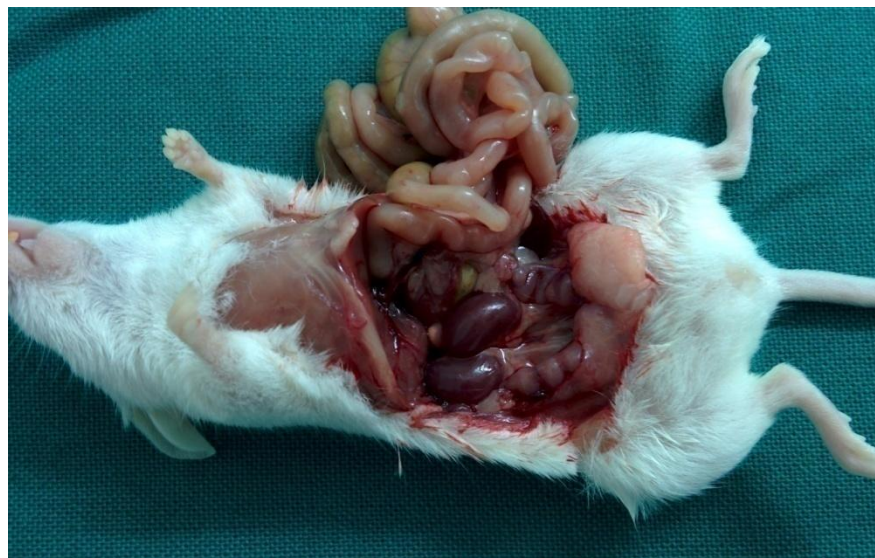
Grupa 3: 27/8, srednja vrednost 3,4 a broj fokusa po životinji 1-7

U eksperimentanoj grupi 3, srednja vrednost broja inflamatornih fokusa je čak niža nego u grupi 2, što se može tumačiti toksičnim efektom aristolohije na leukocite i imuni odgovor.

Dakle, tubulska nekroza je dominantna patološka promena izazvana infuzumom aristolohije i to dozno zavisna, u grupama sa 1 i 2% infuzom nekroze su fokalne, retke, manje od 10% tubula, a u grupi 4% infuzom nekroze su difuzne, kod 100% životinja i zahvataju 10-50% tubula.

Nije se ustanovilo postojanje karcinoma bubrega niti u jednom preparatu.

5.1.2 Makroskopski pregled nakon autopsije eksperimentalnih životinja



Slika 17. Makroskopski izgled bubrega kod kontrolne grupe



Slika 18. *Sitno zrnasta promena na donjem polu levog bubrega eksperimentalne grupe 3*

Kod jedne jedinice iz treće ispitne grupe, ustanovljene su makroskopske promene na donjem polu bubrega u vidu sitnozrnastog žućkastog i jače krvnog područja samog parenhima bubrega, koji se uočava ispod tanke, prozirne kapsule, ali koja je na mestu promene prirasla za parenhim bubrega (slika 18). Kod ostalih eksperimentalnih jedinki nisu uočene makroskopske promene bubrega.

5.1.3 Rezultati merenja diureze

Odnos između količine urina Eksperimentalne grupe 2, Eksperimentalne grupe 3 i kontrolne grupe je prikazan u Tabeli 4 i Grafikonu 1.

Tabela 4. *Dvadesetčetvoročasovna diureza Eksperimentalne grupe 1, Eksperimentalne grupe 2, Eksperimentalne grupe 3 i kontrolne grupe– mereno u toku sedam nedelja*

	Prva nedelja	Druga nedelja	Treća nedelja	Četvrta nedelja	Peta nedelja	Šesta nedelja	Sedma nedelja
Mušjaci tretirani sa vučjom stopom 40g/1000ml	61,2 ml	30 ml	33 ml	18 ml	13,5 ml	14,4 ml	14,4 ml
Ženke tretirane sa vučjom stopom 20g/1000ml	29,2 ml	63 ml	15 ml	10,5 ml	13,2 ml	13,8 ml	13,8 ml
Mušjaci tretirani sa vučjom stopom 10g/1000ml	18,2 ml	20 ml	17 ml	17,7 ml	16 ml	17 ml	16,8 ml
Kontrolna grupa (ženke)	16 ml	15 ml	18 ml	16 ml	18 ml	18,6 ml	18,6 ml

U tablici su navedene prosečne vrednosti diureze za 7 dana, u toku 7 nedelja praćenja.

U grupi 3 je primećen navedeni skok diureze u prvoj nedelji (61,2 ml), da bi se diureza prepolovila u odnosu na navedenu vrednost i ostala takva tokom druge i treće nedelje praćenja. Tokom četvrte nedelje praćenja dolazi do pada diureze na 18 ml. Tokom poslednje 3 nedelje diureza se kreće od 13,5 do 14,4 ml.

U grupi 2 je diureza u prvoj nedelji bila 29,2 ml, što je druga najveća vrednost za prvu nedelju, da bi u drugoj nedelji došlo do skoka diureze na (63 ml), što je najveće povećanje diureze u celom eksperimentu. Posle toga dolazi do pada diureze u trećoj nedelji na 15 ml, i potom diureza ostaje stabilna narednih 4 nedelje sa vrednostima od 10,5 do 13,8 ml. Vrednost od

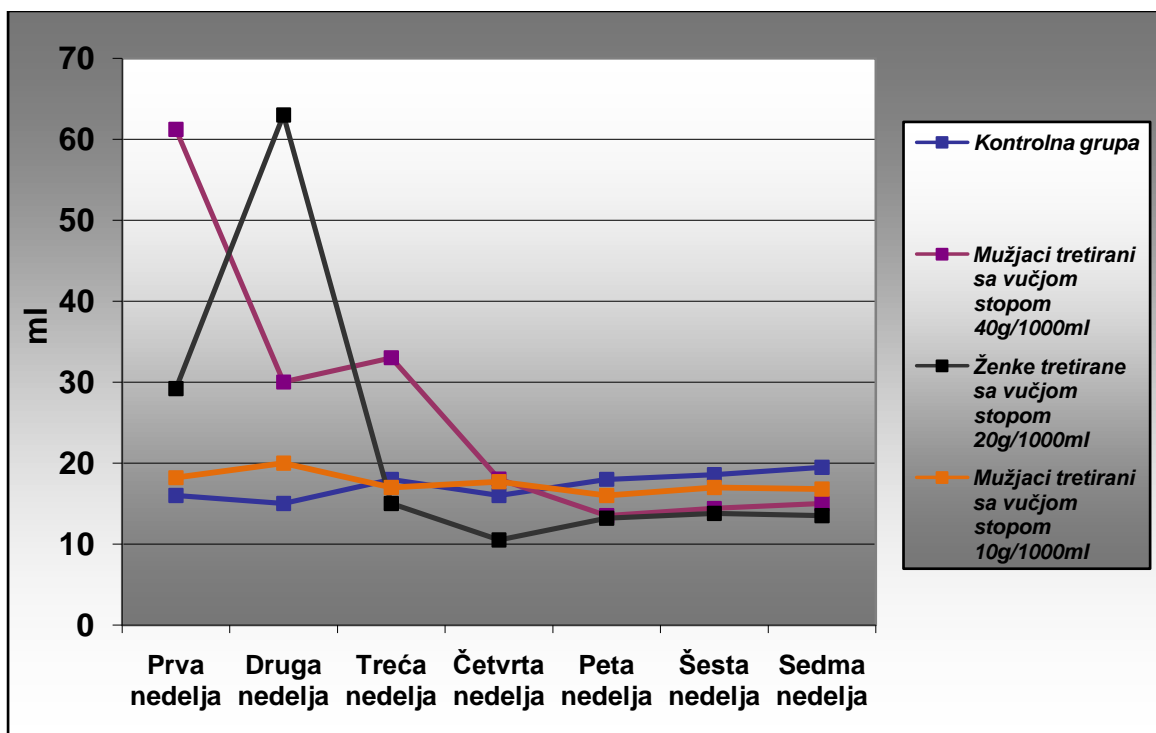
13,8 ml je najniža vrednost diureze na kraju eksperimenta posmatrajući sve grupe. Vrednost diureze od 10,5 ml u četvrtoj nedelji eksperimenta je najniža vrednost diureze u okviru celog eksperimenta.

U grupi 1 je diureza u prvoj nedelji bila 18,2 ml, a u poslednjoj nedelji 16,8 ml. Nije bilo ozbilnijih oscilacija u diurezi ove ispitne grupe tokom 7 nedelja praćenja.

U kontrolnoj grupi je diureza u prvoj nedelji bila 16 ml, a u poslednjoj nedelji 18,6 ml. Nije bilo ozbilnijih oscilacija u diurezi ove ispitne grupe tokom 7 nedelja praćenja.

Primećeno je da je u prvoj nedelji sakupljanja diureze grupa 3 koja je primala 40g/1000 ml, tj najaču dozu, imala znatno veću diurezu (61,2 ml) u prvoj nedelji u odnosu na ostale grupe. Druga ispitna grupa je imala imala skok diureze u drugoj nedelji (63 ml), što je bila barem za dvostruko veća diureza u odnosu na ostale grupe. Na kraju eksperimenta grupe 2 i 3 imale su najniže vrednosti diureze.

Na grafikonu ispod se bolje prate navedeni rezultati.



Grafikon 1. Dvadesetčetvoročasovna diureza Eksperimentalne grupe 1, Eksperimentalne grupe 2, Eksperimentalne grupe 3 i kontrolne grupe

5.1.4 Rezultati merenja biohemijskih parametara krvi

Tabela 5. Biohemijske analize krvi – kontrolna grupa

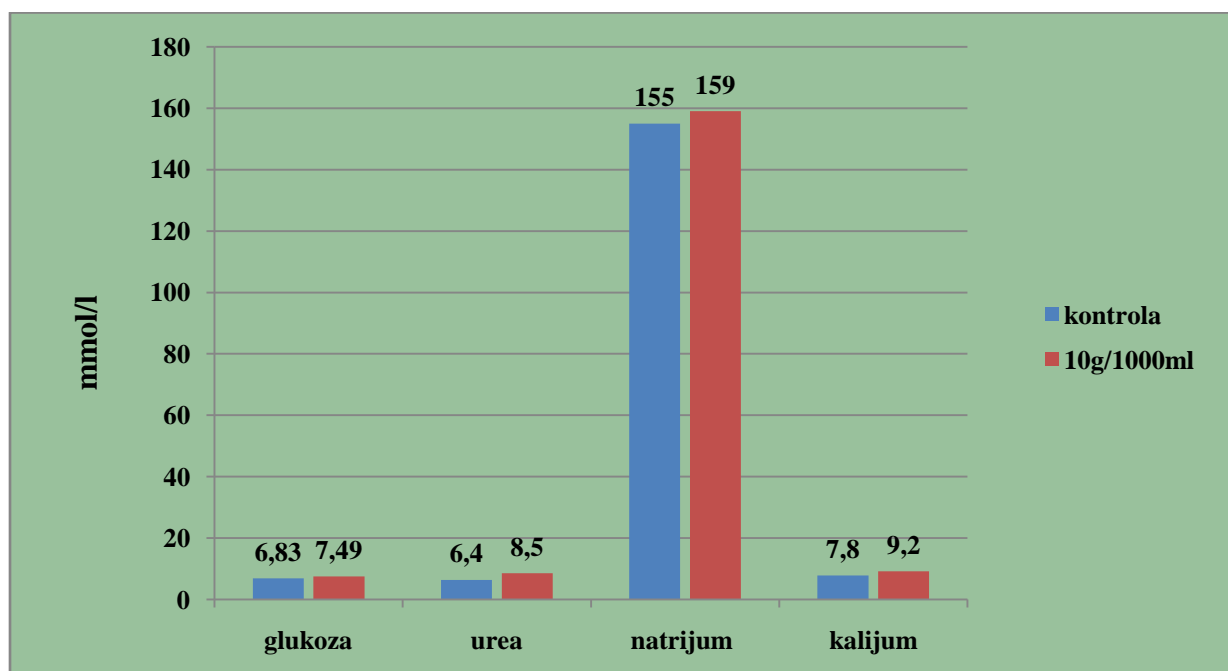
Glukoza	6,83 mmol/l
Urea	6,4 mmol/l
Kreatinin	28 μmol/l
Ac. uricum	401 μmol/l
Uk. bilirubin	1 μmol/l
D. bilirubin	0,9 μmol/l
T. proteini	55 g/l
Natrijum	155 mmol/l
Kalijum	7,8 mmol/l

Laboratorijski nalazi biohemijskih parametara kontrolne grupe su služile kao reper za upoređivanja sa vrednostima istih laboratorijskih parametara ispitinih grupa.

Tabela 6. Biohemijske analize krvi - Eksperimentalna grupa 1 (10g/1000 ml)

Glukoza	7,49 mmol/l
Urea	8,5 mmol/l
Kreatinin	32 μmol/l
Ac. uricum	404 μmol/l
Uk. bilirubin	0 μmol/l
D. bilirubin	0,8 μmol/l
T. proteini	63 g/l
Natrijum	159 mmol/l
Kalijum	9,2 mmol/l

Ako uporedimo vrednosti prve ispitne grupe sa vrednostima kontrolne grupe vidimo da postoji povećanje vrednosti glukoze za 0,66 mmol/l, uree za 2,1 mmol/l, kreatinina 4 μ mol/l, acidum uricum veći za 3 μ mol/l, ukupni proteini veći za 8 g/l, natrijum veći za 4 mmol/l, kalijum veći za 1,4 mmol/l. Jedino je ukupni bilirubin je bio nemerljiv, direktni bilirubin manji za 0,1 μ mol/l,



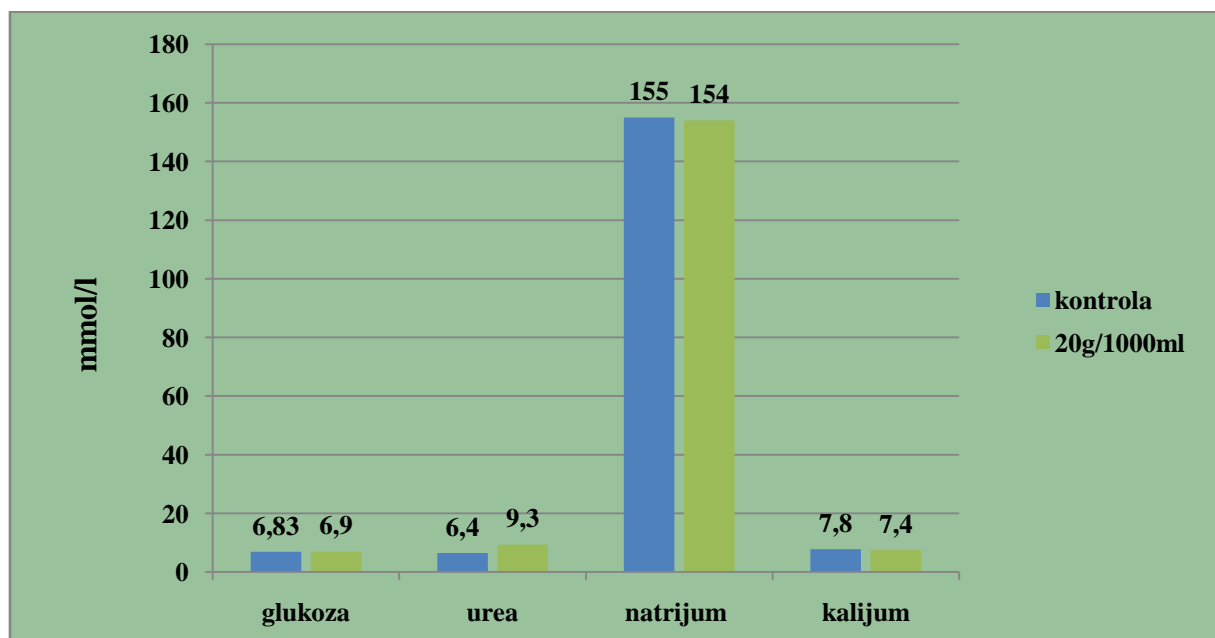
Grafikon 2. Grafički prikaz upoređivanja laboratorijskih vrednosti glukoze, uree, natrijuma i kalijuma prve ispitne grupe i kontrolne grupe

Ako izuzmemo bilirubine, svi ostali laboratorijski parametri su povećani. Ukupni proteini su najviše povećani, tj veći za 8 g/l.

Tabela 7. Biohemijske analize krvi - Eksperimentalna grupa 2 (20g/1000 ml)

Glukoza	6,90 mmol/l
Urea	9,3 mmol/l
Kreatinin	30 μmol/l
Ac. uricum	321 μmol/l
Uk. bilirubin	0 μmol/l
D. bilirubin	0,8 μmol/l
T. proteini	63 g/l
Natrijum	154 mmol/l
Kalijum	7,4 mmol/l

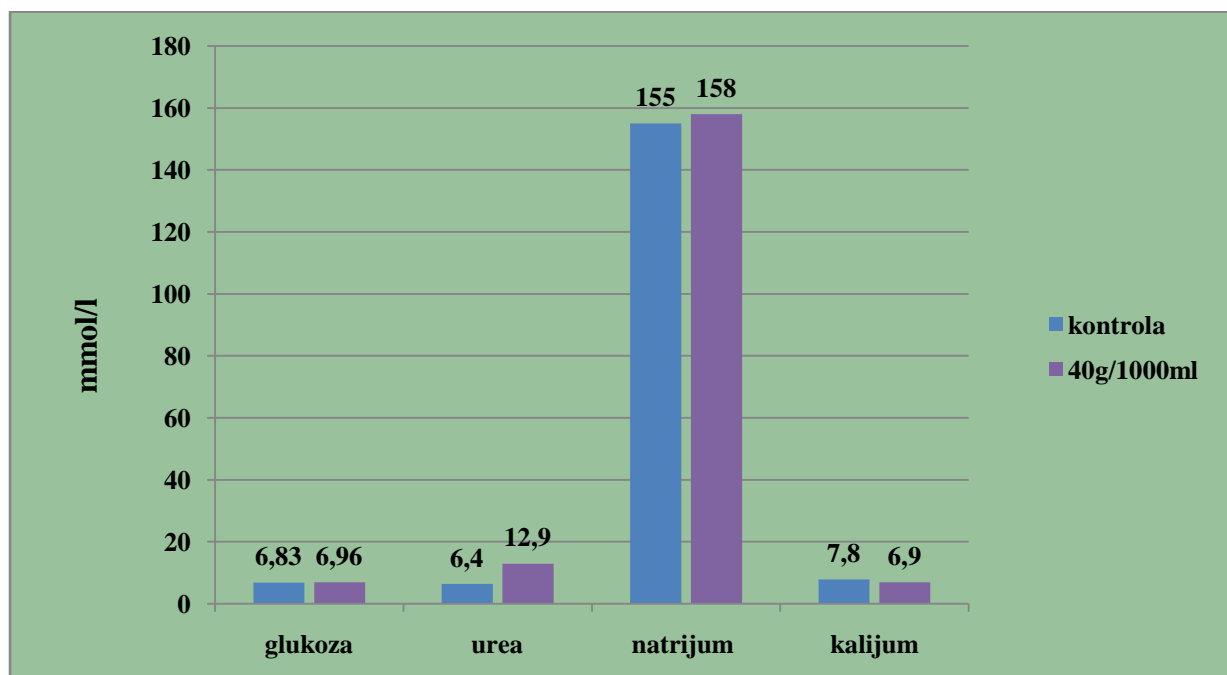
Ako uporedimo vrednosti druge ispitne grupe sa vrednostima kontrolne grupe vidimo da postoji povećanje vrednosti glukoze za 0,07 mmol/l, uree za 2,9 mmol/l, kreatinina 2 μ mol/l, ukupni proteini veći za 8 g/l, natrijum veći za 1 mmol/l. Manje vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu su primećene za acidum uricum za 80 μ mol/l, kalijum za 0,4 mmol/l i direktni bilirubin manji za 0,1 μ mol/l. Jedino je ukupni bilirubin je bio nemerljiv.



Grafikon 3. Grafički prikaz upoređivanja laboratorijskih vrednosti glukoze, uree, natrijuma i kalijuma druge ispitne grupe i kontrolne grupe

Tabela 8. Biohemijske analize krvi - Eksperimentalna grupa 3 (40g/1000 ml)

Glukoza	6,96 mmol/l
Urea	12,9 mmol/l
Kreatinin	35 μ mol/l
Ac. uricum	191 μ mol/l
Uk. bilirubin	1 μ mol/l
D. bilirubin	0,3 μ mol/l
T. proteini	56 g/l
Natrijum	158 mmol/l
Kalijum	6,9 mmol/l



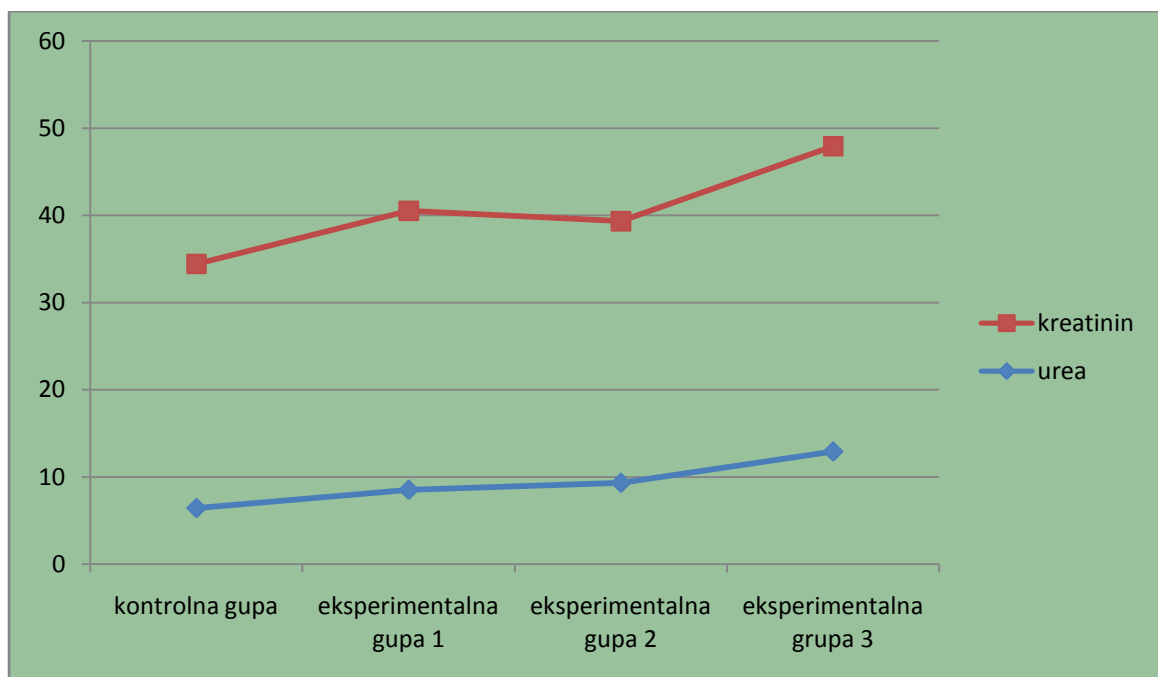
Grafikon 4. Grafički prikaz upoređivanja laboratorijskih vrednosti glukoze, uree, natrijuma i kalijuma treće ispitne grupe i kontrolne grupe

Ako uporedimo vrednosti treće ispitne grupe sa vrednostima kontrolne grupe vidimo da postoji povećanje vrednosti glukoze za 0,13 mmol/l, uree za 6,5 mmol/l, kreatinina 7 μ mol/l,

ukupni proteini veći za 1 g/l, natrijum veći za 3 mmol/l. Manje vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu su primećene za acidum uricum za 210 μ mol/l, kalijum za 0,9 mmol/l i direktni bilirubin manji za 0,6 μ mol/l. Jedino je ukupni bilirubin bio isti u obe grupe. U trećoj eksperimentanoj grupi je primećen značajni pad mokraćne kiseline.

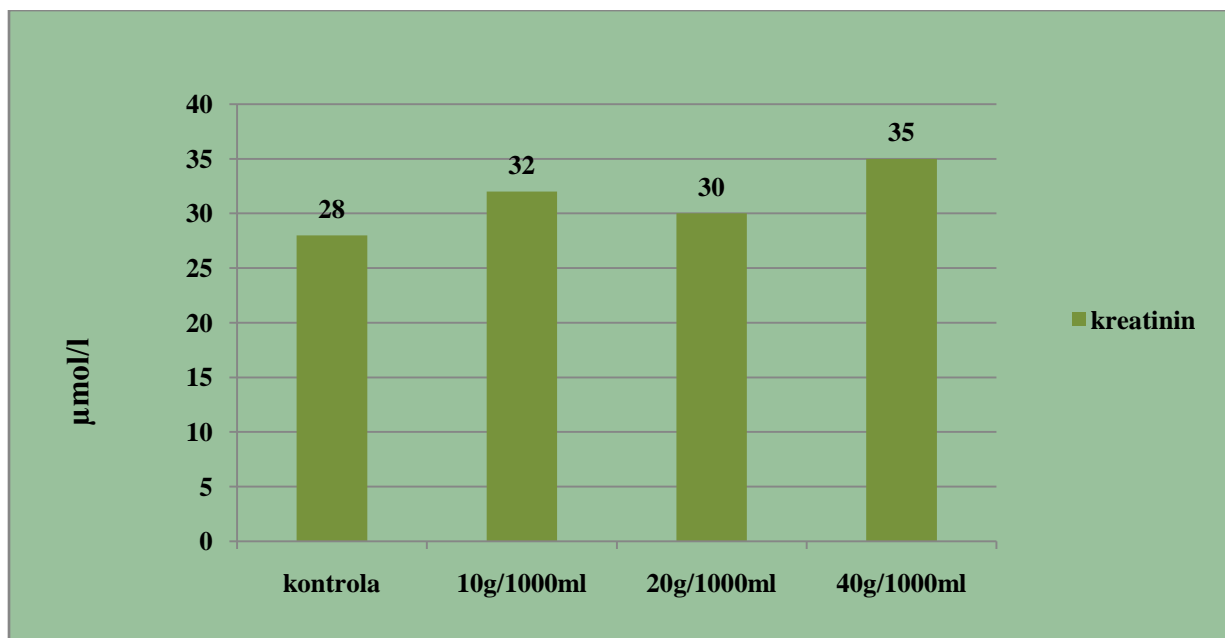
Ako posmatramo vrednosti **glukoze** u svim grupama, vidi se samo porast u prvoj ispitnoj grupi, gde je vrednost 7,49 mmol/l bila najveća i za 0,66 veća od vrednosti glukoze u kontrolnoj grupi, dok se ostale 3 vrednosti (kontrolna, druga i treća ispitna grupa) ujednačene i nalaze u opsegu od 0,13.

Kada se prati vrednost **uree** u svim grupama, vidi se konstatni porast vrednosti uree od kontrolne do 3 ispitne grupe (6,4, 8,5, 9,3, 12,9 mmol/l). Porast je bio dvostuko veći ako poredimo kontrolnu grupu sa 3 eksperimentalnom grupom.



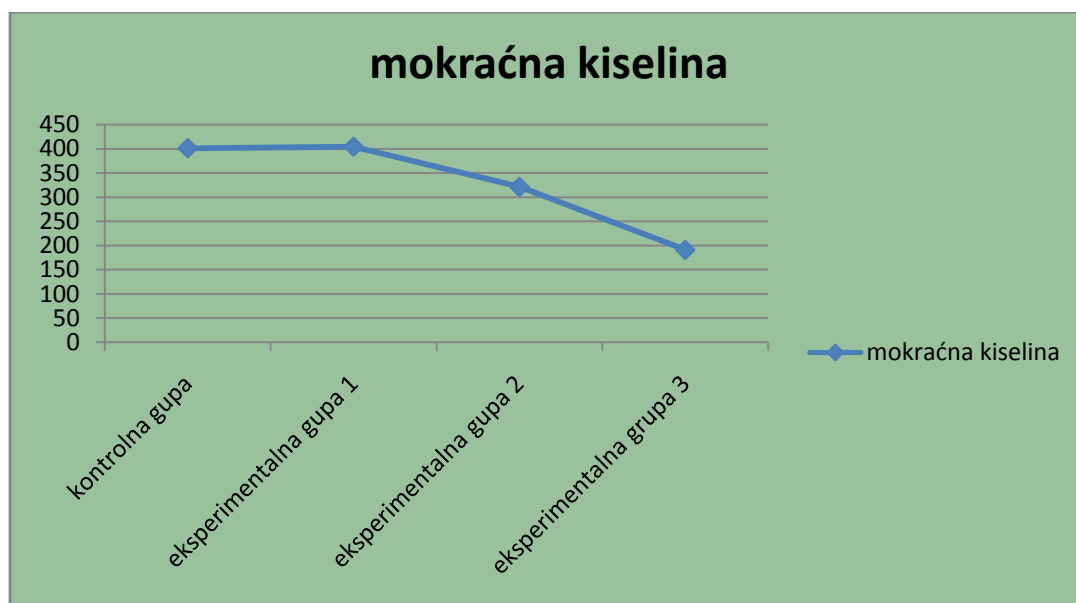
Grafikon 5. Grafički prikaz pokazuje kretanje vrednosti uree i kreatinina u svim grupama

Ako posmatramo vrednosti **kreatinina** u svim grupama, vidi se porast vrednosti kreatinina od kontrolne do 3 ispitne grupe (28,32,30,35 mmol/l). Porast je bio za 7, ako posmatramo razliku grupe koja je primala najaču dozu i kontrolne grupe (Grafikon 5 i 6).



Grafikon 6. Prikaz vrednosti kreatinina u svim grupama

Vrednost **mokraćne kiseline** se opet smanjivala konstantno, u kontrolnoj grupi je vrednost 401 µmol/l, potom 404, 321, i 191 µmol/l u 1,2 i 3 ispitnoj grupi, retrospektivno. Vrednost mokraćne kiseline u ispitnoj grupi 3 je opala za više od dvostruko u odnosu na kontrolnu grupu.



Grafikon 7. Prikaz pada vrednosti mokraćne kiseline u svim grupama

Vrednosti **ukupnih bilirubina** su bile ili 1 $\mu\text{mol/l}$ ili nemerljive.

Vrednost **direktnih bilirubina** se smanjvala od 0,9 $\mu\text{mol/l}$ u kontrolnoj grupi, da bi prva i druga ispitna grupa imali vrednost 0,8 $\mu\text{mol/l}$, a treća ispitna grupa 0,3 $\mu\text{mol/l}$.

Ako posmatramo vrednosti **proteina** u svim grupama, možemo reći da je vrednost proteina bila veća u prvoj (63g/l) i drugoj (63g/l) ispitnoj grupi. Dok je vrednost proteina kontrolne i 3 eksperimentalne grupe bila slična.

Vrednosti **natrijuma** su bile dosta izjednačene u svim grupama, kontrolna 155 mmol/l, prva 159 mmol/l, druga 154 mmol/l i treća eksperimentalna grupa 158 mmol/l.

Vrednosti **kalijuma** su pokazivale značajne oscilacije, tako da je u prvoj grupi vrednost kalijuma bila najveća 9,2 mmol/l, da bi u drugoj bila 7,4 mmol/l. U trećoj eksperimentalnoj grupi je vrednost bila 6,9 mmol/l što je manje od vrednosti kalijuma u kontrolnoj grupi.

5.1.4 Rezultati merenja kompletne krvne slike (KKS)

Tabela 9. Analiza KKS - Kontrolna grupa

RBC ($10^{12}/l$)	6,75
HCT (%)	31,8
Hgb (g/l)	104
MCV (fl)	47,2
MCH (pg)	15,4
MCHC (g/l)	326
WBC ($\times 10^9/l$)	7,4
NE (%)	29,5
LY (%)	65,1
MO (%)	3,6
EO(%)	1,2
BA (%)	0,6
PLT($\times 10^9/l$)	698

Tabela 10. Analiza KKS - Eksperimentalna grupa 1 (10g/1000ml)

RBC ($10^{12}/l$)	6,36
HCT (%)	32,3
Hgb (g/l)	108
MCV (fl)	50,9
MCH (pg)	17
MCHC (g/l)	334
WBC ($\times 10^9/l$)	4,8
NE (%)	7,6
LY (%)	87,9
MO (%)	0,4
EO(%)	4,1
BA (%)	0
PLT($\times 10^9/l$)	597

Tabela 11. Analiza KKS - Eksperimentalna grupa 2 (20g/1000ml)

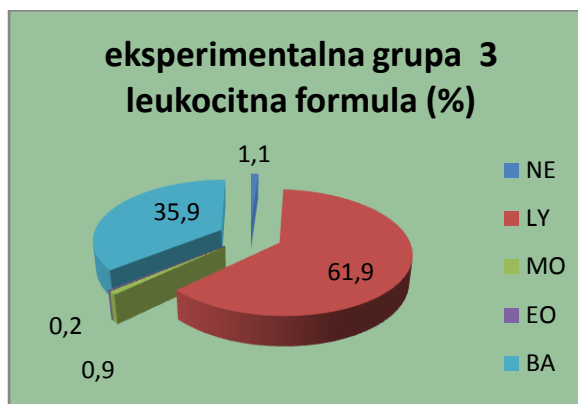
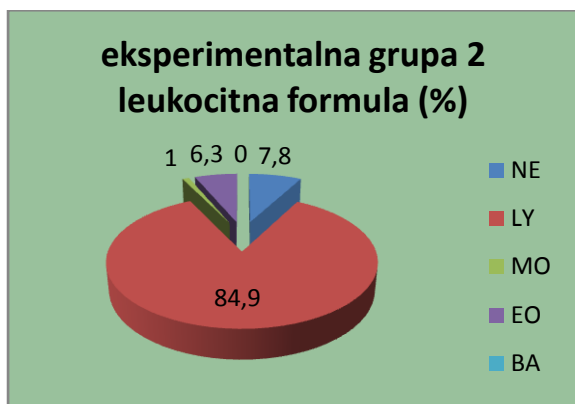
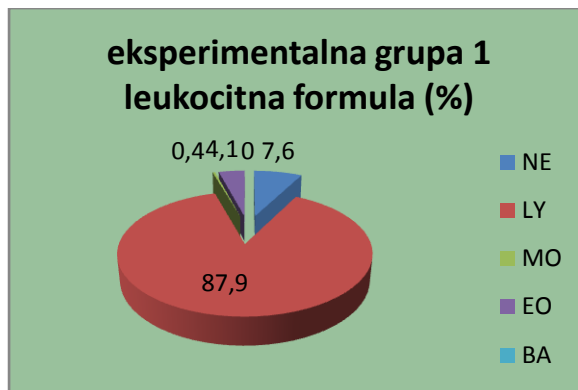
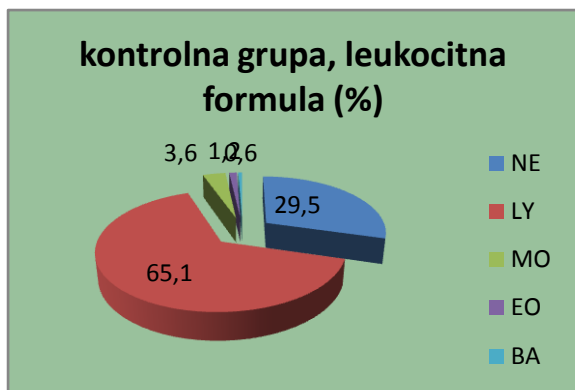
RBC ($10^{12}/l$)	7,58
HCT (%)	40,1
Hgb (g/l)	128
MCV (fl)	53
MCH (pg)	16,8
MCHC (g/l)	318
WBC ($\times 10^9/l$)	7,1
NE (%)	7,8
LY (%)	84,9
MO (%)	1
EO(%)	6,3
BA (%)	0
PLT($\times 10^9/l$)	323

Tabela 12. Analiza KKS - Eksperimentalna grupa 3 (40g/1000ml)

RBC ($10^{12}/l$)	7,73
HCT (%)	38,5
Hgb (g/l)	127
MCV (fl)	49,8
MCH (pg)	16,4
MCHC (g/l)	330
WBC ($\times 10^9/l$)	12,2
NE (%)	1,1
LY (%)	61,9
MO (%)	0,9
EO(%)	0,2
BA (%)	35,9
PLT($\times 10^9/l$)	652

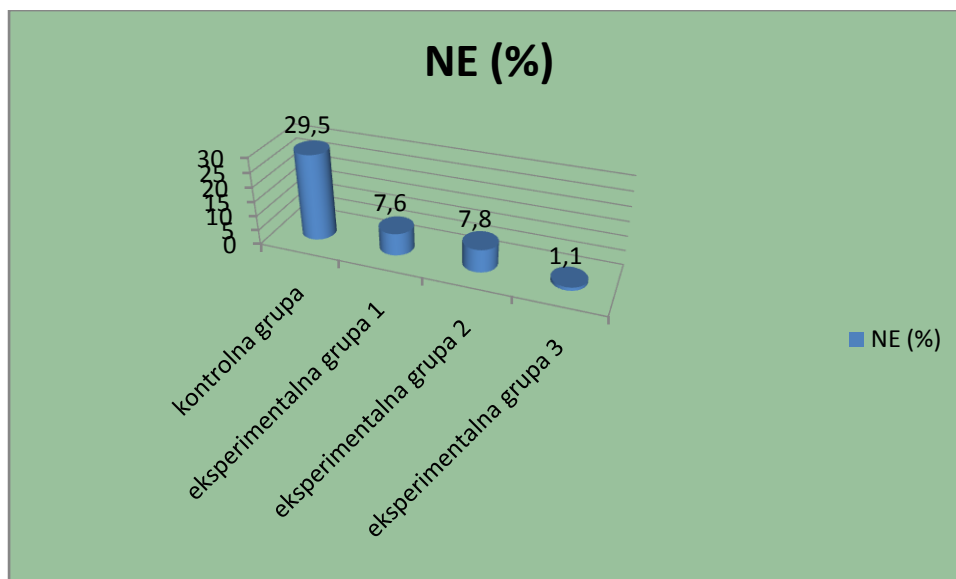
Ako posmatramo **crvenu krvnu lozu** u osnovnim parametrima u svim grupama, možemo reći da je došlo do blagog povećanja broja eritrocita, kako je doza rasla. Navedeni porast je praćen povećanjem hematokrita i hemoglobina, od kontrolne grupe prema trećoj ekperimentanoj grupi. Porast RBC i Hgb je bio konstantan, dok je vrednost Hct rasla ali oscilirala. Nisu primećene značajnije oscilacije u vrednostima prosečne zapremine eritrocita (MCV), srednjeg sadržaja hemoglobina u eritocitu (MCH) i srednje koncentracije hemoglobina u eritrocitima (MCHC), u svim grupama.

Ako posmatramo **belu krvnu lozu**, apsolutni broj leukocita WBC je bio značajno veći u trećoj ispitnoj grupi u odnosu na ostale. U leukocitarnoj formuli se primećuje značajan pad neutrofilnih granulocita (NE), već u prvoj i drugoj eksperimentalnoj grupi, da bi u trećoj bio izrazito nizak 1,1 %. Broj limfocita (LY) raste u prvoj i drugoj ispitnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu, da bi u trećoj ispitnoj grupi broj LY bio manji u odnosu na kontrolnu. Broj monocita (MO) je manji u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu grupu trostruko i možemo reći da je konstantan. Eozinofilni granulociti (EO) su veći u prvoj i drugoj eksperimentalnoj grupi dok su u trećoj manji u odnosu na kontrolnu grupu. Bazofilni granulociti su bili nemerljivi u prvoj i drugoj eksperimentalnoj grupi, dok nastupa značajni porast u trećoj eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu.



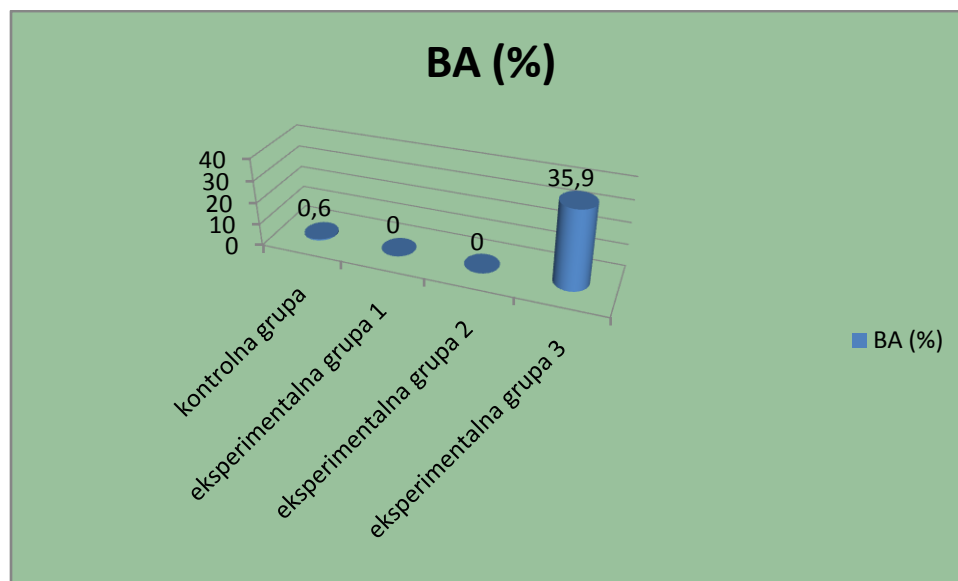
Grafikon 8. Prikaz relativnih vrednosti NE,LY,MO,EO,BA u svim grupama na posebnim grafikonima

Kao važan rezultat se nameće se nagli pad vrednosti neutrofilnih granulocita na kraju eksperimenta u svim ispitnim grupama u odnosu na kontrolnu, pogotovu u grupi koja je primala najveću dozu (Grafikon 8 i 9).



Grafikon 9. Pokazuje značajni pad neutrofilnih granulocita u ispitnim grupama

Takođe je primećen nagli porast bazofilnih granulocita u eksperimentalnoj grupi 3



Grafikon 10. Prikaz porasta BA u trećoj eksperimentalnoj grupi

Vrednost trombocita (PLT) je jedino bila značajno manja u drugoj eksperimentanoj grupi (323) u odnosu na ostale grupe (kontrolna 698, prva ispitna grupa 597, i trećaispitna grupa 652).

1.5.6 Rezultati kompletnog pregleda urina

Pošto su metabolički kavezi to dozvoljavali, urin je prikupljan redovno i nakon nedelju dana odnošen na pregled, tako da je rađena jedna analiza urina za svaku grupu nedeljno, u trajanju od 7 nedelja. Oznaka / - označava da nije ustavnoljeno postojanje navedene materije, oznaka \pm - da je navedena materija pronađena u minimalnom tragu, oznaka + - da je navedena materija pronađena i potom sledi gradacija što je navedene materije više, recimo ++... Prisutnost ćelija u sedimentu urina je brojno izražavana, ili ako je ćelija bilo više, opisno, na primer malo, dosta, puno ili masa ćelija (gradirajući od manjeg prema većem broju ćelija). Pregled sedimenta je subjektivno zavisio od laboranta, ali je sve nalaze urina pregledao isti laborant.

1.5.6.1 Rezultati kompletnog pregleda urina – prva nedelja

Tabela 13. Kompletan pregled urina (kontrola) - prva nedelja

Boja	žuta
Izgled	slabo zamućen
Nitriti	/
pH	6,0
Specifična težina	1020
Proteini	\pm
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	\pm
Epitelne ćelije	2-3
Eritrociti	3-5
Leukociti	2-3
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 14. Kompletan pregled urina (10g/1000ml) - prva nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamučen
Nitriti	/
pH	6,5
Specifična težina	1020
Proteini	+
Glukoza	/
Aceton	+
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	±
Epitelne ćelije	5-6
Eritrociti	1-2
Leukociti	5-6
Cilindri	/
Kristali	prisutni kristali mokraćne kiseline
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 15. Kompletan pregled urina (20g/1000ml) - prva nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamučen
Nitriti	/
pH	6,0
Specifična težina	1025
Proteini	+
Glukoza	/
Aceton	+
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	4-5
Eritrociti	1-2
Leukociti	4-5
Cilindri	/
Kristali	prisutni kristali mokraćne kiseline
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 16. Kompletan pregled urina (40g/1000ml) - prva nedelja

Boja	žuta
Izgled	mutan
Nitriti	+
pH	6,5
Specifična težina	1025
Proteini	+
Glukoza	/
Aceton	+
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	4-6
Eritrociti	4-6
Leukociti	dosta
Cilindri	1-2 hijalini
Kristali	/
Sediment urina	masa bakterija

Ako želimo da uporedimo rezultate **urina u prvoj nedelji**, možemo reći da je **boja** urina uvek bila žuta. **Izgled** urina kontrolne grupe je bio slabo замуćen, da bi u prvoj i drugoj ispitnoj grupi bio замуćen, da bi u trećoj ispitnoj grupi bio mutan. **Nitrita** nije bilo u kontrolnoj, prvoj i drugoj ispitnoj grupi da bi postojali (+) u trećoj ispitnoj grupi. **pH** urina se u svim grupama kretao od 6,0-6,5. **Specifična težina** je u kontrolnoj i prvoj ispitnoj grupi bila 1020, dok je u drugoj i trećoj ispitnoj grupi bila 1025. **Proteini** su pronađeni samo u tragu u kontrolnoj grupi, dok su u svim ispitnim grupama postojali kao (+). **Glukoza** nije ustanovljena niti u jednoj ispitnoj grupi. **Aceton** nije postojao u kontrolnoj grupi, dok je u svim ispitnim grupama postojao kao (+). **Urobilinogen** je ocenjen kao normalan. **Bilirubin** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Hemoglobin** (HGB) je bio samo pronađen u tragu(±) u kontrolnoj i prvoj eksperimentalnoj grupi, u ostalim grupama nije bilo hemoglobina. **Epitelnih ćelija** je u kontrolnoj grupi bilo 2-3, ali ih je u ispitnim grupama bilo više, u prvoj eksperimentalnoj grupi 5-6, u drugoj 4-5 i u trećoj 4-6. **Eritrocita** je u kontrolnoj grupi bilo 3-5, u prvoj i drugoj ispitnoj grupi 1-2, a u trećoj ispitnoj grupi 4-6. **Leukocita** je u kontrolnoj grupi bilo 2-3, u prvoj ispitnoj grupi 5-6, drugoj ispitnoj grupi 4-5, dok je broj leukocita u trećoj ispitnoj grupi ocenjen kao dosta. **Cilindri** nisu ustanovljeni u kontrolnoj i prve 2 ispitne grupe, dok ih je u trećoj eksperimentalnoj grupi bilo 1-2. **Kristali** nisu ustanovljeni u kontrolnoj kao ni u trećoj eksperimentalnoj grupi, dok su u prvoj i

drugoj ispitnoj grupi bili prisutni kristali mokraćne kiseline. U sediment kontrolne, prve i druge ispitne grupe bilo je dosta **bakterija** dok je u trećoj ispitnoj grupi bila masa bakterija.

Ako želimo da naglasimo bitne činjenice u nalazu urina u prvoj nedelji možemo navesti da je treća eksperimentalna grupa koja je primala i najveću dozu imala jedina imala mutan urin, u kojem su postoji nitriti, dosta leukocita i masa bakterija, a takođe je postojao i manji broj cilindara. U svim grupama sem kontrolne postojao je aceton.

1.5.6.2 Rezultati kompletnog pregleda urina – druga nedelja

Tabela 17. Kompletan pregled urina (kontrola) - druga nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,0
Specifična težina	1020
Proteini	±
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	±
Epitelne ćelije	2-3
Eritrociti	3-5
Leukociti	2-3
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 18. Kompletan pregled urina (10g/1000ml) - druga nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,5
Specifična težina	1025
Proteini	+
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	±
Epitelne ćelije	2-3
Eritrociti	1-2
Leukociti	/
Cilindri	/
Kristali	prisutni kristali mokraćne kiseline
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 19. Kompletan pregled urina (20g/1000ml) - druga nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	7,0
Specifična težina	1015
Proteini	±
Glukoza	/
Aceton	+
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	2-3
Eritrociti	3-4
Leukociti	4-6
Cilindri	/
Kristali	dosta kristala fosfata
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 20. Kompletan pregled urina (40g/1000ml) - druga nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	+
pH	6,0
Specifična težina	1030
Proteini	++
Glukoza	++
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	4-5
Eritrociti	3-4
Leukociti	15-20
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	nepregledna masa bakterija

Ako želimo da uporedimo rezultate **urina u drugoj nedelji**, možemo reći da je **boja** urina uvek bila žuta. **Izgled** urina kontrolne grupe je bio zamućen, da bi u svim ispitnim grupama bio lako zamućen. **Nitrita** je ponovo jedino bilo (+) u trećoj ispitnoj grupi. **pH** urina se u svim grupama kretao od 6,0-7,0. **Specifična težina** je u kontrolnoj grupi bila 1020, dok je u prvoj i drugoj bila 1025 odnosno 1015, a u trećoj ispitnoj grupi je ponovo bila najveća, 1030. **Proteini** su pronađeni samo u tragu u kontrolnoj grupi i drugoj ispitnoj grupi, u prvoj ispitnoj grupi (+), a u trećoj ispitnoj grupi (++) . **Glukoza** nije ustanovljena u kontrolnoj kao ni u prve 2 ispitne grupe, da bi u trećoj ispitnoj grupi bila (++) . **Aceton** nije bilo u kontrolnoj, prvoj i trećoj ispitnoj grupi, dok je u drugoj ispitnoj grupi postojao (+). **Urobilinogen** je ocenjen kao normalan. **Bilirubin** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Hemoglobin** (HGB) je bio samo pronađen u tragu(±) u kontrolnoj i prvoj eksperimentalnoj grupi, u ostalim grupama hemoglobina nije bilo. **Epitelnih ćelija** je u kontrolnoj, prvoj i drugoj ispitnoj grupi bilo 2-3, a u trećoj 4-5. **Eritrocita** je u kontrolnoj grupi bilo 3-5, u prvoj 1-2, u drugoj i trećoj ispitnoj grupi 3-4. **Leukocita** je u kontrolnoj grupi bilo 2-3, u prvoj ih nema, drugoj ispitnoj grupi 4-6, dok je broj leukocita u trećoj ispitnoj grupi ocenjen kao 15-20. **Cilindri** nisu ustanovljeni niti u jednoj grupi. **Kristali** nisu

ustanovljeni u kontrolnoj kao ni u trećoj eksperimentalnoj grupi, dok su u prvoj ispitnoj grupi bili prisutni kristali mokraćne kiseline i u drugoj ispitnoj grupi kristali fosfata. U sedimentu kontrolne, prve i druge ispitne grupe bilo je dosta **bakterija** dok je u trećoj ispitnoj grupi bila nepregledna masa bakterija.

Ako želimo da naglasimo bitne činjenice u nalazu urina u drugoj nedelji možemo navesti da je treća eksperimentalna grupa koja je primala i najveću dozu imala jedina imala nitrite (+) i glukozu (++), dok ih u ostalim grupama nije bilo. U trećoj eksperimentalnoj grupi je postojao najveći broj epitelnih ćelija i leukocita. U sedimentu je postojala nepregledna masa bakterija.

1.5.6.3 Rezultati kompletnog pregleda urina – treća nedelja

Tabela 21. Kompletan pregled urina (kontrola) - treća nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,5
Specifična težina	1020
Proteini	±
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	1-2
Eritrociti	2-3
Leukociti	1-2
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 22. Kompletan pregled urina (10g/1000ml) - treća nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,3
Specifična težina	1020
Proteini	+
Glukoza	+
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	±
Epitelne ćelije	2-3
Eritrociti	/
Leukociti	/
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 23. Kompletan pregled urina (20g/1000ml) - treća nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,0
Specifična težina	1025
Proteini	±
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	1-2
Eritrociti	0-1
Leukociti	1-2
Cilindri	/
Kristali	dosta kristala fosfata
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 24. Kompletan pregled urina (40g/1000ml) - treća nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,0
Specifična težina	1020
Proteini	+
Glukoza	+
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	1-2
Eritrociti	0-1
Leukociti	0-1
Cilindri	0-1 hijalini
Kristali	dosta kristala fosfata
Sediment urina	dosta bakterija

Ako želimo da uporedimo rezultate **urina u trećoj nedelji**, možemo reći da je **boja** urina uvek bila žuta. **Izgled** urina je svim grupama ocenjen kao замуćen. **Nitrita** nije bilo niti u jednoj grupi. **pH** urina se u svim grupama kretao od 6,0-6,5. **Specifična težina** je u kontrolnoj, prvoj i trećoj ispitnoj grupi bila 1020, dok je u drugoj ispitnoj grupi bila 1025. **Proteini** su pronađeni samo u tragu u kontrolnoj grupi i drugoj ispitnoj grupi, a u prvoj i trećoj ispitnoj grupi kao (+). **Glukoza** nije ustanovljena u kontrolnoj ni u drugoj ispitnoj grupi, da bi u prvoj i trećoj ispitnoj grupi bila (+). **Aceton** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Urobilinogen** je ocenjen kao normalan. **Bilirubin** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Hemoglobin** (HGB) je bio samo pronađen u tragu(±) u prvoj eksperimentalnoj grupi, u ostalim grupama hemoglobina nije bilo. **Epitelnih ćelija** je u kontrolnoj, drugoj i trećoj ispitnoj grupi bilo 1-2, a u prvoj 2-3. **Eritrocita** je u kontrolnoj grupi bilo 3-5, u prvoj 1-2, u drugoj i trećoj ispitnoj grupi 0-1. **Leukocita** je u kontrolnoj i drugoj ispitnoj grupi bilo 1-2, u prvoj ih nema, a u trećoj ispitnoj grupi 0-1. **Cilindri** nisu ustanovljeni u kontrolnoj, prvoj i drugoj ispitnoj grupi, dok su u trećoj viđeni hijalni cilindri 0-1. **Kristali** nisu ustanovljeni u kontrolnoj kao ni u prvoj eksperimentalnoj grupi, dok su u drugoj i trećoj ispitnoj grupi bilo dosta kristala fosfata. U sedimentu svih grupa je bilo dosta **bakterija**.

Ako želimo da naglasimo bitne činjenice u nalazu urina u trećoj nedelji možemo navesti da su nalazi urina između grupa ujednačeniji, pogotovo po pitanju postojanja bakterija, leukocita i nitrita. Treća ispitna grupa koja je u prethodne 2 nedelje prednjačila u većini parametara, dok u trećoj nedelji nije bila apostrofirana. Ipak je primećeno da se proteini i glukoza uglavnom nalaze kao (+) u ispitnim grupama, dok se u kontrolnoj grupi proteini od prve nedelje nalaze samo u tragovima.

1.5.6.4 Rezultati kompletnog pregleda urina – četvrta nedelja

Tabela 25. Kompletan pregled urina (kontrola) - četvrta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,0
Specifična težina	1015
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	1-2
Eritrociti	4-5
Leukociti	1-2
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 26. Kompletan pregled urina (10g/1000ml) - četvrta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	+
pH	7,0
Specifična težina	1025
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	±
Epitelne ćelije	4-6
Eritrociti	/
Leukociti	/
Cilindri	0-1 hijalini
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 27. Kompletan pregled urina (20g/1000ml) - četvrta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,5
Specifična težina	1025
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	0-1
Eritrociti	0-1
Leukociti	1-2
Cilindri	/
Kristali	dosta kristala fosfata
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 28. Kompletan pregled urina (40g/1000ml) - četvrta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,5
Specifična težina	1025
Proteini	+
Glukoza	+
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	1-2
Eritrociti	0-1
Leukociti	1-2
Cilindri	1-2 hijalina
Kristali	dosta kristala fosfata, malo soli amorfnih fosfata
Sediment urina	dosta bakterija

Ako želimo da uporedimo rezultate **urina u četvrtoj nedelji**, možemo reći da je **boja** urina uvek bila žuta. **Izgled** urina je svim grupama ocenjen kao zamućen. **Nitrita** je bilo samo u prvoj eksperimentalnoj grupi. **pH** urina se u kontrolnoj grupi bio 6,0, prvoj ispitnoj grupi 7,0, dok je u drugoj i trećoj ispitnoj grupi bio 6,5. **Specifična težina** je u kontrolnoj grupi bila 1015, dok je u svim eksperimentalnim grupama bila 1025. **Proteini** su pronađeni samo u trećoj eksperimentalnoj grupi kao (+), dok ih u drugim grupama nije bilo. **Glukoza** je pronađena samo u trećoj ispitnoj grupi kao (+), dok ih u drugim grupama nije bilo. **Aceton** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Urobilinogen** je ocenjen kao normalan. **Bilirubin** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Hemoglobin** (HGB) je bio samo pronađen u tragu(±) u prvoj eksperimentalnoj grupi, u ostalim grupama hemoglobina nije bilo. **Epitelnih ćelija** je u kontrolnoj i trećoj ispitnoj grupi bilo 1-2, a u prvoj 4-6 i u drugoj ispitnoj grupi 0-1. **Eritrocita** je najviše bilo u kontrolnoj grupi 4-5, dok ih u prvoj ispitnoj grupi nije bilo, a u druge dve 0-1. **Leukocita** je u kontrolnoj, drugoj i trećoj ispitnoj grupi bilo 1-2, dok ih u prvoj nije bilo. **Cilindri** nisu ustanovljeni u kontrolnoj i drugoj ispitnoj grupi, a u prvoj su viđeni hijalni cilindri 0-1, a u trećoj ponovo hijalni cilindri 1-2.

Kristali nisu ustnovljeni u kontrolnoj kao ni u prvoj eksperimentalnoj grupi, dok je u drugoj i trećoj ispitnoj grupi bilo dosta kristala fosfata. U sedimentu svih grupa je bilo dosta **bakterija**.

Ako želimo da naglasimo bitne činjenice u nalazu urina u četvrtoj nedelji, možemo navesti da su jedino u trećoj eksperimentalnoj grupi pronađeni proteini i glukoza. Do sada su se, u prethodnim nedeljama, cilindri pojavljivali samo u trećoj ispitnoj grupi, dok su u četvrtoj nedelji prvi put viđeni i u prvoj ispitnoj grupi. Kristala je bilo u drugoj i trećoj ispitnoj grupi ali znatno više u trećoj.

1.5.6.5 Rezultati kompletnog pregleda urina – peta nedelja

Tabela 29. Kompletan pregled urina (kontrola) - peta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,0
Specifična težina	1020
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	/
Eritrociti	/
Leukociti	1-2
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 30. Kompletan pregled urina (10g/1000ml) - peta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,5
Specifična težina	1025
Proteini	+
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	2-3
Eritrociti	/
Leukociti	1-2
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 31. Kompletan pregled urina (20g/1000ml) - peta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,5
Specifična težina	1020
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	6-8
Eritrociti	2-3
Leukociti	2-3
Cilindri	/
Kristali	dosta sitnih kristala fosfata
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 32. Kompletan pregled urina (40g/1000ml) - peta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	7,0
Specifična težina	1025
Proteini	+
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	0-1
Eritrociti	1-2
Leukociti	1-2
Cilindri	0-1 hijalini
Kristali	puno kristala fosfata, malo soli amorfnih fosfata
Sediment urina	Dosta bakterija

Ako želimo da uporedimo rezultate **urina u petoj nedelji**, možemo reći da je **boja** urina uvek bila žuta. **Izgled** urina je svim grupama ocenjen kao замуćen. **Nitrita** nije bilo niti u jednoj grupi. **pH** urina se u kontrolnoj grupi bio 6,0, prvoj i drugoj ispitnoj grupi 6,5, dok je u trećoj eksperimentalnoj grupi bio 7,0. **Specifična težina** je u kontrolnoj i drugoj ispitnoj grupi bila 1020, dok je u prvoj i trećoj eksperimentalnoj grupi bila 1025. **Proteini** su pronađeni samo u prvoj i trećoj eksperimentalnoj grupi kao (+), dok ih u drugim grupama nije bilo. **Glukoza** nije pronađena niti u jednoj grupi. **Aceton** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Urobilinogen** je ocenjen kao normalan. **Bilirubin** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Hemoglobin (HGB)** nije pronađen niti u jednoj grupi. **Epitelnih ćelija** u kontrolnoj grupi nije bilo, u prvoj ispitnoj 2-3, u drugoj ispitnoj 6-8 i trećoj ispitnoj grupi 0-1. **Eritrocita** nije bilo u kontrolnoj i prvoj ispitnoj grupi, dok je u drugoj bilo 2-3 eritrocita i u trećoj grupi 1-2 eritrocita. **Leukocita** je u kontrolnoj, prvoj i trećoj ispitnoj grupi bilo 1-2, jedino je u drugoj ispitnoj grupi bilo 2-3 leukocita. **Cilindri** su ustanovljeni jedino u trećoj ispitnoj grupi, hijalni 0-1. **Kristali** su ustanovljeni jedino u drugoj i trećoj ispitnoj grupi. U sedimentu svih grupa je bilo dosta **bakterija**.

Ako želimo da naglasimo bitne činjenice u nalazu urina u petoj nedelji možemo navesti da proteina i glukoze nije bilo niti u jednoj grupi. Cilindri su ponovo, jedino ustanovljeni u trećoj eksperimentalnoj grupi. Kristala je bilo u drugoj i trećoj ispitnoj grupi, ali znatno više u trećoj.

1.5.6.5 Rezultati kompletnog pregleda urina – šesta nedelja

Tabela 33. Kompletan pregled urina (kontrola) - šesta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,0
Specifična težina	1015
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	4-5
Eritrociti	/
Leukociti	1-2
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 34. Kompletan pregled urina (10g/1000ml) – šesta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamučen
Nitriti	+
pH	7,0
Specifična težina	1025
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	±
Epitelne ćelije	4-6
Eritrociti	/
Leukociti	/
Cilindri	0-1 hijalini
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 35. Kompletan pregled urina (20g/1000ml) – šesta nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamučen
Nitriti	/
pH	6,5
Specifična težina	1020
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	3-4
Eritrociti	1-2
Leukociti	1-2
Cilindri	0-1 hijalini
Kristali	dosta sitnih kristala fosfata
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 36. Kompletan pregled urina (40g/1000ml) – šesta nedelja

Boja	žuta
Izgled	mutan
Nitriti	/
pH	6,5
Specifična težina	1020
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	0-1
Eritrociti	1-2
Leukociti	1-2
Cilindri	/
Kristali	puno velikih kristala fosfata
Sediment urina	puno bakterija

Ako želimo da uporedimo rezultate **urina u šestoj nedelji**, možemo reći da je **boja** urina uvek bila žuta. **Izgled** urina je svim grupama ocenjen kao замуćen, sem u trećoj eksperimentalnoj grupi gde je ocenjen kao mutan. **Nitrita** je bilo samo u prvoj ispitnoj grupi. **pH** urina se u kontrolnoj grupi bio 6,0, prvoj 7,0, a u drugoj i trećoj ispitnoj grupi 6,5. **Specifična težina** je u kontrolnoj bila 1015, u prvoj ispitnoj grupi 1025, dok je u drugoj i trećoj ispitnoj grupi bila 1020. **Proteini** nisu pronađeni niti u jednoj grupi. **Glukoza** nije pronađena niti u jednoj grupi. **Aceton** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Urobilinogen** je ocenjen kao normalan. **Bilirubin** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Hemoglobin** (HGB) je pronađen samo u tragu (\pm) u prvoj ispitnoj grupi. **Epitelnih ćelija** je najviše bilo u prvoj eksperimentalnoj grupi 4-6. **Eritrocita** nije bilo u kontrolnoj i prvoj ispitnoj grupi, dok je u drugoj i trećoj ispitnoj grupi bilo 1-2. **Leukocita** je u kontrolnoj, drugoj i trećoj ispitnoj grupi bilo 1-2, dok u prvoj ispitnoj grupi nije bilo leukocita. **Cilindri** su ustanovljeni jedino u drugoj ispitnoj grupi, hijalni 0-1. **Kristali** su ustanovljeni jedino u drugoj ispitnoj grupi kao dosta sitnih kristala fosfata i u trećoj ispitnoj grupi puno velikih kristala fosfata. U sedimentu svih grupa je bilo dosta **bakterija**, jedino je u trećoj eksperimentalnoj grupi navedeno puno bakterija.

Ako želimo da naglasimo bitne činjenice u nalazu urina u šestoj nedelji, možemo navesti da proteina i glukoze nije bilo niti u jednoj grupi. Cilindri su ponovo, jedino ustanovljeni u trećoj eksperimentalnoj grupi. Kristala je bilo u drugoj i trećoj ispitnoj grupi, ali prvi put se pojavljuje puno velikih kristala fosfata kao nalaz, u trećoj eksperimentalnoj grupi.

1.5.6.7 **Rezultati kompletnog pregleda urina – šesta nedelja**

Tabela 37. Kompletan pregled urina (kontrola) – sedma nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamućen
Nitriti	/
pH	6,0
Specifična težina	1025
Proteini	/
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	4-5
Eritrociti	3-5
Leukociti	1-2
Cilindri	/
Kristali	/
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 38. Kompletan pregled urina (10g/1000ml) – sedma nedelja

Boja	žuta
Izgled	zamučen
Nitriti	/
pH	6,8
Specifična težina	1025
Proteini	+
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	±
Epitelne ćelije	2-3
Eritrociti	1-2
Leukociti	/
Cilindri	/
Kristali	prisutni kristali mokraćne kiseline
Sediment urina	dosta bakterija

Tabela 39. Kompletan pregled urina (20g/1000ml) – sedma nedelja

Boja	žuta
Izgled	mutan
Nitriti	/
pH	9,0
Specifična težina	1005
Proteini	+
Glukoza	/
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	0-1
Eritrociti	0-1
Leukociti	0-1
Cilindri	/
Kristali	dosta fosfata, malo soli amorfnih fosfata
Sediment urina	masa bakterija

Tabela 40. Kompletan pregled urina (40g/1000ml) – sedma nedelja

Boja	žuta
Izgled	mutan
Nitriti	/
pH	8,0
Specifična težina	1005
Proteini	+
Glukoza	+
Aceton	/
UBG	normalan
Bilirubin	/
HGB	/
Epitelne ćelije	0-1
Eritrociti	0-1
Leukociti	1-2
Cilindri	0-1 hijalini
Kristali	dosta fosfata
Sediment urina	dosta bakterija

Ako želimo da uporedimo rezultate **urina u sedmoj nedelji**, možemo reći da je **boja** urina uvek bila žuta. **Izgled** urina je u kontrolnoj i prvoj ispitnoj grupi ocenjen kao замуćen, a u drugoj i trećoj eksperimentalnoj grupi je ocenjen kao mutan. **Nitrita** nije bilo niti u jednoj grupi. **pH** urina se u kontrolnoj grupi bio 6,0, prvoj 6,8, u drugoj 9,0 i u trećoj ispitnoj grupi 8,0. **Specifična težina** je u kontrolnoj i prvoj ispitnoj grupi je bila 1025, a u drugoj i trećoj ispitnoj grupi 1005 !! **Proteini** su pronađeni u sve tri ispitne grupe kao (+), dok proteina nije bilo u kontrolnoj grupi. **Glukoza** je jedino pronađena u trećoj eksperimentalnoj grupi (+). **Aceton** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Urobilinogen** je ocenjen kao normalan. **Bilirubin** nije bio pronađen niti u jednoj grupi. **Hemoglobin (HGB)** je pronađen samo u tragu (\pm) u prvoj ispitnoj grupi. **Epitelnih ćelija** je najviše bilo u kontrolnoj grupi 4-5, u prvoj 2-3, a u drugoj i trećoj eksperimentalnoj grupi 0-1. **Eritrocita** je u najviše bilo u kontrolnoj grupi 3-5, u prvoj ispitnoj 1-2, a u drugoj i trećoj ispitnoj grupi 0-1. **Leukocita** je u kontrolnoj grupi bilo 1-2, u prvoj ispitnoj grupi leukocita nije bilo, u drugoj 0-1, a u trećoj 1-2. **Cilindri** su ustanovljeni jedino u trećoj ispitnoj grupi, hijalni 0-1. **Kristala** jedino nije bilo u kontrolnoj grupi, dok su u prvoj grupi ustanovljeni kristali mokraćne kiseline, a u drugoj i trećoj ispitnoj grupi kao dosta kristala fosfata. U sedimentu svih grupa je bilo dosta **bakterija**, jedino je u drugoj eksperimentalnoj grupi navedena je masa bakterija.

Ako želimo da naglasimo bitne činjenice u nalazu urina u sedmoj nedelji, možemo navesti da je izgled urina u drugoj i trećoj eksperimentalnoj grupi bio mutan. Prvi put u sedmonedeljnom praćenju urina primećen je porast vrednosti pH na 9,0 u drugoj i 8,0 u trećoj ispitnoj grupi. Prvi put u sedmonedeljnom praćenju urina primećeno je izrazito smanjenje specifične težine urina u drugoj i trećoj ispitnoj grupi na 1005 ! Proteina je bilo u svim ispitnim grupama (+), a glukoza je primećena jedino u trećoj ispitnoj grupi. Cilindri su ponovo, jedino ustanovljeni u trećoj eksperimentalnoj grupi. Kristala je bilo u svim ispitnim grupama, i pored kristala fosfata su ponovo primećeni i kristali mokraćne kiseline. Masa bakterija je primećena u drugoj ispitnoj grupi.

Ako poredimo praćene parametre kroz nedelje, možemo reći da je **boja** urina uvek bila žuta u svim grupama.

Izgled je obično bio zamućen da bi samo u nekoliko nalaza ocenjen kao mutan, pogotovu kada je u pitanju treća ispitna grupa u prvoj, šestoj i sedmoj nedelji.

Nitriti su samo sporadično pronalazeni.

Porast **pH** je primećen kao izrazit u sedmoj nedelji kada su u pitanju druga i treća eksperimentalna grupa na 9,0, odnosno 8,0.

Izrazit pad **specifične težine urina** je primećen u sedmoj nedelji na 1005, u drugoj i trećoj eksperimentalnoj grupi.

Proteini su veoma često pronalazeni u svim ispitnim grupama, u prvih 3 nedelje gotovo stalno u svim ispitnim grupama kao (+), jedino u drugoj nedelji u trećoj ispitnoj grupi (++) . U četvrtoj i petoj nedelji proteini su pronalazeni često, ali ne uvek u svim eksperimentalnim grupama. U šestoj nedelji nije ustanovljeno prisustvo proteina u urinu, da bi u sedmoj nedelji ponovo bili prisutni u svim grupama.

Glukoza je dosta retko pronalazena u nalazu urina, uglavnom u trećoj ispitnoj grupi kao (+), samo u drugoj nedelji kao (++) .

Aceton je bio pronađen samo u drugoj nedelji u drugoj ispitnoj grupi.

Urobilinogen je u svim nalazima urina ocenjen kao uredan.

Bilirubin nije ustanovljen niti u jednom nalazu urina.

Hemoglobin je veoma retko ustanovljen u nalazu urina.

Epitelne ćelije, eritrociti i leukociti su imali različite, ali uglavnom uravnotežene vrednosti, jedino je primećen veći skok leukocita na 15-20 u drugoj nedelji praćenja treće eksperimentalne grupe.

Cilindri u nalazu urina su bili ređi, uglavnom su se pojavljivali u trećoj ispitnoj grupi.

Kristali su bili dosta čest nalaz u eksperimentalnim grupama, uglavnom kao fosfati. Primećuje se da se češće javljaju u kasnijim nedeljama eksperimenta i tada povećavaju masu i broj.

U sedimentu su obično bile prisutne bakterije u svim ispitnim grupama, a veoma često i u kontrolnoj grupi.

VI Zaključci

1. Aristolochia clematitis je izrazito nefrotoksična biljka.
2. Utvrđene su patohistološke promene tubula i intersitijuma NMRI miša, koje su bile najveće u ispitnoj grupi koja je primala najaču dozu, tj u trećoj eksperimentalnoj grupi.
3. Ustanovljene patohistološke promene su slične opisanim patohistološkim promenama tubulointersitijuma obolelih od Balkanske endemske nefropatije.
4. Nije ustanovljeno postojanje karcinoma gornjeg urotrakta.
5. Makroskopskim pregledom prilikom obdukcije eksperimentalnih životinja nisu ustanovljene značajnije promene bubrega.
6. Došlo je prvo do izrazitog porasta diureze u prvoj odnosno drugoj nedelji praćenja, kod druge i treće eksperimentalne grupe, da bi nakon 7 nedelja istraživanja diureza u svim ispitnim grupama bila manja od kontrolne grupe.
7. Postoji porast ureje na kraju istraživanja, koji je dvostruko veći u trećoj eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu.
8. Postoji izrazit pad mokraćne kiseline na kraju istraživanja kod eksperimentalne grupe 3 koja je primala i najaču dozu.
9. Postoji izrazit pad granulocita u leukocitarnoj formuli u svim ispitnim grupama, a najveći je u trećoj ispitnoj grupi. Kako je došlo do pada relativnih vrednosti granulocita, tako je došlo do porasta relativnih vrednosti limfocita u prvoj i drugoj ispitnoj grupi. U trećoj ispitnoj grupi je pad granulocita praćen izrazito velikim povećanjem relativnog broja bazofilnih granulocita.
10. Postoji značajan pad specifične težine urina na kraju istraživanja u drugoj i trećoj eksperimentalnoj grupi.
11. Proteinurija je bila čest nalaz svim eksperimentalnim grupama, dok je bila odsutna ili samo u tragu u kontrolnoj grupi.
12. Na kraju eksperimenta je utvrđen znatni porast broja kristala fosfata u eksperimentalnim grupama.
13. Cilindri su se pojavljivali samo u nalazu urina u trećoj eksperimentalnoj grupi.
14. Najveći broj promena urina je utvrđen u trećoj eksperimentalnoj grupi.

VII Diskusija

Eksperimentom u ovom doktoratu pokazano je da je *Aristolochia clematitis* veoma nefrotoksična biljka.

Navedena nefrotoksičnost je dokazana pre svega patohistološkom analizom bubrega, kada su ustanovljene dominantne promene u vidu degeneracije i nekroze nefrocita proksimalnih tubula. Navedene promene su dozna zavisne, tj najveće su u 3 ispitnoj grupi.

U prvoj i drugoj ispitnoj grupi, patohistološkom analizom je ustanovljna parenhimatozna degeneracija mnogih proksimalnih tubula. Nekroza nefrocita je bila retka pojava u prvoj ispitnoj grupi, dok u drugoj ispitnoj grupi nije postojala. Cilindi su pronađeni u 25,7% eksperimentalnih životinja u prvoj ispitnoj grupi, i u 28,5% ekperimentalnih životinja u drugoj ispitnoj grupi, ali u obe grupe u manje od 10% tubula, te ovi podaci nemaju statističku značajnost.

Za razliku od prve dve eksperimentalne grupe, u trećoj se **tubulska nekroza** nalazi kod svih životinja, 100%, a njen intenzitet je u svakom vidnom polju korteksa od 10-50% tubula. U preparatima ove grupe dominira tubulska nekroza, koja se vidi kao pretvaranje nefrocita u zrnastu acidofilnu masu bez jedara, sa disorganizacijom ili potpunim odsustvom ćelija. Vidi se i raširena hidropsna degeneracija, deskvamacija nefrocita u lumen tubula, ogoljene bazalne membrane tubula i granulirani i hijalini cilindri. Brojni tubuli bez epitela su prošireni, rupturiranog zida, sliveni u vidu nepravilnih šupljina. **Cilindri**, granulirani i hijalini i leukocitni, nalaze se kod svih životinja ispitne grupe 3, a intenzitet promene kreće se od 10-30% tubula, srednja vrednost 13,75% zahvaćenih tubula.

Fokusi inflamacije postoje kod sve tri grupe, ali je u eksperimentanoj grupi 3, srednja vrednost broja inflamatornih fokusa je najniža kada gledamo ispitne grupe, što se može tumačiti toksičnim efektom aristolohije na leukocite i imuni odgovor.

Nije se ustanovilo postojanje karcinoma bubrega niti jedne eksperimentalne životinje, što je primećeno u studijama akutne i subaktne toksičnosti koje su koristile aristolohičnu kiselinu.

U makroskopskom pregledu životinja je samo kod jedne eksperimentalne životinje primećena sitno zrnasta promena.

Pored patohistološke analize bubrega eksperimentlanih životinja, uradjena su i druge pretrage (merenje diureze, analiza biohemijskih parametara, pregled krvne slike i analiza urina), što čini ovo istraživanje potpunijim. Razmatranjem navedenih parametara u diskusiji treba spomenuti neke bitne činjenice.

Ako poredimo ispitne grupe sa kontrolnom možemo reći da je **diureza** u prvoj nedelji praćenja u trećoj ispitnoj grupi značajno porasla, na 61,2 ml dok je u kontrolnoj grupi bila 16 ml. U prvoj i drugoj ispitnoj grupi takođe postoji porast na 18,2 i 29,2 ml. Fenomen naglog skoka diureze se vidi ponovo u drugoj ispitnoj grupi u drugoj nedelji, 63 ml, dok je u kontrolnoj grupi diureza bila 15 ml. Ovaj fenomen naglog skoka diureze je viđen samo u drugoj i trećoj ispitnoj grupi, koje su primale i najveću dozu. Nema sigurnog objašnjenja navedeng fenomena sem da se organizam eksperimentalnih životinja borio povećanjem diureze protiv većih doza nefrotoksičnog agensa. U trećoj, četvrtoj, petoj i šestoj nedelji diureza je ujednačenija u svim ispitnim grupama, i ima uglavnom tendenciju opadanja, da bi u sedmoj nedelji na kraju istraživanja, diureza u svim eksperimentalnim grupama bila manja u odnosu na kontrolnu grupu. Smanjenje diureze na kraju istraživanja je u direktnoj vezi sa utvrđenim patohistološkim promenama tubulointersticijskog sistema.

Kada je u pitanju analiza biohemijskih parametara, najznačajniji je osvrt na azotne materije i elektrolite. Primećen je izrazit porast **ureje** na kraju istraživanja. Vrednost ureje u kontrolnoj grupi bila je 6,4 mmol/l, u prvoj eksperimentalnoj grupi 8,5, u drugoj eksperimentalnoj grupi 9,3 i u trećoj eksperimentalnoj grupi 12,9. Porast vrednosti ureje je veći kako se doza nefrotoksičnog agensa povećavala i u trećoj eksperimentalnoj grupi je za dvostruko veća u odnosu na kontrolnu. Poređenje ovih rezultata sa literaturinim podacima je bilo dosta teško, jer je malo ovakvih istraživanja. U materijalima i metodima navedena je vrednost ureje za krv miša (nije striktno NMRI miš za eksperimentalna istraživanja) u opsegu vrednosti od 8-33 mg/dl (Research Animal Resources, University of Minnesota, Reference Values for Laboratory Animals, <http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>). Većina drugih ranije istraženih parametara imaju faktore za konverziju, tako da se različite merne jedinice mogu upoređivati pretvaranjem. Međutim ne postoji dokazani faktor konverzije za aristolohičnu kiselinu. U radu Aleman i

saradnici gde su analizirane uredne vrednosti biohemijskih parametara za NMRI miša, nije analizirana ureja [38].

Kada je u pitanju analiza **kreatinina**, vidi se porast vrednosti kreatinina eksperimentalnih grupa 1,2 i 3 (32,30,35 $\mu\text{mol/l}$) u odnosu na kontrolnu grupu (28 $\mu\text{mol/l}$). Navedeni porast nije izrazito velik. U radu Alemana i saradnika ustanovljene su srednje vrednosti kreatinina od 50,94 $\mu\text{mol/l}$ za muške jedinke i 52,92 $\mu\text{mol/l}$ za ženske jedinke. Navedeno istraživanje urednih vrednosti je sprovedeno na soju NMRI miševa na Kubi [38]. Ima malo pouzdanih literaturnih podataka o referentnim vrednostima biohemijskih parametara za NMRI miša, jer na ove vrednosti može uticati značajan broj faktora kao što su starost, pol, način uzgajanja, ishrana, način sakupljanja uzoraka i metodologija testiranja uzoraka. Navedeni literaturni podaci su više smernice, nego jasne referentne vrednosti. Zbog toga je daleko značajnije poređenje rezultata eksperimentalnih grupa sa kontrolnom, nego sa urednim vrednostima iz literature.

Utvrđen je veliki pad vrednosti **mokraćne kiseline** na kraju istraživanja u eksperimentlanoj grupi 2 (321 $\mu\text{mol/l}$) i eksperimentalnoj grupi 3 (191 $\mu\text{mol/l}$) u odnosu na kontrolnu grupu (401 $\mu\text{mol/l}$). U trećoj ispitnoj grupi koja je primala i najveću dozu, pad vrednosti mokraćne kiseline je bio više nego dvostruk u odnosu na kontrolnu grupu. Navedeni pad je i u direktnoj vezi sa primećenim formiranjem kristala i hijanih cilindara, koji su primećeni kako u laboratorijskim parametrima urina, tako i u patohistološkoj analizi preparata bubrega.

Kada je u pitanju vrednost elektrolita, možemo reći da je vrednost **natrijuma** bila ujednačena u svim grupama. Vrednost **kalijuma** je oscilirala i ne može se reći da je primećen veliki disbalans ispitnih u odnosu na kontrolnu grupu.

Možemo reći da su vrednosti **proteina** i **glukoze** uglavnom bile ujednačene u svim grupama.

Kada diskutujemo parametre **crvene krvne loze**, možemo reći da je došlo do blagog povećanja broja eritrocita u drugoj i trećoj eksperimentalnoj grupi, kako je doza rasla. Navedeni porast je praćen povećanjem hematokrita i hemoglobina, od kontrolne grupe prema trećoj eksperimentalnoj grupi. Porast RBC i Hgb je bio konstantan, dok je vrednost Hct rasla, ali oscilirala. Stiče se utisak da je porast navedenih parametara diskretan i verovatno nije od posebne značajnosti.

Kada diskutujemo parametre **bele krvne loze**, apsolutni broj leukocita WBC je bio značajno veći u trećoj ispitnoj grupi ($12,2 \times 10^9/l$) u odnosu na kontrolnu i ostale ispitne grupe. Iako postoji povećanje ukupnog broja leukocita u trećoj ispitnoj grupi, koja prima najveću dozu, primećen je izrazito veliki pad neutrofilnih granulocita u leukocitarnoj formuli na 1,1% u odnosu na kontrolnu grupu gde je 29,5%. Malo manji pad vrednosti neutrofilnih granulocita je primećen u prvoj (7,6%) i drugoj ispitnoj grupi (7,8%). Navedeno smanjenje granulocita u leukocitarnoj formuli, ide sa povećanjem limfocita u prvoj i drugoj ispitnoj grupi, dok u trećoj eksperimentalnoj grupi premećen izrazito velik porast bazofilnih granulocita na 35,9%. U ostalim grupama je učešće bazofilnih granulocita u leukocitarnoj formuli bilo oko 0%. Razumljiv je porast limfocita pri hroničnom izlaganju nefrotoskičnom agensu, ali je nagli porast bazofilnih granulocita u trećoj eksperimentalnoj grupi na kraju istraživanja teško objasniti.

Značajni pad granulocita u trećoj ispitnoj grupi je u korelaciji sa patohistološkom analizom navedene grupe, kada je ustanovljeno smanjenje broja inflamatornih fokusa.

Pri diskusiji rezultata **urina** je veoma važno napomenuti da je primećen značajni pad vrednosti specifične težine urina na 1005, u drugoj i trećoj eksperimentalnoj grupi u sedmoj nedelji, odnosno na kraju istraživanja. Navedeni pad se može objasniti postojanjem tubulointersticijskih promena i samim tim smanjenjem sposobnosti bubrega da koncentriše urin. U sklopu navedenih promena i gubitkom koncentracije urina dolazi do značajnog povećanja pH urina u sedmoj nedelji, u drugoj i trećoj eksperimentalnoj grupi. Proteinurija je kao nalaz pronađen u 15 od 21 nalaza urina, kada su u pitanju eksperimentalne grupe. U kontrolnoj grupi, proteina ili nije bilo ili su bili prisutni u tragovima. Proteinurija je bila pozitivna kao (+), samo jednom kao (++) . Ipak možemo reći da je proteinurija u većini nalaza urina postojala, što ide u prilog oštećenja bubrega. Kristali su bili dosta čest nalaz u eksperimentalnim grupama, uglavnom kao fosfati. Primećuje se da se češće javljaju u kasnijim nedeljama eksperimenta i tada povećavaju masu i broj. **Cilindri** su se uglavnom pojavljivali u trećoj ispitnoj grupi. Cilindri mogu opstruisati lumen tubula i dovesti do smanjenja funkcije bubrega. Na kraju eksperimenta se konstatuje mutan izgled urina u trećoj ispitnoj grupi. Jedino je primećen veći skok leukocita na 15-20 u drugoj nedelji praćenja treće eksperimentalne grupe. Bakterija je bilo u većini nalaza urina svih grupa. Ostali ispitivani parametri urina; boja, nitriti, glukoza, aceton, urobilinogen, bilirubin, hemoglobin, ćelijski sediment urina nisu pokazali veće oscilacije između grupa i stoga

nisu od značaja. U trećoj ispitnoj grupi, primećeno je najviše promena urina, što se povezuje sa najvećom dozom nefrotoksičnog agensa koju je primala ova eksperimentalna grupa.

Posle ovog razmatranja rezultata eksperimenta, postavlja se pitanje u čemu je značajnost potvrđene nefrotoksičnosti *Aristolochie clematitis* i rezultata dobijenih u ovom istraživanju hronične toksičnosti ?

Značajnost je u tome što ista ovakva tubulointersticijalna lezija može nastati i kod ljudi pod dejstvom istog agensa. Biljka korišćenja u ovom eksperimentu je sakupljana u okolini Novog Sada, ali je generalno široko rasprostranjena korovska biljka i lako može doći u kontakt sa ljudima i životinjama. U daljoj diskusiji biće razmotrena povezanost *Aristolochie* sa oboljenjima bubrega kod ljudi.

Povezanost toksičnosti *Aristolochie* i balkanske endemske nefropatije je veoma bitna. BEN je hronični tubulointersticijalni nefritis koji se uglavnom javlja u ruralnim selima u slivu reke Dunav u Bosni, Bugaskoj, Hrvatskoj, Rumuniji i Srbiji. U Srbiji se najviše javlja u okolini reke Save i Kolubare [9,39]. Najviše slučajeva BENA u tri sela, Šopić, Petka i Vreoci u opštini Lazarevac [40]. Više od 50 godina je predmet izučavanja, ali do sada se nije došlo do jasnih odgovora [26,41,42,43]. Bolest obično napada starije od 18 godina i zahvata samo 10% domaćinstava u endemskim područjima [44]. Postoji velika povezanost BENA i tranziciocelularnog karcinoma gornjeg urotrakta [45,46,47]. Navedeni karcinom se znatno češće javlja kod pacijenata koji boluju od BENA i leče se hemodijalizom [46,48,49]. Navedena povezanost je dokazana u više područja endemskog regiona [509]. Velik broj pacijenta sa ovom nefropatijom biva prinuđen da se leči hemodijalizom, što predstavlja veliki organizacioni i finansijski problem [51]. Srbija se nalazi u centru endemskog regiona BENA. Proučavanje bolesti dosta otežava njen spori i dugotrajni razvoj, nedostupnost podataka vezanih za pacijente i neadekvatno vođenje registara. Može se reći, da dugo nije bilo ni opšte prihvaćenog konsenzusa za skrinig, dijagnostiku, klasifikaciju i lečenje BENA [52].

Iako se tradicionalno opisuju samo u Balkanskim državama, oboljenja bubrega slična BENU mogu se javiti i biti neprepoznata i u drugim regionima sveta. BEN nema patognomonične kliničke i patološke karakteristike, i u ovom trenutku nema specifičnih markera bolesti. Čim se

etiološki agens otkrije, povećá će se broj dijagnostikovanih izolovanih slučajeva ili grupisanih BEN slučajeva, kao i pratećih urotelijalnih karcinoma, izvan endemskih regiona na Balkanu.

Postoji tri teorije koje pokušavaju da objasne ekološki uzrok ove bolesti: (1) hipoteza sa aristolohičnom kiselinom, koja smatra da je bolest proizvod hroničnog trovanja sa Aristolochijom, (2) hipoteza sa mikotoksinima, koja smatra da je BEN proizvod ohratoksina A, i (3) pliocen lignite hipoteza, koji predlaže da je bolest uzrokovana dugotrajnom izlaganju policikličnim aromatičnim ugljovodonicima i drugim otrovnim jedinjenjima koji dospevaju do bunara iz kojih se voda koristi za piće u predelu endemska naselja koja se nalaze u zoni površinskih kopova uglja.

Izučavana je dosta povezanost BENA sa ochratoxinom A [53,54,55]. Pokazano je da je nefrotoksičan kod zečeva, pilića [56,57], svinja [57], citotoksičan na kulturi ćelija i karcinogen kod glodara [58,59,60]. Ochratoxin A je mikotoksin koji poseduje kancerogeno, nefrotoksično, teratogeno, imunotoksično i verovatno neurotoksično dejstvo kod životinja. Povezan je sa razvojem nefropatije kod ljudi. Može imati dug poluživot kod ljudi. Međutim jako je teško dokazati da je navedeni mikotoksin direktni izazivač BENA ili karcinoma urotrakta. Zbog toga se ranije dugo smatralo da nema ubedljivih dokaza da je epidemiološkim podacima potvrđena i povezanost između ohratoksina i izloženosti i prevalence endemske nefropatije ili urotelijalnog karcinoma. Mišljenje naučnog komiteta za hranu Evropske unije, da unos veće količine Ochratoxin A od 14 ng/kg/dnevno, će posle izvesnog vremena izazvati nefrotoksičnost [61]. Raste zabrinutost da navedeni mikotoksin može biti karcinogen kod ljudi te treba težiti sto manjem unosu [61,62,63].

Feder i sar. su ukazali još početkom 90-tih godina, da neka od endemskih naselja imaju iskopine lignita u njihovoj blizini [64]. Tako je nastala "pliocen lignite" hipoteza o nastanku BENA [65]. Pliocen ugalj, predstavlja ugalj starosti od 1.6-5.3 miliona godina, i najmlađi je ugalj na Balkanu. Ovaj niskokalorični ugalj na Balkanu zadržava mnoga od kompleksnih organskih jedinjenja sadržanih u biljnim prekursorima uglja [66]. Vremenom bi ovaj ugalj mogao generisati složene mešavine vode i rastvorljivih ugljovodonika, koji su prisutni u vodi za piće iz plitkih bunara farmi [67]. Hemijska analize vode za piće iz plitkih bunara farmi u endemskim naseljima ukazuje na prisustvo rastvorljivih policikličnih aromatičnih ugljovodonika i aromatičnih amina. Mnoga od ovih jedinjenja su poznati kancerogeni i mogu da izazovu karcinom urotrakta [68,69].

Pliocen-lignit hipoteza u nastanu BENA je više mogućnost nego što je dokazana direktna povezanost. Činjenica je da nisu sve opisane endemske oblasti topografski povezane sa poznatim nalazištima ovog uglja [70,71]. Samo jedna endemska oblast u Srbiji (Kolubara, Lazarevac) i jedna endemska oblast u Bugarskoj.

Bilo je takođe pokušaja da se izučava uticaj silicijuma [72], selenijuma [73], bakterija i virusa [43,74], deficijencija kalcijuma i magnezijuma u vodi za piće [75] na nastanak BENA, ali nijedna studija nije dala podatke koji bi otkrivale direktnu povezanost i statističku značajnost.

Pošto su svi navedeni razmatrani uzroci eliminisani ili ocenjeni kao malo verovatni uzroci BENA, pažnja je usmerena na Aristolochiu. Posebno je interesovanje nastalo nakon 1993, kada je opisan slučaj lečenja dve mlađe pacijentkinje u Belgiji, koje su bile na tretmanu za mršavljenje jedne Klinike gde je korišćen preparat kineskih biljaka na bazi biljke *Stephania tetrandra*. Tom prilikom došlo je do slučajne zamene, kada su umesto navedene biljke, pacijentkinje zapravo dobile *Aristolochia fangchi*, koja je bogata aristolohičnom kiselinom (AA). Obe biljke slično se obeležavaju na kineskom jeziku i ima indicija čak da su se upotrebljavale u Kineskoj tradicionalnoj medicini, te u Japanu i Indiji bez obzira na botaničku klasifikaciju. Potom su pacijentkinje primljene u bolnicu sa ozbiljnim intersticijalnim nefritisom koji je za nekoliko meseci prešao u odmaklu fazu bubrežne insuficijencije [76,77]. Naknadnim istaživanjem otkiveno je da je još 7 pacijentkinja prethodnih godina imale isti problem [78]. Tada se napravio veliki napor u istraživanju i razumevanju uočenog problema i definisanju uzroka [79,80]. Tada je bolest nazvana kineskom biljnom nefropatijom, Chinese-herb nephropathy (CHN) [81,82]. Odmah se uočila povezanost otkrivene bolesti sa razvojem karcinoma gornjeg urotrakta [83,84,85]. Pošto su se slični preparati za mršavljenje postojali u mnogim zemljama, posumnjalo se da otkriveno oboljenje nije vezano samo za Belgiju [86,87]. Potom se shvatilo da takvi slučajevi oboljevanja postoje i u drugim zemljama, kao što su Francuska [88] i Engleska [89], Japan [90,91], USA [92] i Kina [93]. Ubrzo se svatilo da bolest postoji na globalnom nivou. U prethodno navednim istraživanjima se ustanovilo da je pravi izazivač aristolohična kiselina [94,95], kada je bolest nazvana AAN (Aristolochic acid nephropathy). Tada, kada je shvaćeno da biljka raste u brojnim regionima sveta [96], da postoje slične promene na bubrezima kod AAN sa promenama koje se viđaju kod BENA, u istraživanjima se počela naglašavati ova veza [97,98]. Sa druge strane istraživači koji su se samo bavili sa BEN, počeli su uviđati da je ovo možda

nefropatija koja se prostire i van ranije definisanog endemskog regiona [99]. Tada je učinjen dodatni napor u uzučavanju Aristolohije u endemskim području BENA.

Prva ispitivanja su sprovedena još pre oko 45 godina, kada je posumnjano da je AA etiološki agens BEN. Dugo se smatralo da je problem u vodi, jer su endemska područja BEN bila u slivovima reka. Dugo se proučavani uzorci vode iz reka i bunara. Potom se posmunjalo na hranu. Nije bilo objašnjenja kako jedno domaćinstvo u endemskom području ima više članova porodice koji imaju nefropatiju, a susedno domaćinstvo nema nijednog. Oba domaćinstva imaju isto snabdevanje vodom i uglavnom sličnu ishranu. Tada je Ivić sproveo studiju koja je pratila geografsku distribuciju biljke *Aristolochiae clematitis* (AC) u endemskim područjima u Srbiji i došao do pretpostavke da se AC, nalazi verovatno u brašnu dobijenog od pšenice iz endemskih područja. Ivić je 1969. godine ukazao na prisustvo aristolohične kiseline u semenu *A. clematitis* na kultivisanim poljima širom regiona Balkanskog poluostrva. Kao potvrda ovog, autor ukazuje da su konji koji su konzumirali seno koje je sadržalo ovu biljku, pokazali znake poremećene bubrežne funkcije. Histopatološka analiza tkiva bubrega ovih životinja, pokazala je oštećenje tubula, glomerula i hronični intersticijalni nefritis [100]. Takođe, u endemskim regionima Hrvatske, Ivić je 1970. godine pronašao tragove aristolohične kiseline u brašnu koje je bilo kontaminirano sa semenima vrste *A. clematitis*. Nefrotoksično i kancerogeno dejstvo ove biljke, potvrdio je u eksperimentima na zečevima koje je hranio sa kontaminiranim brašnom. Međutim ovo istraživanje nije dobilo veću podršku u to vreme. Dugo je bilo zaboravljeno da bi problem bio aktuelizovan posle opisanih slučajeva trovanja biljakama u Belgiji. Kasnije je utvrđeno da simptomi i promene koji su se javili na bubrezima zečeva u potpunosti odgovaraju promenama ustanovljenim u balkanskoj endemskoj nefropatiji kod ljudi, Stefanović 1999 [29]. Pored toga, u eksperimentu na pacovima, pokazano je da subkutanom inokulacijom vodenog ekstrakta semena *A. clematitis*, dolazi do nastanka sarkoma na mestu uboda Ivić, 1969; Hranjec, 2005 [100,101].

Novija istraživanja uradjena u endemskim područjima Hrvatske, obnovila su staru hipotezu da izlaganje sa AA nastaje unosom brašna koje je kontaminirano biljkom. Biljka AC raste kao korovska biljka svuda na Balkanu, ne smo u endemskim područjima. Raste u okviru žitnih polja kao korov i tada dospeva u žito prilikom vršidbe. Potom su vlasnici takvih njiva tj takvog žita, mleli svoje žito i tako kontaminirano brašno koristili za ishranu svoje porodice. To je

bilo objašnjenje kao neke porodice u enedmskim područjima imaju obolele od nefropatije, a neke ne [100].

Potom su uradjena opsežna epidemiološka ispitivanja koja su donela nove informacije [102,103]. I tada je aktivno ispitivana povezanost AAN i BENa [104,105]. Poslednjih godina je rađeno na definisanju kliničkog statusa, lečenja i prevencije [106,107]. Radjene su opsežne studije da bi se otkrio aktivni biomarker koji bi pomogao izučavanju obe bolesti [108,109,110]. Razmatran je uticaj i povezanost serotina [111], dexfenfluramine [112], renin–angiotensin sistema [113], intracelularnog kalcijuma [114] sa navedenim bolestima. Potom su rađena ispitivanja DNA produkata koje formira aristolohična kiselina [115,116,117]. Urađena ispitivanja DNA i p53 mutacija [118,119,120]. Pokušavala da se definiše uloga citohrom p450 sistema, tj metabolisanje AA i mogućnost smanjenja toksičnosti navedene kiseline [121,122,123]. Istraživana je mogućnost smanjenja toksičnog efekta AA sa hepatocitnim faktorom rasta [124,125]. Uporedo sa navednm istraživanjima, je pokušavano korišćenje i prilagođavanje raznih metoda izučavanju AA, PCR metode [126], korišćenje likvidne hromatografije u tandemu sa spektrometrijom za detekciju AA [127,128], detekcija postojanja AA u raznim preparatima sa korišćenjem kapilarne elektroforeze sa laserski indukovanom fluoroscencijom [129]. Nastavljeno je ispitivanje AA na ćelijskom nivou [130,131] i na nivou kulture ćelija [132]. Ispitivana je značajno veća prevalenca valvularne bolesti srca kod AAN boleniska [133,134]. Nastavljeno je dalje izučavanje same biljke i njeno korišćenje u raznim preparatima [135,136]. Napravljene su online baze podataka gde su svi zainteresovani mogli doći do informacija o kineskim tradicionalnim preparatima [137]. Organizacije poput Svetske zdravstvene organizacije WHO [138] i američke Agencije za hranu i lekove FDA [139], su izdale zvanična saopštenja o štetnosti AA.

Aristolohična kiselina se sastoji od tipa I i tipa II [140,141], koji se nakon metabilsanja u telu mogu vezivati za amino grupe purina i biti DNA produkti. Smatra se da aktivnost ovih metobolita mogu menjati lekovi, pušačka navika, hemijska zagađenja, čime se objašnjava velika različitost u osetljivosti na toksičnost AA. Stiče se utisak da je tip I toksičniji [142].

Nastavljeno je dalje ispitivanje povezanosti AA sa karcinomom urotrakta [143,144]. Najčešće se javljao karcinom gornjeg urotrakta, tj pijelona [145], mada su opisani i retki slučajevi karcinoma mokraćne bešike [146].

Bilo je studija koje su razvijale animalne modele akutne toksičnosti na pacovima (Winstar) i miševima (NMRI) oba pola. Smrtonosna doza se kretala od 56-203 mg/kg u oralnom unošenju ili 38-83 mg/kg u intravenskom unošenju [147]. Ustanovljene su patohistološke promene u vidu izražene tubularne nekroze, atrofije limfnih organa, velika područja površnih ulceracija digestivnog trakta praćenih hiperplazijom i hiperkeratozom skvamoznog epitela. Autori su zaključili da su životinje umrle od akutne renalne insuficijencije, mada funkcionalno ispitivanje parametara bubrežne funkcije nije sprovedeno [147,148]. Potom je sprovedeno ispitivanje na animalnom modelu sa subakutnom toksičnošću, kada je oralanim putem unošeno 25mg AA dnevno Winstar pacovima. Nakon četiri nedelje su životinje žrtvovane i tada su ustanovljene promene po tipu umerene renalne tubularne nekroze, sa značajnom glikozurijom i proteinurijom. Međutim nije ustanovljeno postojanje atrofije proksimalnih tubula, niti intersticijalne fibroze, koje su tipični patohistološki nalazi kod CHN u studijama [149].

Potom se prešlo na pokušaje razvoja animalnog modela hronične toksičnosti, međutim prvi pokušaji da se eksperimentano reprodukuje AAN su propali. U prvoj studiji su 7 Winstar pacova oralno dobijali čistu AA (10mg/kg, 5 dana nedeljno u trajanju od 3 meseca), dok je druga grupa Winstar pacova dobijala prah koji je sadržio AA sa fenfluraminom. Kada su životinje žrtvovane, obe grupe su razvile očekivane tumore, ali ne i renalnu tubulointesticijalnu fibrozu [150]. Potom je na Novom Zelandu sprovedeno ispitivanje hronične toksičnosti na belim zečevima, koji su 17-21 meseci primali intraperitonealne injekcije koje su sadržale 0.1 mg AA po kg telesne težine. Injekcije su ordinirane 5 dana u nedelji. Nakon zaršetka eksperimenta pronađene su tipične patohistološke promene za CHN/AAN. Kod 12 ženskih belih zečeva pronađena je tubularna atrofija, intersticijalna fibroza i urotelijalna atipija [10].

U studiji Debelle FD et al, razvijen je kratkoročni animalni model za AAN, kada se subkutano unosilo 10 mg/kg dnevno Winstar pacovima. Nakon 35 dana kada su životinje žrtvovane, otkiveni su funkcionalni i patohistološki pokazatelji bubrežne insuficijencije, kao što je značajno povećanje serumskog kreatinina, kao i fokusi izražene atrofije proksimalnih tubula, okruženi intersticijalnom fibrozom [151].

Nefrotoksičnost različitih derivata AA je ispitivana kod C3 H/H miševa, intraperitonealnom injekcijom sa 2.5 mg/kg AA, 5 dana u trajanju od 2 nedelje, kada je došlo do razvoja oštećenja tubula koji su bili okruženi sa mononuklearnim ćelijskim infiltratom. Potom je

eksperiment nastavljen na ostalim životinjama da bi 2 nedelje nakon prve analize kada su otkrivena polja postojanja inflamatornih infiltrata postala izraženija i sa stvaranjem intersticijalne fibroze [152]. Tesirana su oba tipa AA, kada je tip I pokazao veću nefrotoksičnost. Navedena konstatacija da je tip I AA nefrotoksičniji, takođe je potvrđena i nekim in vitro studijama koji su proučavale LLC-PK1 deo membrane prokismalnih tubula [132,142,152,].

Animalne modele akutne toksičnosti je bilo lako izvesti, dok su problemi nastali kada su počeli eksperimenti sa razvojem hronične toksičnosti. Neki autori su upotrebljavali čistu AA, neki su pokušavali čak da isprobaju subtipove AA, dok su neki autori koristili biljku kao infuz. Pokušano je per os davanje i inokulacija. Nije se moglo sa sigurnošću odrediti koliko eksperiment treba da traje. Tako da su eksperimenti sa razvojem animanog modela hronične toksičnosti i dalje u toku, i tek treba da obezbede podatke koji će moći bolje objasniti prirodu bolesti i povezanost sa drugim sličnim entitetima.

Poslednjih godina, svugde u svetu se aktivno izučava uticaj AA na zdravlje ljudi i životinja. Takođe otkrivaju se nove vrste u okviru porodice **Aristolochiaceae**. Takve podvrste su pronađene u Iranu [153], Argentini [154], Tajlandu [155], Turskoj [156], Vietnamu [157] i Kini [158]. Nove vrste će još više zakomplikovati već složenu situaciju.

Do danas se nije uspelo definitivno dokazati da li su AAN i BEN zapravo različita lica iste bolesti [159,160]. Puno se poslednjih godina razmatra i multifaktorijalna geneza bolesti u kojoj učestvuju mikotoksini i AA [161].

Danas, posle 50 godina istraživanja BEN i ostalih nefrotoksičnih poremećaja, još uvek je puno nepoznanica. U poslednje vreme sve više se naglašava uticaj biljaka iz roda *Aristolochia* na razvoj nefrotoksičnih lezija. Ukoliko se istraživanjima potvrdi da je AAN i BEN ista bolest, doći ćemo do dugo očekivanog odgovora o etiologiji i patogenezi bolesti, a samim tim će prevencija i lečenje napredovati. U tom slučaju će se prefiks balkanska i endemska u BEN izgubiti, jer je biljka raširena po svetu i naziv koji je bolje opisuje je nefropatija izazvana aristolohičnom kiselinom (AAN).

VIII LITERATURA

1. Draganić VP. Anatomija čoveka – trbuh: drugo izdanje. Beograd. Naučna Knjiga; 1983. P 93-9.
2. Mihalj M. Anatomija čoveka. Novi Sad. Budućnost; . p.154- 4.
3. Stenberg SS. Histology for pathologist. New York. Lippincott Raven;1997. p. 799-847,
4. Anđelković Z, Somer Lj, Perović M, Avramović V, Milenkova Lj, Kostovska N, Petrović A. Histološka građa organa. Niš: Bonafides; 2001. p. 116-18.
5. Milin J, Histologija. Novi Sad. Visio Mundi;1994. p. 247-48.
6. Michael HR, Gordon 1K, Wojciech P. Histology. Fourth Edition. Lippincott Williams and Wilkins; 2004. p. 707-9.
7. Danziger J, Zeidel M, Parker MJ, Schwartzstein RM. Renal Physiology: A Clinical Approach (Integrated Physiology). Lippincott Williams and Wilkins; 2012. p. 30-47.
8. Human Anatomy and Physiology. OpenStax College resource, 2013 by Rice University, Houston, Texas. p.1160-64.
9. Đukanović LJ, Oštić V. Bolesti bubrega. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd 1999. p 315-52.
10. Cosyns JP, Dehoux JP, Guiot Y, Goebbels RM, Robert A, Bernard AM, van Ypersele de Strihou C. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy. *Kidney Int* 2001; 59(6): 2164-73.
11. Cosyns JP. Aristolochic acid and ‘Chinese herb nephropathy’: A review of the evidence to date. *Drug Saf* 2003; 26: 33–48.
12. Cosyns J - P, Jadoul M, Squifflet J - P *et al.* Urothelial lesions in Chinese-herb nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 1011– 1017.
13. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP *et al.* Chinese herbs nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int* 1994; 45: 1680– 1688.
14. Cronin AJ, Maidment G, Cook T, Kite GC, Simmonds MS, Pusey CD, Lord GM. Aristolochic acid as a causative faktor in case of Chinese herbal nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(3): 524-25.

15. Nortier J, Pozdzik A, Vanherweghem JL, Roumeguere T. Aristolochic acid nephropathy ("Chinese herb nephropathy"). *Nephrologie et Therapeutique*, 2015; 11(7): 574-588.
16. Meyer M.M, Chen T.P, Bennett W.M :Chinese herb nephropathy. *Proc (BaylUniv Med Cent)* 2000; 13: 334–337.
17. Yang C.S, Lin C.H, Chang S.H et al. : Rapidly progressive fibrosing interstitialnephritis associated with Chinese-herbal drugs. *Am J Kidney Dis* 2000;35: 313–318.
18. Nortier J.L, Schmeiser H.H, Muniz Martinez M.C et al. Invasive urothelial carcinoma after exposure to Chinese-herbal medicine containing aristolochic acid may occur without severe renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 426–428.
19. Lord G.M, Cook T, Arlt V.M et al. : Urothelial malignant disease and Chinese-herbal nephropathy. *Lancet* 2001; 358: 1515–1516.
20. Danilović V, Đurišić M, Mokranjac M, Stojimirović B, Živojinović J, Stojaković P. Porodična oboljenja bubrega u selu Šopići izazavana hroničnom intoksikacijom olovom. *Srpski arhiv* 1957; 85: 1115-1125.
21. Tančev I, Evstatijev P, Dorosiev D, Pančev Z, Cvetkov G. Proučavanja na nefritite v Vračanska okolija. *Savr. Med*, 1956; 7: 14-29.
22. Danilović V, Đurišić M, Mokranjac M, Stojimirović B, Živojinović J, Stojaković P. Nephrites chroniques provoquies per l'intoxication au plomb per voie digestive (farine). *Presse Med* 1957; 65: 2039-40.
23. Danilović V. Chronic nephritis due to ingestion of lead-contaminated flour. *Brit Med J* 1958; 1: 27-28.
24. Velimirović D. Field investigation of the spread and frequency of endemic nephropathy in the region of Kolubara. *Academie Serbe des Sciences et des Artes Bulletin* 1980; 69: 79-85.
25. Batuman V: Fifty years of Balkan endemic nephropathy: daunting questions, elusive answers. *Kidney International*, 2006; 69: 644–646.
26. Stefanović V, Polenaković M: Fifty Years of Research in Balkan Endemic Nephropathy: Where Are We Now? *Nephron Clinical Practice*, 2009; 112: 51–56.

27. Stefanovic V, Tončeva D, Atanasova S, Polenaković M: Etiology of Balkan Endemic Nephropathy and Associated Urothelial Cancer. *American Journal of Nephrology*, 2006; 26: 1–11.
28. Long D.T, Voice T.C: Role of exposure analysis in solving the mystery of Balkan endemic nephropathy. *Medicinska Naklada Hrvatska, Croatian Medical Journal*, 2007; 48 (3): 300-11.
29. Stefanovic V, Radenkovic S, Cukuranovic R, Kostic S: Balkan Endemic Nephropathy: Slowed Progression of Kidney Disease by Avoidance of Etiological Factors. *Nephron*, 1999; 83: 85-86.
30. Bukvić D. First descriptions of endemic nephropathy. *Endemic Nephropathy, Overview of Investigations in Lazarevac area, Belgrade. Profesional Pen Co Belgrade*, 2004; 15–16.
31. Grollman AP, Jelakovic B. Role of Enviromental Toxins in Endemic (Balkan) Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2817-2823.
32. Ivković V, Karanović S, Fištrek Prlić M, Mišić M, Kos J, Jurić D, Vuković Lela I, Vitale K, Cvitković A, Laganović M, Fodor L, Edwards K, Grollman AP, Jelaković B. Is herbal tea consumption a factor in endemic nephropathy? *Eur J Epidemiol*. 2014; 29(3): 221-4.
33. Nortier J, Pozdzik A, Vanherweghem JL, Roumeguere T. Aristolochic acid nephropathy ("Chinese herb nephropathy"). *Nephrologie et Therapeutique*, 2015; 11(7): 574-588.
34. Kojić M, Janjić V. Osnovi herbologije. Institut za istraživanje u poljoprivredi „Srbija“ 1994.
35. Arlt VM, Stiborova M, Brocke J, Simoés ML, Lord GM, Nortier JL, Hollstein M, Phillips DH, Schmeiser HH. Aristolochic acid mutagenesis: molecular clues to the aetiology of Balkan endemicnephropathy-associated urothelial cancer. *Oxford University Press. Carcinogenesis* 2007; 28(11): 2253–2261.
36. Polevova, S.V. Ultrastructure and development of sporoderm in *Aristolochia clematitis* (Aristolochiaceae). *Review of Palaeobotany and Palynology*, 2015; 222: 104-115.
37. Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis*. 2002 Jul;17(4): 265-77.

38. Aleman CL, Noa M, Mas R, Rodeiro I, Mesa R, Menendez R, Gamez R, Hernandez C. Reference data for the principal physiological indicators in three species of laboratory animals. *Laboratory Animals* 2000; 34: 379-385.
39. Bukvić D, Janković S, Arsenović A, Djukanović Lj. Balkan Endemic Nephropathy is Still Present in the Kolubara Region, Serbia. *Renal Failure*, 2005; 27(5): 565-569.
40. Jankovic S, Bukvic D, Marinkovic, J, Jankovic J, Maric I, Djukanovic Lj. Trends in Incidence and Prevalence of Balkan Endemic Nephropathy in the Three Most Affected Villages in Serbia Over a 36-Year Period. *Renal Failure*, 2013; 35(4): 509-513.
41. Stefanovic V, Cukuranovic Rade, Miljkovic S, Marinkovic D, Toncheva D. Fifty Years of Balkan Endemic Nephropathy: Challenges of Study Using Epidemiological Method. *Renal Failure*, 2009; 31(5): 409-418.
42. Batuman, V. Fifty years of Balkan endemic nephropathy: daunting questions, elusive answers. . *Kidney International*, 2006; 69(4): 644-646.
43. Bui-Klimke T, Wu F. Evaluating Weight of Evidence in the Mystery of Balkan Endemic Nephropathy. *Risk Analysis: An International Journal*, 2014; 34(9): 1688-1705.
44. Djukanovic L, Stefanovic V, Basta-Jovanovic G, Bukvic D et al. Investigation of Balkan Endemic Nephropathy in Serbia: How to Proceed? *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 2010; 138(3-4): 256-261.
45. Stefanovic V, Polenakovic M, Toncheva D. Review: Urothelial carcinoma associated with Balkan endemic nephropathy. A worldwide disease. *Pathologie Biologie*, 2011; 59(5): 286-291.
46. Živčić-Ćosić S, Gržetić M, Valenčić M et al. Urothelial Cancer in Patients with Endemic Balkan Nephropathy (EN) after Renal Transplantation. *Renal Failure*, 2007; 29(7): 861-865.
47. Jankovic Velickovic Lj, Hattori T, Dolicanin Z et al. Upper urothelial carcinoma in Balkan endemic nephropathy and non-endemic regions: A comparative study of pathological features. *Pathology - Research and Practice*, 2009; 205(2): 89-96.
48. Wang SM, Lai MN, Chen PC, Wang JD. Increased risk of urothelial cancer in young and middle aged patients with end-stage renal disease. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2015; 114(1): 52-57.

49. Stefanovic V, Tončeva D, Atanasova S, Polenaković M: Etiology of Balkan Endemic Nephropathy and Associated Urothelial Cancer. *American Journal of Nephrology*, 2006; 26: 1–11.
50. Schmeiser HH, Hollstein M, Kucab JE, Arlt VM, Phillips DH et al. Evidence of exposure to aristolochic acid in patients with urothelial cancer from a Balkan endemic nephropathy region of Romania. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2012; 53(8): 636-64.
51. Cukuranovic R, Jovanovic I, Miljkovic S et al. Hemodialysis Treatment in Patients with Balkan Endemic Nephropathy: An Epidemiological Study. *Renal Failure*, 2007; 29(7): 805-810.
52. Jelakovic B, Nikolic J, Radovanovic Z, Nortier J, Cosyns JP, Grollman AP et al. Consensus statement on screening, diagnosis, classification and treatment of endemic (Balkan) nephropathy. *Nephrology dialysis transplantation*, 2014; 29(11): 2020-2027.
53. Grollman A.P, Jelakovic B : Role of environmental toxins in endemic (Balkan) nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2007; 18: 2817–2823.
54. Pavlinić I, Puntarić D, Bošnjir J, Lasić D, Barušić L, Jergović M. Determination of ochratoxin A in barley-Contribution to the mycotoxin hypothesis on the etiology of endemic nephropathy. *Medica Jadertina*, 2010, 40(3-4):59-65.
55. Voice T.C, Long D.T, Radovanovic Z et al. : Critical evaluation of environmental exposure agents suspected in the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Int J Occup Environ Health* 2006; 12: 369–376.
56. Stoev SD, Daskalov H, Radic B, Domijan AM, Peraica M. Spontaneous mycotoxic nephropathy in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxin aetiology. *Veterinary Research (France)*, 2002; 33(1): 83-93.
57. Stoev SD, Denev SA. Porcine/Chicken or Human Nephropathy as the Result of Joint Mycotoxins Interaction. *Toxins*, 2013; 5(9): 1503.
58. Brown AL, Odell EW, Mantle PG. DNA ploidy distribution in renal tumours induced in male rats by dietary ochratoxin A. *Exp Toxicol Pathol*, 2007; 59: 85–95.
59. Mantle P, Kulinskaya E, Nestler S. Renal tumourigenesis in male rats in response to chronic dietary ochratoxin A. *Food Addit Contam* 2005; 22(Suppl 1): 58–64.

60. Mally A, Hard GC, Dekant W. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: lessons from toxicity studies in rats. *Food Chem Toxicol*, 2007; 45: 2254–2260.
61. EC (European Commission), 1998. Opinion of the Scientific Committee for Food on ochratoxin A, expressed on 17 September 1998. Available from http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out14_en.html.
62. Pfohl-Leskowicz A, 2009. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 60, 465-483.
63. Pfohl-Leszkowicz A, Tozlovanu M, Manderville R, Peraica M, Castegnaro M and Stefanovic V. New molecular and field evidences for the implication of mycotoxins but not aristolochic acid in human nephropathy and urinary tract tumor. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007; 51: 1131-1146.
64. Feder GL, Radovanović Z, Finkelman RB. Relationship between weathered coal deposits and the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl*, 1991; 34: 9-11.
65. Orem WH, Feder GL, Finkelman RB. A possible link between Balkan endemic nephropathy and the leaching of toxic organic compounds from Pliocene lignite by groundwater: preliminary investigation. *International Journal of Coal Geology*, 1999; 40(2): 237-252.
66. Tatu CA, Orem WH, Finkelman RB, Feder GL. The Etiology of Balkan Endemic Nephropathy: Still More Questions than Answers. *Environmental Health Perspectives*, 1998; 106(11): 689-700.
67. Voice TC, McElmurry SP, Long DT, Dimitrov P, Ganey VS, Peptropoulos EA. Evaluation of the hypothesis that Balkan endemic nephropathy is caused by drinking water exposure to contaminants leaching from Pliocene coal deposits. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 2006; 16(6): 515-524.
68. Pavlovic NM, Orem WH, Tatu CA et al. The role of lecithin cholesterol acyltransferase and organic substances from coal in the etiology of Balkan endemic nephropathy: A new hypothesis. In *Food and Chemical Toxicology*, 2008; 46(3): 949-954.

69. Bunnell JE, Tatu CA, Lerch HE, Orem WH, Pavlovic N. Evaluating Nephrotoxicity of High-Molecular-Weight Organic Compounds in Drinking Water from Lignite Aquifers. *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A* , 2007; 70(24): 2089-2091.
70. Maharaj S, Orem W, Tatu C, Lerch H, Szilagyi D. Organic compounds in water extracts of coal: links to Balkan endemic nephropathy.. *Environmental Geochemistry & Health*, 2014; 36(1): 1-17.
71. Maharaj SVM. Limitations and plausibility of the Pliocene lignite hypothesis in explaining the etiology of Balkan endemic nephropathy. *Int J Occup Environ Health*, 2014; 20(1): 77–91
72. Ghahramani, N. Silica Nephropathy. *International Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 2010; 1(3): 108-115.
73. Mihailovic M, Lindberg P, Jovanovic I, Antic D. Selenium status of patients with Balkan endemic nephropathy. *Biological trace element research (USA)*, 1992; 33: 63-77.
74. Riquelme C, Escors D, Ortego J, Sanchez CM, Uzelac-Keserovic B, Apostolov K, Enjuanes L. Nature of the Virus Associated with Endemic Balkan Nephropathy. *Emerging Infectious Diseases*, 2002; 8(8): 869.
75. Long DT, Voice TC, Niagolova ND, McElmurry SP. Effects of human activities on karst groundwater geochemistry in a rural area in the Balkans. In *Applied Geochemistry*, 2012; 27(10): 1920-1931.
76. Vanherweghem J.L, Depierreux M, Tielemans C et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993; 341: 387–391.
77. Depierreux M, Van Damme B, Vanden Houte K et al. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *Am J Kidney Dis* 1994; 24: 172–180.
78. Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P et al. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 1994; 343: 174.
79. Pourrat J, Montastruc JL, Lacombe JL et al. Nephropathie associée à des herbes chinoises—2 cas. *Presse Med* ,1994; 23: 1669.

80. Pena J.M, Borrás M, Ramos J et al. :Rapidly progressive interstitial renal fibrosis due to a chronic intake of a herb (*Aristolochia pistolochia*) infusion. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1359–1360.
81. Vanherweghem JL. Misuse of herbal remedies: the case of an outbreak of terminal renal failure in Belgium (Chinese herbs nephropathy). *J Altern Complement Med*, 1998; 4: 9–13.
82. Chang C.H, Wang Y.M, Yang A.H et al. Rapidly progressive interstitialrenal fibrosis associated with Chinese-herbal medications. *Am J Nephrol* 2001; 21: 441–448.
83. Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP et al. Urothelial malignancy in nephropathy due to Chinese- herbs. *Lancet*, 1994; 344: 188.
84. Muniz Martinez MC, Nortier J, Vereerstraeten P et al. Progression rate of Chinese-herb nephropathy: impact of *Aristolochia fangchi* ingested dose. *Nephrol Dial Transplant*, 2002; 17: 408–412.
85. Nortier JL, Muniz Martinez MC, Schmeiser HH et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese-herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl JMed*, 2000; 342: 1686–1692.
86. De Broe ME. On a nephrotoxic and carcinogenic slimming regimen. *Am J Kidney Dis*, 1999; 33: 1171–1173.
87. Van Ypersele de Strihou C, Vanherweghem JL. The tragic paradigm of Chinese-herbs nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 1995; 10: 157–160.
88. Stengel B, Jones E. Insuffisance re´nale terminale associe´e a` la consommation d´herbes chinoises en France. *Nephrologie*, 1998; 19: 15–20.
89. Lord GM, Tagore R, Cook T et al. Nephropathy caused by Chinese-herbs in the UK. *Lancet*, 1999; 354: 481–482.
90. Tanaka A, Nishida R, Maeda K et al. Chinese herb nephropathy in Japan presents adult-onset Fanconi syndrome: could differentcomponents of aristolochic acids cause a different type of Chinese herb nephropathy? *Clin Nephrol*, 2000; 53: 301–306.
91. Tanaka A, Nishida R, Yoshida T et al. Outbreak of Chinese-herbnephropathy in Japan: are there any differences from Belgium? *Intern. Med*, 2001; 40: 296–300.
92. Gold LS, Slone TH. Aristolochic acid, an herbal carcinogen, sold on the Web after FDA alert. *N Engl J Med*, 2003; 349: 1576–1577.

93. Zhu M, Phillipson J.D. Hong Kong samples of the traditional Chinese medicine 'Fang ji' contain aristolochic acid toxins. *Int J Pharmacognosy* 1996; 34: 283–289.
94. Lo SH, Mo KL, Wong KS et al. Aristolochic acid nephropathy complicating a patient with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 2004; 19: 1913–1915.
95. Laing C, Hamour S, Sheaff M et al. : Chinese-herbal uropathy and nephropathy. *Lancet* 2006; 368: 338.
96. Poon WT, Lai CK, Chan A. Aristolochic acid nephropathy: the Hong Kong perspective. *Hong Kong J Nephrol*, 2007; 9: 7–14.
97. Yang L, Li X, Wang H. Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis. *Nephrol Dial Transplant*, 2007; 22: 445–456.
98. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007;104: 12129–12134.
99. Stefanovic V, Polenakovic M.H. Balkan nephropathy. Kidney disease beyond the Balkans? *Am J Nephrol*, 1991; 11: 1–11.
100. Ivic M. Etiology of endemic nephropathy. *Lijec Vjesn* 1969; 91: 1273–1281.
101. Hranjec T, Kovač A, Kos J, Wenyang M, Chen JJ, Grollman AP, Jelaković B. Endemic Nephropathy: the Case for Chronic Poisoning by Aristolochia. *Croatian Medical Journal*, 2005; 46(1): 116-125.
102. Gökmen MR, Cosyns JP, Arlt VM, Stiborová M, Phillips DH, Schmeiser HH, Simmonds MSJ, Cook T, Vanherweghem JL, Nortier JL, Lord GM. The Epidemiology, Diagnosis, and Management of Aristolochic Acid Nephropathy. *Annals of Internal Medicine*, 2013; 158(6): 469-477.
103. Debelle FD, Vanherweghem JL, Nortier JL. Aristolochic acid nephropathy: A worldwide problem. *Kidney International*, April 2008; 74, 158–169.
104. de Jonge H, Vanrenterghem Y. Aristolochic acid: the common culprit of Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2008; 23(1): 39-39.
105. Stiborová M, Frei E, Arlt VM, Schmeiser HH. Metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid, a risk factor for Balkan endemic nephropathy. *Elsevier, Amsterdam Mutation Research*, 2008; 658 (1-2): 55-67.

106. Luciano RL, Perazella MA. Aristolochic acid nephropathy: epidemiology, clinical presentation, and treatment. *Drug Safety*, 2015; 38(1): 55-65.
107. Anandagoda N, Lord GM. Preventing aristolochic acid nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2015; 10(2):167-168.
108. Kabanda A, Jadoul M, Lauwerys R et al. Low molecular weight proteinuria in Chinese-herbs nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48: 1571–1576.
109. Vanherweghem JL, Abramowicz D, Tielemans C et al. Effects of steroids on the progression of renal failure in chronic interstitial renal fibrosis: a pilot study in Chinese-herbs nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 1996; 27: 209–215.
110. Tsai CS, Chen YC, Chen HH et al. An unusual cause of hypokalemic paralysis: aristolochic acid nephropathy with Fanconi syndrome. *Am J Med Sci* 2005; 330: 153–155.
111. Colson CR, De Greef KE, Duymelinck C et al. Role of serotonin in the development of Chinese-herbs nephropathy? *Nephrol Dial Transplant*, 1999; 14(Suppl 4): 16.
112. Debelle F, Nortier J, Arlt VM et al. Effects of dexfenfluramine on aristolochic acid nephrotoxicity in a rat model for Chinese-herb nephropathy. *Arch Toxicol*, 2003; 77: 218–226.
113. Debelle FD, Nortier JL, Husson CP et al. The renin–angiotensin system blockade does not prevent renal interstitial fibrosis induced by aristolochic acids. *Kidney Int*, 2004; 66: 1815–1825.
114. Hsin YH, Cheng CH, Tzen JT et al. Effect of aristolochic acid on intracellular calcium concentration and its links with apoptosis in renal tubular cells. *Apoptosis*, 2006; 11: 2167–2177.
115. Schmeiser HH, Bieler CA, Wiessler M et al. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese-herbs nephropathy. *Cancer Res*, 1996; 56: 2025–2028.
116. Lebeau C, Arlt V.M, Schmeiser H.H et al. : Aristolochic acid impedes endocytosis and induces DNA adducts in proximal tubule cells. *Kidney Int*, 2001; 60: 1332–1342.
117. Arlt VM, Pfohl-Leszkowicz A, Cosyns J et al. : Analyses of DNA adducts formed by ochratoxin A and aristolochic acid in patients with Chinese-herbs nephropathy. *Mutat Res* 2001; 494: 143–150.

118. Liu Z, Hergenhahn M, Schmeiser H.H et al. Human tumor p53 mutations are selected for in mouse embryonic fibroblasts harboring a humanized p53 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2963–2968.
119. Feldmeyer N, Schmeiser H.H, Muehlbauer K.R 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: 163–168.
120. Lord GM, Hollstein M, Arlt V.M et al. DNA adducts and p53 mutations in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 2004; 43: 11–17.
121. Stiborova M, Frei E, Hodek P et al. Human hepatic and renal microsomes, cytochromes P450 1A1/2, NADPH: cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthase mediate the formation of aristolochic acid-DNA adducts found in patients with urothelial cancer. *Int J Cancer*, 2005; 113: 189–197.
122. Xiao Y, Ge M, Xue X, Wang C, Wang H, Wu X, Li L, Liu L, Qi X, Zhang Y, Li Y, Luo H, Xie T, Gu J, Ren J. Hepatic cytochrome P450s metabolize aristolochic acid and reduce its kidney toxicity. *Kidney International March*, 2008; 73: 1231–1239.
123. Levová K, Moserová M, Kotrbová V, Sulc M, Henderson CJ, Wolf CR, Phillips DH, Frei E, Schmeiser HH, Mares J, Arlt VM, Stiborová M. Role of cytochromes P450 1A1/2 in detoxication and activation of carcinogenic aristolochic acid I: studies with the hepatic NADPH:cytochrome P450 reductase null (HRN) mouse model. *Oxford University Press, An Official Journal Of The Society Of Toxicology*, 2011; 121 (1): 43-56.
124. Okada H, Watanabe Y, Inoue T et al. Transgene-derived hepatocyte growth factor attenuates reactive renal fibrosis in aristolochic acid nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2515–2523.
125. Gong R, Rifai A, Tolbert E.M, Centracchio J.N, Dworkin L.D. Hepatocyte Growth Factor Modulates Matrix Metalloproteinases and Plasminogen Activator/Plasmin Proteolytic Pathways in Progressive Renal Interstitial Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003; 14: 3047–3060.
126. Arlt VM, Schmeiser HH, Pfeifer GP. Sequence-specific detection of aristolochic acid–DNA adducts in the human p53 gene by terminal transferase-dependent PCR. *Carcinogenesis*, 2001; 22: 133–140.

- 127.Chan W, Cui L, Xu G et al. Study of the phase I and phase II metabolism of nephrotoxin aristolochic acid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006; 20: 1755–1760.
- 128.Trujillo WA, Sorenson WR, La LP et al. Determination of aristolochic acid in botanicals and dietary supplements by liquid chromatography with ultraviolet detection and by liquid chromatography/mass spectrometry: single laboratory validation confirmation. *J AOAC Int* 2006; 89: 942–959.
- 129.Hsieh SC, Huang MF, Lin BS et al. Determination of aristolochic acid in Chinese-herbal medicine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 2006; 1105: 127–134.
- 130.Pozdzik A, Salmon I.J, Debelle F.D et al. Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney Int*, 2008; 73: 595–607
- 131.Lebeau C, Debelle FD, Arlt VM et al. Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies. *Nephrol Dial Transplant*, 2005; 20: 2321–2332.
- 132.Balachandran P, Wei F, Lin RC et al. Structure activity relationships of aristolochic acid analogues: toxicity in cultured renal epithelial cells. *Kidney Int*, 2005; 67: 1797–1805.
- 133.Vanherweghem JL. Association of valvular heart disease with Chinese-herbnephropathy. *Lancet* 1997; 350: 1858.
- 134.Unger P, Nortier J, Muniz Martinez M.C et al. High prevalence off enfluramine-related aortic regurgitation in women with end-stage renal disease secondary to Chinese-herb nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 2003; 18: 906–910.
- 135.Mead JC. Manna From Hell. *The Scientist* November, 2007; 21(11); 44.
- 136.Nortier JL, Vanherweghem JL. For patients taking herbal therapy—lessons from aristolochic acid nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 2007; 22: 1512–1517.
- 137.Ruichao X, Zhao F, Meixia Z, Zhenghui Y, Chengping W, and Tieliu S. TCMID: traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan; 41(Database issue): D1089–D1095.
- 138.World Health Organization. International Agency for research on cancer: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans—some traditional herbal

- medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Press, Lyon, France 2002; 82: 118.
139. Lewis CJ, Alpert S. Letter to Health Care Professionals—FDA Concerned About Botanical Products, Including Dietary Supplements, Containing Aristolochic Acid. US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Nutritional Products, Labeling, and Dietary Supplements. May 31, 2000.
140. Krumbiegel G, Hallensleben J, Mennicke W.H et al. Studies on the metabolism of aristolochic acids I and II. *Xenobiotica* 1987; 17: 981–991.
141. Stiborova M, Frei E, Wiessler M et al. Human enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acids: evidence for reductive activation by cytochromes P450 1A1 and 1A2. *Chem Res Toxicol*, 2001; 14: 1128–1137.
142. Shibutani S, Dong H, Suzuki N et al. : Selective toxicity of aristolochic acids I and II. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1217–1222.
143. Arlt VM, Stiborova M, Schmeiser HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review, *Mutagenesis*, 2002; 17: 265–277.
144. Stiborová M, Frei E, Schmeiser H.H: Biotransformation enzymes in development of renal injury and urothelial cancer caused by aristolochic acid: *Kidney International*, 2008; 73: 1209–1211.
145. Nortier JL, Marie-Carmen MM, Schmeiser HH, Arlt VM. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *The New England Journal of Medicine* US, 2000; 342 (23): 1686-92.
146. Lemy A, Wissing KM, Rorive S et al. Late onset of bladder urothelial carcinoma after renal transplantation for end-stage aristolochic acid nephropathy: a case series with 15-year follow-up. *Am J Kidney Dis*, 2008; 51: 471–477.
147. Mengs U. Acute toxicity of aristolochic acid in rodents. *Arch Toxicol*, 1987; 59: 328–331
148. Mengs U, Stotzem CD. Renal toxicity of aristolochic acid in rats as an example of nephrotoxicity testing in routine toxicology. *Arch Toxicol* 1993; 67: 307–311.
149. Mengs U, Stotzem CD. Toxicity of aristolochic acid - a subacute study in male rats. *Med Sci Res*, 1992; 20: 223–224.

150. Cosyns JP, Goebbels RM, Liberton V et al. Chinese herbs nephropathy associated slimming regimen induces tumours in the forestomach but no interstitial nephropathy in rats. *Arch Toxicol*, 1998; 72: 738–743.
151. Debelle FD, Nortier JL, Prez EG, Garbar CH, Vienne AR, Salmon IJ, Deschodt-Lanckman MM, Vanherweghem JL. Aristolochic Acids Induce Chronic Renal Failure with Interstitial Fibrosis in Salt-Depleted Rats. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2002; 13: 431–436.
152. Sato N, Takahashi D, Chen SM et al. Acute nephrotoxicity of aristolochic acids in mice. *J Pharm Pharmacol*, 2004; 56: 221–229.
153. Ardalan MR. Herbs and hazards: risk of aristolochic acid nephropathy in Iran. *Iranian journal of kidney diseases*, 2015; 9(1): 14-7.
154. González F, Ospina JC, Zanotti C. Synopsis and taxonomic novelties of the family Aristolochiaceae for Argentina. *Darwiniana*, 2015; 3(1): 38-64.
155. Do TV, Wanke S, Neinhuis C, Pooma R. *Aristolochia phuphathanaphongiana* sp. nov. from southwestern Thailand. *Nordic Journal of Botany*, 2015; 33(5): 567–71.
156. Içim A, Behçet L, Tosunoğlu A. *Aristolochia altanii* (Aristolochiaceae), a new species from Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 2015; 39(5): 835-40.
157. Do TV, Wanke S, Neinhuis C, Nguyen DQ, Nguyen TQT. *Aristolochia cochinchinensis* (Aristolochiaceae), a New Species from Southern Vietnam. *Annales Botanici Fennici*, 2015; 52(3-4): 268-73.
158. Wu L, Xu WB, Liu Y, Wei GF. *Aristolochia huanjiangensis* (Aristolochiaceae), a New Species from Guangxi, China. *Annales Botanici Fennici*, 2013; 50(6): 413-16.
159. De Broe, Marc E. Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy. *Kidney International*, 2012; 81(6): 513-515.
160. Grollman P, Scarborough J, Jelaković B. Aristolochic acid nephropathy: an environmental and iatrogenic disease. *Adv Mol Toxicol* 2009; 3: 211-226.
161. Pepeljnjak S, Klaric MS. "Suspects" in Etiology of Endemic Nephropathy: Aristolochic Acid versus Mycotoxins. *Toxins*, 2010; 2(6): 1414-1427.