

## Ispitivanje sadržaja teških metala u podzemnim vodama kao mogućeg uzroka balkanske endemske nefropatije u selu Miloševac

---

*Balkanska endemska nefropatija (BEN) je hronična bolest bubrega za sada nepoznate etiologije. Mnogi faktori su predloženi kao njeni uzročnici (uključujući viruse, bakterije, mikotoksine, industrijsko zagađenje, radioaktivna jedinjenja, itd), ali nijedan od njih nije potvrđen. Prema savremenim radovima postoje tri verovatna uzročnika ove bolesti: aristolohinska kiselina (AA – alkaloid biljke Aristolochia clematitis, poznata kao vučja stopa), ohratoksin A (OTA – mikotoksin iz plesni roda Aspergillus i Penicillium) i neki metali iz vode za piće kao što su kadmijum i olovo. Na endemskom području u dolini Velike Morave, selo Miloševac, anketirani su oboleli od BEN-a i urađena su hemijska ispitivanja koncentracije teških metala (Pb, Cd, Zn, Cu, Mn, Fe, Co, Ni) u uzorcima vode iz bunara u njihovim domaćinstvima. Prema rezultatima ankete ne postoji osnov prema kome bi se aristolohinska kiselina i ohratoksin A iz hrane mogli smatrati uzročnicima endemske nefropatije u ispitivanom endemskom području, kao ni teški metali iz vode, kojih je, sa izuzetkom nikla u dva kopana bunara i mangana u jednom, bilo u dozvoljenim koncentracijama.*

---

### Uvod

Balkanska endemska nefropatija (BEN) je hronična bolest bubrega za sada nepoznate etiologije, koja je opisana prvi put pre skoro 50 godina. Mnogi faktori su predloženi kao njeni

uzročnici (uključujući viruse, bakterije, mikotoksine, industrijsko zagađenje, radioaktivna jedinjenja, itd), ali nijedan od njih nije potvrđen.

Balkanska nefropatija je hronično tubulointersticijalno oboljenje bubrega koje je geografski ograničeno na zemlje Balkanskog poluostrva (centralna i jugoistočna Srbija, jugozapadna Rumunija, severozapadna Bugarska, jugoistočna Hrvatska, u delovima Bosne i na Kosovu). Ovo oboljenje dovodi do progresivnog nepovratnog propadanja bubrežnog tkiva koje vodi potpunoj zavisnosti pacijenata od lečenja dijalizom. Balkansku nefropatiju često prati i karcinom gornjih partija urinarnog trakta (Maharaj *et al.* 2013).

Prema radu Slade i saradnika iz 2009. godine, epidemiološka, patološka, klinička i biohemijska ispitivanja potvrđuju da je aristolohinska kiselina (AA – alkaloid biljke *Aristolochia clematitis*, u narodu poznata kao vučja stopa) glavni faktor rizika za endemsku nefropatiju.

Prema radu Yordanova i saradnika, iz 2010. godine, ohratoksin A (OTA – mikotoksin iz plesni roda *Aspergillus* i *Penicillium*) predstavlja rizik za razvoj bolesti, a kod pacijenata obolelih od endemske nefropatije se taj rizik povećava.

Veće koncentracije Pb, Mn, Cu i Cd, bi mogle imati značaj u etiologiji balkanske endemske nefropatije. Nedostatak cinka u tom području može imati ulogu u pojavi ove bolesti (Orem *et al.* 2002).

Jedno od endemskih područja za balkansku nefropatiju je u slivu Velike Morave, atar sela Miloševac. Ovo područje pripada teritoriji opštine Velika Plana, udaljeno je 90 km jugoistočno od Beograda i 10 km severno od Velike Plane.

Cilj istraživanja je ispitivanje prisustva teških metala u podzemnim vodama, sa mogućim nefrotoksičnim dejstvom, odgovornih za nastanak

---

*Ljubica Milanović (1998), Smederevska Palanka, Kralja Petra Prvog br. 6/8, učenica 4. razreda Prve kragujevačke gimnazije*

*MENTOR: Dr Dejan Grujić, lekar, specijalista kliničke biohemije, šef odeljenja za laboratorijsku dijagnostiku, Dom zdravlja Novi Kneževac*

balkanske endemske nefropatije kod stanovnika sela Miloševac. Zadatak je bio da se ustanove koncentracije određenih metala (Pb, Cd, Zn, Cu, Mn, Fe, Co, Ni) u pijaćoj vodi u tim domaćinstvima, što bi imalo značaja u daljnim ispitivanjima i otkrivanju uzročnika BEN-a.

## Metode

Istraživanje je sprovedeno u periodu od 25. jula do 30. avgusta 2016. godine primenom osnovnih hidrohemijskih metoda kroz terenski, laboratorijski i kabinetski rad.

Tokom obilaska terena koji je sproveden u periodu od 25. do 30. jula 2016. god. registrovana su domaćinstva u kojima žive stanovnici oboleli od BEN-a. Oboleli stanovnici su intervjuisani uz pomoć prethodno pripremljene ankete koja sadrži 80 pitanja odvojenih u dve grupe. Prva grupa pitanja odnosila se na lične podatke ispitanika, dok se druga grupa pitanja odnosila na uslove života, životne navike, izbor vode za piće i izloženost štetnim agensima koji mogu biti potencijalni uzročnici BEN-a. Na terenu je vršeno i uzorkovanje podzemnih voda za hemijsku analizu.

Sakupljeno je ukupno 8 uzoraka podzemnih voda od kojih je sedam uzoraka uzeto iz kopanih bunara u domaćinstvima gde žive oboleli od BEN-a, a jedan uzorak iz arterskog bunara u centru sela. U prikupljenim uzorcima vode vršeno je određivanje koncentracije teških metala (olova, kadmijuma, cinka, bakra, mangana, gvožđa, kobalta, nikla). Koncentracije teških metala određivane su metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije u uzorcima koji su prethodno pet puta koncentrovani uparavanjem.

## Rezultati i diskusija

### Rezultati ankete obolelih od endemske nefropatije

Tokom istraživanja registrovano je i anketirano ukupno deset stanovnika sela Miloševac koji su oboleli od BEN-a, od toga 4 muškarca i 6 žena. Ispitanici su prosečne starosti od 60.5 godina (od 44 do 77 godina). Kod ispitanika bolest traje u proseku 4 godine (od 1 godine do 7 godina). Četiri ispitanika je navelo da je bolest

prisutna i kod njihove rodbine u krvnom srodstvu, na istom području, ili kod supružnika (u dva slučaja). Četiri ispitanika navelo je da, pored BEN-a, ima ili je imalo još neko oboljenje urinarnog trakta (bubrežna cista, upala bešike, upala mokraćnih puteva). Samo je troje ispitanika rođeno u Miloševcu, ali svi, osim jednog ispitanika koji se doselio iz Uroševca (sa drugog endemskog područja), tu žive duže od dvadeset godina.

Ni jedan od ispitanika ne konzumira čaj od vučje stope (*Aristolochia Clematidis*).

U toku prethodnih trideset godina svi ispitanici su nekada imali obradivu zemlju i domaće životinje. Sada dva ispitanika nema ni njive ni domaće životinje. Oranice su im uglavnom pored reke Velike Morave i događa se da budu poplavljene. Na pitanje o količini sredstava za zaštitu bilja ispitanici su odgovorili da ili ne koriste ili imaju jedno do dva tretiranja, što govori da se radi o umerenom korišćenju pesticida, kako sada tako i pre 30 godina. Rezultati ankete ukazuju da je ubiranje letine, skladištenje i meljava uobičajena za, kako endemska, tako i za neendemska područja. Vreme čuvanja žitarica je uglavnom do godinu dana. U poslednjih 30 godina šest ispitanika je navelo da je nekoliko puta imalo plesan na uskladištenim žitaricama. Polovina ovih ispitanika je takve žitarice bacala, polovina ih je koristila kao stočnu hranu. Ispitanici navode da se do pre oko 30 godina brašno od žita sa sopstvenih njiva koristilo za pripremu hrane u domaćinstvu, dok danas koriste industrijsko brašno. Kao hrana za stoku koriste se žitarice sa sopstvenih njiva.

Pre 30 godina njih sedmoro je mleko dobijalo od svojih krava, a troje je kupovalo u prodavnici, a sada svi kupuju u prodavnici. Meso svi konzumiraju, a njih osmoro dobijaju od svoje stoke, kako danas tako i pre 30 godina.

S obzirom da u selu nije razvijena vodovodna mreža sva domaćinstva imaju sopstvene bunare. Kopani bunari su prosečne dubine oko 12 m (od 8 do 18 m) i osnovni su izvor vodosnabdevanja u selu. Vodu za piće koriste svi sa svojih bunara uz upotrebu hidrofora. U selu nema ni kanalizacione mreže. Sva domaćinstva imaju higijenske uslove za život sa mokrim čvorom, izdvojenim ekonomskim dvorištima i adekvatnim objektima za stoku i čuvanje žitarica.

Ispitanicima su pokazane fotografije nekih korova i njihovog semena. Ambroziju je prepo-

znalo tri ispitanika, a vučju stopu njih petoro. Seme ovih korova niko nije prepoznao, što navodi na zaključak da im se nije pojavljivalo u kombajniranim žitaricama.

Tokom obilaska terena, na neobradivim površinama atara sela Miloševac uočena je velika rasprostranjenost biljke *Aristolochia Clematitis*.

## Rezultati hemijske analize podzemnih voda

Koncentracije ispitivanih teških metala u uzorcima podzemnih voda u selu Miloševac prikazani su u tabeli 1.

– U svim uzorcima vode detektovane koncentracije olova su niže od maksimalne dozvoljene koncentracije u vodi za piće (Sl. list SRJ, br. 42/98 i 44/99) koja iznosi 0.01 mg/dm<sup>3</sup>.

– Maksimalna dozvoljena koncentracija kadmijuma u vodi za piće iznosi 0.003 mg/dm<sup>3</sup> (Sl. list SRJ, br. 42/98 i 44/99). Ni u jednom od ispitivanih uzoraka kadmijum nije detektovan.

– Maksimalna dozvoljena koncentracija cinka u vodi za piće iznosi 3 mg/dm<sup>3</sup> (Sl. list SRJ, br. 42/98 i 44/99). U ispitivanim uzorcima, najviša koncentracija cinka je 0.4302 mg/dm<sup>3</sup>, a najniža detektovana je 0.0016 mg/dm<sup>3</sup>, što znači od sedam do hiljadu osamstotina puta manje od maksimalno dozvoljenog. Ovako niske koncentracije cinka u vodi za piće dobijene su i kod rumunskih istraživača (Orem *et al.* 2002) na njihovom endemskom području, što ih je navelo na zaključak da nedostatak cinka u vodi može imati ulogu u pojavi BEN-a, bez obzira što postoje drugi izvori ovog elementa u ishrani, jer i biljke

sa ovog područja evidentno pate od nedostatka cinka.

– Maksimalna dozvoljena koncentracija bakra u vodi za piće iznosi 2 mg/dm<sup>3</sup> (Sl. list SRJ, br. 42/98 i 44/99). U ispitivanim uzorcima detektovane koncentracije bakra su od 0.021 do 0.042 mg/dm<sup>3</sup>.

– Maksimalna dozvoljena koncentracija mangana u vodi za piće je 0.05 mg/dm<sup>3</sup> (Sl. list SRJ, br. 42/98 i 44/99). U šest ispitivanih uzoraka mangan nije detektovan. U uzorku br. 1 detektovana koncentracija mangana bila je ispod granice maksimalno dozvoljenog, a u uzorku br. 2 daleko viša, iznosila je čak 0.975 mg/dm<sup>3</sup>, što je skoro dvadeset puta više od maksimalno dozvoljene koncentracije. Povišen sadržaj mangana u vodama najčešće proističe iz sastava zemljišta na kom su bunari kopani. S obzirom da je kod bunara 2 dobijena vrednost značajno veća nego kod ostalih uzoraka voda, pretpostavlja se da je uzročnik povećane koncentracije mangana raspad materije u pomenutom bunaru, nekog ostatka drveta (panj ili korenje) ili iz zaostalog drveta prilikom kopanja bunara. Generalno se ne preporučuje upotreba voda za piće koje imaju povišen sadržaj mangana jer se on povezuje sa velikim brojem bolesti, najčešće sa Alchajmerovom bolesti. Ovako visoka koncentracija mangana sigurno da ima svojih negativnih posledica po zdravlje ljudi, ali je pronađena samo u jednom bunaru, tako da ne predstavlja dokaz o ulozi mangana u pojavi BEN-a.

– Maksimalna dozvoljena koncentracija gvožđa u vodi za piće je 0.3 mg/dm<sup>3</sup> (Sl. list SRJ, br.

Tabela 1. Koncentracije teških metala u uzorcima vode ispitivanih osam bunara u selu Miloševac

Metal	Koncentracija [mg/dm <sup>3</sup> ]							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Pb	0.00362	0.0000	0.00160	0.00000	0.00322	0.00000	0.00000	0.00638
Cd	0.00000	0.0000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Zn	0.03384	0.2636	0.43018	0.16664	0.03928	0.17894	0.00164	0.00428
Cu	0.03978	0.03094	0.04096	0.03040	0.02860	0.04226	0.02080	0.02746
Mn	0.01940	0.97458	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
Fe	0.00000	0.00000	0.01936	0.03534	0.00000	0.00000	0.00250	0.00000
Co	0.03096	0.02990	0.02240	0.02516	0.02128	0.02314	0.01642	0.01826
Ni	0.01884	0.02184	0.00808	0.01846	0.01558	0.01272	0.02688	0.01256

42/98 i 44/99). U pet ispitivanih uzoraka gvožđe nije detektovano. U uzorcima broj 3, 4 i 7 detektovane koncentracije su ispod dozvoljenog maksimuma.

– Prema srpskom standardu (Sl. list SRJ, br. 42/98 i 44/99) ne postoji maksimalno dozvoljena koncentracija kobalta u vodi za piće, ali u istom standardu u tabeli maksimalno dopuštenih koncentracija hemijskih supstanci u flaširanoj prirodnoj vodi za piće stoji da kobalta ne sme da ima. Prema američkom standardu Drinking Water and Groundwater Quality Standards / Advisory Levels (WI DNR), maksimalno dozvoljena količina kobalta u vodi za piće je  $0.04 \text{ mg/dm}^3$ . U svih osam ispitanih uzoraka detektovana je koncentracija kobalta od  $0.0164$  do  $0.0310 \text{ mg/dm}^3$ . Prema ovim rezultatima voda sa ovog područja ne bi smela da se flašira, ali može da se konzumira.

– Dozvoljene količine nikla u vodi za piće su  $0.02 \text{ mg/dm}^3$  (Sl. list SRJ, br. 42/98 i 44/99). U šest ispitanih uzoraka nikl je ispod granice maksimalno dozvoljene koncentracije. Uzorak bunara broj 2 ( $0.0218 \text{ mg/dm}^3$ ) i 7 ( $0.0269 \text{ mg/dm}^3$ ) imaju višu koncentraciju nikla od zakonom dozvoljenog maksimuma u vodi za piće. Nikl je pronađen u blago povišenoj koncentraciji samo u dva uzorka, što nije dovoljno da bi se njegova prekomerna koncentracija povezala sa pojavom endemske nefropatije.

Na osnovu koncentracije ispitivanih metala (Pb, Cd, Zn, Cu, Mn, Co, Ni) vode iz bunara 1, 3, 4, 5, 6, i 8 zadovoljavaju zakonom propisane kriterijume za vodu za piće. Voda iz bunara br. 7 ima povišenu koncentraciju nikla ( $0.27 \text{ mg/dm}^3$ ), a voda iz bunara br. 2 sadrži visoke koncentracije mangana ( $0.98 \text{ mg/dm}^3$ ) i nikla ( $0.022 \text{ mg/dm}^3$ ).

## Zaključak

Analizom ankete došlo se do zaključka da su mesto življenja i genetička predispozicija verovatni uslovi za pojavu balkanske endemske nefropatije bez obzira na pol i mesto rođenja, što potvrđuju nalazi u radu Čukuranovića sa saradnicima 2004, u kome su ispitivani genetički aspekti balkanske endemske nefropatije.

Aristolohinska kiselina po Sladeu i saradnicima iz 2009. može da bude uzročnik ove bolesti, tako što preko semena biljke *Aristolochia clematitis* čiji je alkaloid dospeva u brašno koje stanovništvo konzumira. Ovo istraživanje je potvrdilo da se hronično trovanje aristolohinskom kiselinom preko brašna ne može smatrati mehanizmom nastanka balkanske endemske nefropatije u selu Miloševac, jer oboleli stanovnici koriste industrijsko brašno.

Istraživanje je takođe ukazalo da je retka pojava plesni na uskladištenim žitaricama, što upućuje na zaključak da ni izloženost ohratoksinu A nije veća nego kod drugih stanovnika Srbije. Plesnive žitarice stanovnici ne koriste u svojoj ishrani, ali s obzirom da je koriste u ishrani stoke postoji mogućnost trovanja ohratoksinom A preko mleka i mesa. Anketirani meštani piju samo industrijsko mleko, tako da bi dopunska istraživanja trebalo da ispitaju mogućnost trovanja ohratoksinom A samo preko mesa.

Istraživanjem je potvrđeno da u podzemnim vodama ispitivanog područja nisu uniformno prisutne povišene koncentracije teških metala (Pb, Cd, Zn, Cu, Mn, Fe, Co, Ni), pa se hronično trovanje teškim metalima preko vode za piće ne može smatrati uzrokom pojave balkanske endemske nefropatije.

Ako su uzročnici aristolohinska kiselina i ohratoksin A, a u organizam obolelih ne ulaze preko hrane, trebalo bi ih tražiti u pijaćoj vodi bez obzira na koncentraciju, jer se zna da samo dugotrajna izloženost (preko 20 godina boravka na endemskom području) dovodi do oboljenja. Ovo upućuje na to da bi dalja ispitivanja u traganju za uzročnicima balkanske nefropatije trebalo i dalje tražiti u vodi za piće.

**Zahvalnost.** Iskreno se zahvaljujem mentoru Dr Dejanu Grujiću na nesebičnoj pomoći, sugestijama, strpljenju i podršci. Zahvaljujem se i Ljubici Perić i Nini Jevtić, rukovodiocima programa hemije, kao i Milenku Trijiću i Snežani Savić, saradnicima na programu geonauka. Zahvaljujem se meštanima sela Miloševac na njihovom izdvojenom vremenu u razgovoru sa mnom.

## Literatura

Agencija za konstatling EKOPLAN 2010. Katastar загаđivača opštine Velika Plana. Beograd: Ekoplan

Sl. list SRJ. *Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće*. Sl. list SRJ, br. 42/98 i 44/99.

Čukuranović R., Marinković D., Pavlović S., Vasović Lj., Vlajković S., Daković-Bjelaković M., Stojanović V., Jovanović I., Ugrenović S., Zdravković D. 2004. Populaciono – genetički aspekti balkanske endemske nefropatije u slivu Južne Morave. *Acta Medica Mediana*, **43** (1): 11.

Maharaj S. V. M., Orem W. H., Tatu C. A., Lerch H. E., Szilagyi D. N. 2013. Organic compounds in water extracts of coal: links to Balkan endemic nephropathy. *Environmental Geochemistry and Health*, **36** (1): 1-17.

Slade N., Moll V., Brdar B., Zorić A., Jelaković B. 2009. p53 mutations as fingerprints for aristolochic acid – an environmental carcinogen in endemic (Balkan) nephropathy. *Mutation Research*, **663** (1-2): 1.

Yordanova P., Wilfried K., Tsoлова S., Dimitrov P., 2010. Ochratoxin A and  $\beta_2$ -microglobulin in BEN Patients and Control. *Toxin* (Basel), **2** (4): 780.

Orem W. H., Tatu C. A., Feder G. L., Finkelman R. B., Herch H. E., Maharaj S. V. M., Szilagyi D., Dumitrascu V., Paunescu V., Margineanu F. 2002. Environment, geochemistry and etiology of Balkan endemic nephropathy: Lessons from Romania. *Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology*, **9** (1): 39.

WI DNR. *Drinking Water and Groundwater Quality Standards / Advisory Levels*. Wisconsin Department of Natural Resources

---

Ljubica Milanović

## Determination of Heavy Metal Levels in Groundwater as Possible Cause of Balkan Endemic Nephropathy in the Village Miloševac (Velika Plana)

Balkan endemic nephropathy (BEN) is a fatal chronic kidney disease of unknown etiology. Many factors have been suggested as its agents (including viruses, bacteria, mycotoxins, industrial pollution, radioactive compounds etc.), but none of these have been confirmed. According to contemporary works, there are three probable causes of this disease: aristolochic acid (AA – alkaloid plants *Aristolochia clematitis*, popularly known as Wolf feet), ochratoxin A (OTA – a mycotoxin from the mold of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*) and some metals from drinking water.

In the endemic area, in the valley of Velika Morava, village Miloševac, respondents who were BEN patients were interviewed and the chemical analysis of the concentration of heavy metals (Pb, Cd, Zn, Cu, Mn, Fe, Co, and Ni) in water samples from wells in their households were performed. According to the research results, aristolochic acids and ochratoxin A in food are not the causes of endemic kidney disease, nor are the heavy metals in water, which – with the exception of nickel in two wells and manganese in one – are present in allowed concentrations.

