

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
Departamentul III - Științe funcționale

DRĂGHIA M.-I. LAVINIA-PAULA



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
VICTOR BABEȘ | TIMIȘOARA

TEZĂ DE DOCTORAT

**ROLUL FACTORILOR DE MEDIU IMPLICAȚI ÎN
ETIOLOGIA MULTIFACTORIALĂ A BOLILOR
CRONICE DE RINICHI**

REZUMAT

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. PĂUNESCU VIRGIL

Timișoara
2020

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VI
Lista abrevierilor	VII
Indexul figurilor	X
Indexul tabelelor	XI
Mulțumiri.....	XII
INTRODUCERE	XIII

PARTEA GENERALĂ..... 1

1. BOLILE CRONICE DE RINICHI (CKD) 1

1.1 Aspectele generale ale CKD.....	1
1.2 Cauzele CKD.....	1
1.3 Factorii de risc ai CKD.....	3
1.4 Clasificarea bolilor cronice de rinichi de etiologie necunoscută.....	4

2. NEFROPATIA ENDEMICĂ BALCANICĂ (BEN)..... 6

2.1 Aspectele generale ale BEN	6
2.2 Caracteristicile clinice si patologice	8
2.3 Etiologia multifactorială a BEN.....	9
2.4 Căi de expunere. Implicarea factorilor de mediu în etiologia BEN	11
2.4.1 Calea acizilor aristolochici.....	12
2.4.2 Calea sol - <i>Aristolochia clematitis</i> L.....	13
2.4.3 Calea sol - plantă cultivată	14
2.4.4 Calea sol - <i>Aristolochia clematitis</i> L. - apă.....	14
2.4.5 Calea lanțului trofic	15
2.4.6 Calea sol – <i>Aristolochia clematitis</i> L. - aer.....	16

3. ACIDUL ARISTOLOCHIC (AA) – PRINCIPALUL FACTOR ETIOLOGIC AL BEN..... 17

3.1 Familia <i>Aristolochiaceae</i>	17
3.2 Utilizările terapeutice ale plantelor din Familia <i>Aristolochiaceae</i>	18
3.3 <i>Aristolochia clematitis</i> L	18
3.4 Acizii aristolochici	20
3.5 Toxicitatea acizilor aristolochici.....	21
3.6 Metode de analiză ale acizilor aristolochici	22

3.6.1 Metode de extracție a acizilor aristolochici	23
3.6.2 Metode cromatografice	23
3.6.2.1 Tehnica de analiză prin cromatografie lichidă (LC).....	23
3.6.2.2 Tehnica de analiză prin spectrometrie de masă (MS) .	25
3.7 Stadiul actual în dezvoltarea metodelor analitice moderne pentru investigarea acizilor aristolochici în probe de mediu	26

PARTEA SPECIALĂ..... 28

4. Studiul privind compoziția solului și contaminarea acestuia cu acid aristolochic I (AAI) din zonele endemice și nonendemice 28

4.1 Scopul studiului.....	28
4.2 Partea experimentală	29
4.2.1 Reactivi	29
4.2.2 Aparatură	29
4.2.3 Colectarea probelor de sol pentru analiza HPLC cuplată cu MS	32
4.2.4 Colectarea probelor de sol pentru analiza GC-MS.....	35
4.2.5 Metoda de extracție a probelor de sol pentru analiza HPLC cuplată cu MS	36
4.2.6 Metoda de extracție a probelor de sol pentru analiza GC-MS.....	37
4.2.7 Condiții cromatografice pentru HPLC	38
4.2.8 Condiții cromatografice pentru MS	39
4.2.9 Analiza MS a aductului AAI cu ionul de Sodiu	39
4.2.10 Condiții cromatografice pentru GC-MS	40
4.3 Rezultate.....	40
4.3.1 Validarea metodei HPLC	40
4.3.2 Analiza HPLC cuplată cu MS - detectia și cuantificarea AAI din soluri din zone endemice și nonendemice	43
4.3.3 Analiza GC-MS și compoziția chimică a solului din zone endemice și nonendemice.....	47
4.4 Discuții	51
4.4.1 Diferențe între zonele endemice și nonendemice din punct de vedere al contaminării cu AAI.....	51
4.4.2 Particularitățile compoziției chimice ale solului din zonele endemice comparativ cu zonele nonendemice	52
4.4.3 Ipoteza către o nouă cale de expunere – calea aeriană.....	53
4.5 Concluzii parțiale.....	55

5. Studiul privind rolul contaminării culturilor de legume cu acid aristolochic I (AAI) și analiza cantitativă și calitativă a acestuia prin metode de cromatografie lichidă și spectrometrie de masă..... 57

5.1 Scopul studiului.....	57
5.2 Partea experimentală	57
5.2.1 Reactivi	59
5.2.2 Aparatură	59
5.2.2.1 Analiza UHPLC	59
5.2.2.2 Analiza IT-SPME cuplat cu Cap-LC	62
5.2.3 Colectarea probelor de legume pentru analiza UHPLC-MS	63
5.2.4 Metode de extracție și prepararea probelor pentru analiza UHPLC-MS	65
5.2.5 Tehnici de extracție experimentale	67
5.2.5.1 Tehnica IT-SPME	67
5.2.5.2 Tehnica MSPD	67
5.2.6 Calibrarea și validarea metodei UHPLC-MS	68
5.3 Rezultate.....	69
5.3.1 Detectia și cuantificarea AAI din extractele de legume	69
5.3.2 Comparatie între concentrațiile de AAI identificate în diferite părți ale legumelor	72
5.3.3 Optimizarea separării obținute prin tehnica IT-SPME cuplată cu Cap-LC	74
5.4 Discuții	77
5.4.1 Implicarea acizilor aristolochici în lanțul trofic	77
5.4.2 Compararea rezultatelor cu alte studii de specialitate.....	81
5.4.3 Calea de contaminare aeriană și subterană	85
5.4.4 Modelul poluanților organici.....	86
5.4.5 Acizii aristolochici și legătura cu acizii humici din sol.....	86
5.4.6 Estimarea impactului acizilor aristolochici și implicațiile asupra contaminării culturilor de legume și a mediului	87
5.5 Concluzii parțiale.....	88
CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PROPRII	91
BIBLIOGRAFIE	96
ANEXE	I

CUVINTE CHEIE: acid aristolochic, boli cronice de rinichi, factori de mediu, căi de expunere, GC-MS, HPLC, LC-MS, metode cromatografice, nefropatia endemică balcanică

INTRODUCERE

Bolile cronice de rinichi (CKD) reprezintă un grup de boli caracterizate printr-un proces fiziopatologic complex care are ca rezultat alterarea ireversibilă a structurii și funcției nefronului. Acest fapt duce la instalarea bolii renale cronice în stadiul final, în care supraviețuirea pe termen lung necesită dializă sau transplant renal. Însă, o mare proporție din CKD rămân inexplicabile, această categorie a fost denumită boli cronice de rinichi de etiologie necunoscută (CKDu) sau boli cronice de rinichi de origine multifactorială (CKDmfo) și a provocat mai multe epidemii globale.

În această teză de doctorat am abordat doar una dintre CKD și anume nefropatia endemică balcanică (BEN) ca model de CKDu, aria principală de studiu fiind etiologia și factorii de mediu implicați în etiologia acestei boli multifactoriale. BEN este o boală renală cronică și ireversibilă, frecvent asociată cu cancerul urotelial de tract superior, cu incidență în unele zone rurale bine definite din Peninsula Balcanică de-a lungul Dunării, afectând populații sporadice din România, iar din acest motiv reprezintă un model ideal pentru studierea CKD.

Etiologia acestei boli este o temă de actualitate, impactul social asupra populațiilor afectate și costurile medicale aferente sunt mari. Din punct de vedere științific, BEN este un studiu multidisciplinar la intersecția dintre medicină, științele și chimia mediului. Identificarea precisă a factorilor cauzali principali și secundari ai BEN și a mecanismelor de expunere la acești factori va permite luarea de măsuri preventive eficiente.

Multe ipoteze au fost postulate în ultimele șase decenii cu privire la etiologia multifactorială a BEN, diverși factori de mediu fiind menționați: compuși organici derivați de cărbune, toxine vegetale, ochratoxine, metale grele, nefrotoxine derivate din plantele familiei *Aristolochiaceae* și *Asarum*, numiți acizi aristolochici (AAs). Studii recente confirmă principala cauză a BEN ca fiind expunerea cronică la AAs din plantele *Aristolochia spp.*, care cresc printre culturile și câmpuri agricole, dar și grădinile cultivate de localnici din anumite regiuni endemice și nonendemice din Peninsula Balcanică și astfel contaminate sursele de hrană. Cu toate acestea, căile de expunere la aceste fitotoxine și relevanța lor toxicologică pentru mediu nu sunt încă pe deplin înțelese.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Motivația din spatele tezei de doctorat este de a aduce contribuții cu privire la cauzele BEN, care reprezintă o problemă de sănătate publică pentru populațiile susceptibile din zone rurale bine delimitate din România, dar și din alte țări balcanice. Prezenta teză de doctorat propune cercetarea cauzelor BEN și implicarea factorilor de mediu în această boală.

Obiectivele specifice în cadrul cercetării științifice au fost:

- 1) Detectarea, monitorizarea și cuatificarea factorilor de mediu asociați nefropatiei endemice balcanice în zonele endemice și nonendemice; investigații pe teren și prelevare de probe de mediu (sol, materie organică a solului și culturi de legume) dar și de *Aristolochia clematitis*.
- 2) Pregătirea probelor pentru analiza de laborator a probelor de mediu cu ajutorul metodelor cromatografice specifice; analizarea compoziției chimice a solului din zone endemice și nonendemice.
- 3) Dezvoltarea și optimizarea metodelor cromatografice moderne, bazate pe chromatografie de gaze, cromatografie de lichide și spectrometrie de masă pentru analiza acizilor aristolochici din probe de mediu.
- 4) Identificarea căilor de expunere la acid aristolochic prin care se produce contaminarea populațiilor susceptibile din zonele endemice și implicarea altor cofactori în geneza bolii renale cronice.
- 5) Dezvoltarea unui model de prevenție în raport cu agenții etiologici nefrotoxici și cancerigeni, surse de contaminare pentru nefropatia endemică balcanică și alte boli renale cronice.
- 6) Reducerea riscului de nefropatie endemică balcanică prin conștientizarea impactului asupra mediului asupra sănătății umane.

Teza este împărțită în două mari capitole: partea generală și partea specială. Partea generală este formată din trei capitole principale. Capitolul I cuprinde introducerea în tematica bolilor cronice de rinichi de etiologie necunoscută (CKDu) și informații despre cauze, factori de risc, precum și clasificarea CKDu. În Capitolul II atenția este îndreptată spre BEN și date actuale despre caracteristicile clinice și patologice, etiologie și un subcapitol dedicat căilor de expunere și implicarea factorilor de mediu în etiologia BEN. Cel de-al III-lea capitol descrie principalul factor implicat în etiologia BEN, și anume acidul aristolochic (AA), originea, utilizarea și toxicitatea acestuia precum și metode de extracție și analiză ale acestor nefrotoxine.

Partea specială este împărțită în două capitole mari, fiecare reprezintă un studiu individual cu un scop bine definit:

- I. Studiul privind compoziția solului și contaminarea acestuia cu acid aristolochic I (AAI) din zonele endemice și nonendemice
- II. Studiul privind rolul contaminării culturilor de legume cu acid aristolochic I (AAI) și analiza cantitativă și calitativă a acestuia prin metode de cromatografie lichidă și spectrometrie de masă

PARTEA SPECIALĂ

I. STUDIUL PRIVIND COMPOZIȚIA SOLULUI ȘI CONTAMINAREA ACESTUIA CU ACID ARISTOLOCHIC I (AAI) DIN ZONELE BEN ENDEMICE ȘI NONENDEMICE

Acest studiu mai amplu cu privire la compoziția chimică a solurilor și contaminarea acestuia cu AAI și implicarea în patologia BEN, cuprinde la rândul lui două obiective separate:

1. De a identifica, printr-o metodă simplă și rapidă de extracție și analiză, compoziția organică a primelor două straturi ale solului (materie organică a solului - SOM și solul propriu-zis) colectate atât din zonele endemice cu cazuri active de BEN, cât și din cele nonendemice, cu sau fără prezența *Aristolochiei clematitis* în zona de prelevare a probelor. În acest scop, am folosit o metodă de extracție pe bază de solvenți, cu metanol, utilizând microunde urmat de o metodă de analiză cu ajutorul gaz cromatografului cuplat cu spectrometrie de masă (GC-MS).
2. De a stabili dacă această cale de contaminare prin sol este posibilă, luând ca referință solurile din câmpurile cultivate și a grădinilor din zonele endemice și nonendemice din câteva sate din România. Totodată, dorim să adunăm dovezi științifice pentru noi ipoteze care contribuie la etiologia BEN, legate de o nouă calea de expunerea la AAs prin straturile de suprafață ale solului, unde se formează praf și aerosoli, posibil contaminate cu particule de AAs provenite din polen sau rămășițe din plantele de *Aristolochia*.

În cadrul acestui studiu s-au utilizat metode de cromatografie în vederea analizării compoziției solului dar totodată a separării și identificării anumitor compuși în special AAs din probe de mediu (soluri). Astfel instrumentele utilizate au fost: gaz cromatograf GC Scion 436-GC (Bruker

Daltonik GmbH) cuplat cu un spectrometru de masă MS cu triplu quadrupol Scion TQ, (Bruker Daltonik GmbH), lichid cromatograf de înaltă performanță (HPLC Agilent 1100 Series) cuplat cu spectrometru de masă (Bruker AmaZon SL). Probele analizate prin tehnica de cromatografie HPLC cuplată cu MS au fost extrase utilizând 80% metanol și 20% soluție apoasă cu 10% acid formic.

În urma analizei HPLC și MS, AAI a putut fi detectat și cuantificat la nivel de nanograme. Concentrațiile găsite în probele de sol (atât din zonele endemic cât și din nonendemic) cuprinse între 140 până la 606 ng/mL (**Figura 1**). Majoritatea probelor, mai ales cele din zone endemice, au detectat pozitiv prezența AAI. Acest fapt poate avea ca explicație faptul că semințele sau rămășițele aflate în putrefacție provenite de la plantele de *Aristolochia clematitis*, care au fost prelevate împreună cu probele. Totuși, există și excepții, probabil din cauza variațiilor de mediu și de sezon, în anumite probe de sol care au fost colectate în aceleași condiții, în imediata apropiere a plantelor de *Aristolochia* nu a putut fi detectat AAI.

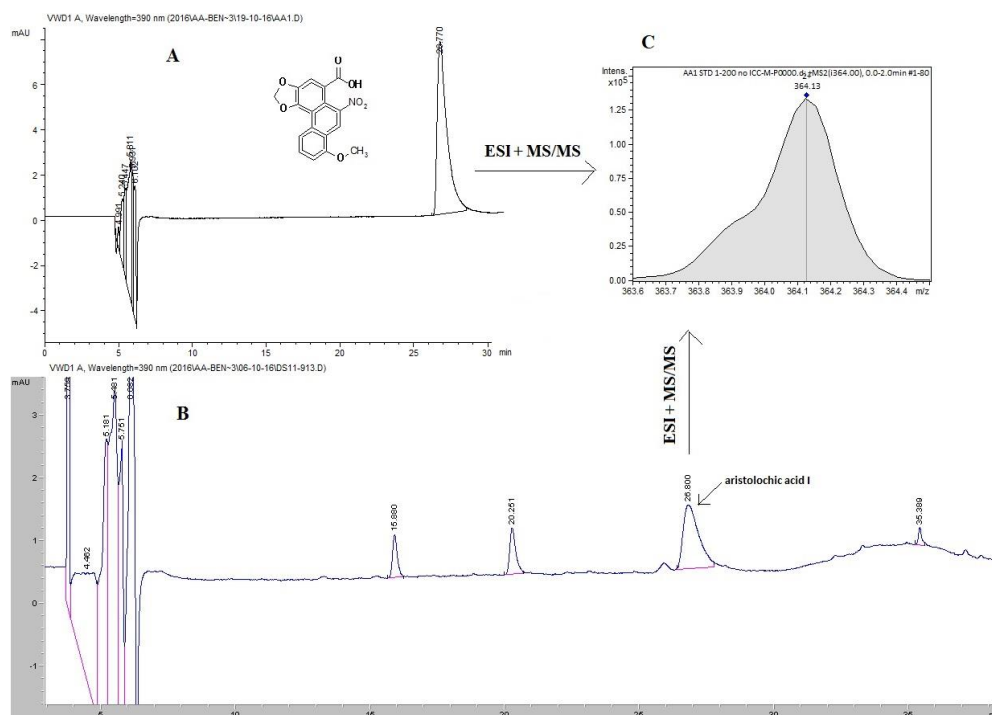


Figura 1. Analiza cromatografică HPLC și MS a AAI

A. Analiza HPLC-UV a diluției de standard AAI

B. Cromatograma unei probe de sol (colectată împreună cu semințe de *Aristolochia*) dintr-o grădina din zonă endemică din România

C. Spectrul ESI+ MS/MS al AAI - Cromatograma ionului extras [AAI+Na]⁺ cu m/z 364)

Analizarea compușilor organici din probele de sol s-a făcut după separarea lor din coloana cromatografică, iar identificarea acestora s-a bazat pe similarități chimice între structuri, obținându-se un total de 103 compuși din clase diferite, identificați cu ajutorul metodei de analiză GC-MS. Printre compușii identificați în proporția cea mai mare au fost derivați de hidrocarburi alifactice și aromatice, fiecare vârf reprezintă un compus. Compușii sunt prezentați în cromatogramă sub formă de suma intensităților spectrelor de masă în funcție de timpul de retenție (**Figura 2**).

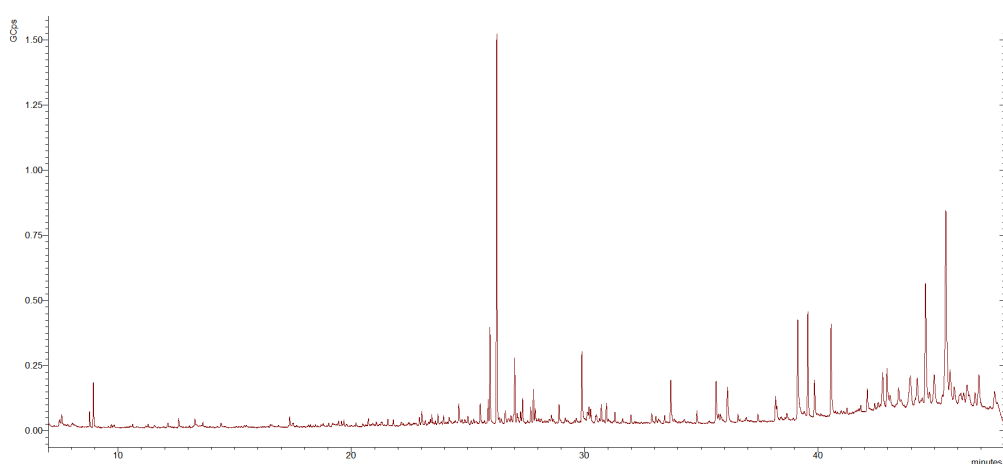


Figura 2. Cromatograma unei probe de sol dintr-o zona endemică (sat Erghevița, Județul Mehedinți)

Acest amplu studiu a demonstrat că este posibilă contaminarea solului cu AAI, o nefrotoxină cancerigenă principal responsabilă de incidența BEN și a altor boli cronice de rinichi. Am putut dovedi acest lucru utilizând metode sensibile de HPLC și MS. Atât zonele endemice cât și cele nonendemice au fost examinate din punct de vedere al prezenței sau absenței AAI, ulterior demonstrând că gradul de contaminare a solului cu AAI a fost într-o mare măsură similar în ambele zone. Un factor decisiv în detecția AAI în soluri este prezența plantelor de *Aristolochia clematits*.

Faptul că am putut identifica AAI în probele de SOM ne poate duce cu gândul la o altă ipoteză de contaminare, o nouă cale de expunere și anume calea respiratorie, prin praful generat de stratul superior al solului. Această cale de expunere prin aer vine în completarea celorlate căi deja enumerate în partea generală, și anume: expunerea voluntară (utilizare medicinală) sau involuntară (contaminarea alimentelor cu AAs). Fiecare cale menționată poate

contribui într-un mod parțial, cronic sau cumulativ de expunere la AAs, efectele dăunătoare produse în timp fiind adesea ireversibile.

Fracțiunile lipidice din sol, în special derivații de hidrocarburi alifaticе s-au detectat în cea mai mare proporție în probele colectate din zonele rurale endemice și nonendemice, spre deosebire de solul din zona urbană, unde s-au detectat o concentrație mare de hidrocarburi aromatice policiclice, fapt îngrijorător pentru localnici datorită faptului că se acumulează în sol și contribuie la expunerea cronică la aceste substanțe nocive.

Aristolona, o sesquiterpenă specifică, a fost identificată în probele care au conținut resturi de semințe sau rămășițe din planta *Aristolochia clematitis*, fiind colectate împreună cu probele de sol. De aici s-ar putea deduce că solul a asimilat aristolona, datorită faptului că plantele de *Aristolochia* cresc în apropierea grădinilor cultivate de unde au fost recoltate probele.

II. STUDIUL PRIVIND ROLUL CONTAMINĂRII CULTURILOR DE LEGUME CU ACID ARISTOLOCHIC I (AAI) ȘI ANALIZA CANTITATIVĂ ȘI CALITATIVĂ A ACESTUIA PRIN METODE DE CROMATOGRAFIE LICHIDĂ (LC) ȘI SPECTROMETRIE DE MASĂ (MS)

Pentru a extinde domeniul de aplicabilitate al studiilor anterioare, referindu-ne la apariția și distribuția contaminanților emergenți în sistemele "sol – plante-mediu" și care reprezintă o problemă de sănătate publică, am propus o metodă sensibilă de cromatografie lichidă cuplată cu un spectrometru de masă cu trapă ionică (LC-IT-MS) pentru detectarea și cuantificarea AAI în unele dintre cele mai usuale plante cultivate, cum ar fi: ceapa verde sau de primăvară (*Allium fistulosum*), salata (*Lactuca sativa*) și castraveții (*Cucumis sativus*). Am efectuat toate experimentele în condiții naturale de câmp, probele au fost colectate dintr-o grădină nonendemică, zonă în care plantele *Aristolochia* sunt prezente. Actualul studiu este o continuare a uneia dintre investigațiile recent publicate de grupul nostru de cercetare. Mai departe am propus ca probele prelevate să fie analizate printr-o metodă sensibilă de LC-MS pentru a analiza și cuantifica AAI în scopul calculării unor doze teoretice la care se expune populația care consumă aceste legume contaminate. În acest sens, am realizat o abordare experimentală similară pentru o mai bună înțelegere a relației cauzale dintre AAI și BEN și a modului în care acest contaminant de mediu este translocat din diferite părți ale legumelor, a modului

în care AAI intră în bulbul cepei, frunzele de salată și în fructele de castraveți. Alegerea acestor legume a fost gândită cu scopul de a acoperi câteva tipuri de plante cu părți aflate atât sub cât și deasupra solului în contextul unui sol dintr-un teren agricol sau grădină contaminată cu AAI.

Aparatura utilizată în vederea realizării experimentelor de analiza cromatografică a constatat în: un aparat de cromatografie lichidă de ultra-înaltă performanță (UHPLC) Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific) echipat cu un autosampler, o pompă și un detector cu rețea de diode (DAD). Partea de lichid cromatograf este cuplata cu un spectrometru de masă (MS) cu o sursă de ionizare tip electrospray (ESI) și trapă ionică (IT) Amazon SL (Bruker).

Un total de 141 probe s-au colectat din două locații diferite, în timpul deplasărilor pe teren realizate în perioada iunie-iulie 2017 dintr-o grădina rurală nonendemică din România, unde *Aristolochia clematitis* (care erau înflorite în acea perioadă) erau prezente pe alocuri, dar zonă în care nu au fost raportate cazuri de BEN. Localnicii întrebuințează grădinile pentru creșterea de legume în scopuri personale de consum, de obicei acestea fiind singura sursă de alimentație pentru familie. Deși majoritatea publicațiilor menționează că AAs se găsesc exclusiv în zonele endemice, există studii care prezintă date cum că AAs se găsesc și în așezările nonendemice, în afara zonelor BEN, datorită faptului că *A. clematitis* este considerată o buruiănă a cărei creștere și răspândire nu poate fi controlată. Încă din timpul deplasărilor pe teren din studiul anterior am observat că *A. clematitis* se găsește în abundențe similare în ambele zone: sate endemice și nonendemice.

Metoda de UHPLC–MS validată a fost aplicată pentru detecția AAI în probe: sol (n = 30), ceapă verde - bulb și frunze (n = 24), salată - radacină, tulpină, frunze (n = 54) și castravete - fruct (n = 6), colectate dintr-o grădină cultivată, din zonă nonendemică din România. Pentru a avea termen de comparație, am colectat probe control (n = 27), dintr-o zonă urbană nonendemică unde BEN sau *Aristolochia clematitis* nu au fost raportate. Analizele cromatografice confirmă prezența AAI în toate probele colectate din grădina posibil contaminată cu *Aristolochia clematitis*. După cum era de așteptat, AAI nu a fost detectat în probele de sol și legume colectate din grădina urbană (control negativ). Spectrul MS/MS și timpii de retenție ai probelor colectate din grădina contaminată cu *Aristolochia* în prezența plantei au fost similare cu ale standardelor de AAI, iar concentrațiile au fost calculate.

O comparație a rezultatelor obținute în probele de sol, ceapă verde și salată este reprezentată în graficul din **Figura 3**, concentrațiile variind între 600 - 1500 ng/mL (361.45 – 903.61 ng / g). Probele sunt împărțite în două categorii în funcție de zona de colectare și dacă a fost sau nu sesizată prezența plantei

Aristolochia clematitis în momentul colectării probelor. Cantitatea cea mai mare de AAI a fost găsită în probele de sol care nu au avut nici o corelare directă cu prezența plantelor de *Aristolochia*. O cantitate remarcabilă s-a observat în părțile subterane ale plantelor, în bulbul de ceapă verde și în rădăcina de salată, valori care atestă calea de absorbție din sol în plantele cultivate. În acest caz, prezența plantelor de *Aristolochia* crește concentrația de AAI în probe, bulbul de ceapă verde ajungând la o concentrație medie de 441.3 ng/g. Pe de altă parte, cantitatea de AAI găsită în părțile aeriene ale legumelor (frunze sau tulpini) a fost cu două treimi mai scăzută față de concentrațiile calculate în părțile subterane. Cantitatea cea mai scăzută de AAI a fost găsită în fructul de castravete, având concentrații în intervalul 120.5 și 187.5 ng/g. O explicație poate fi aceea cum că fructele se dezvoltă într-un stadiu mai tardiv, cresc deasupra solului sau stau pe sol și chiar dacă castraveții au fost situați în apropierea plantelor de *Aristolochia*, probabil nu au avut suficient timp pentru ca AAI să se acumuleze în țesutul fructului.

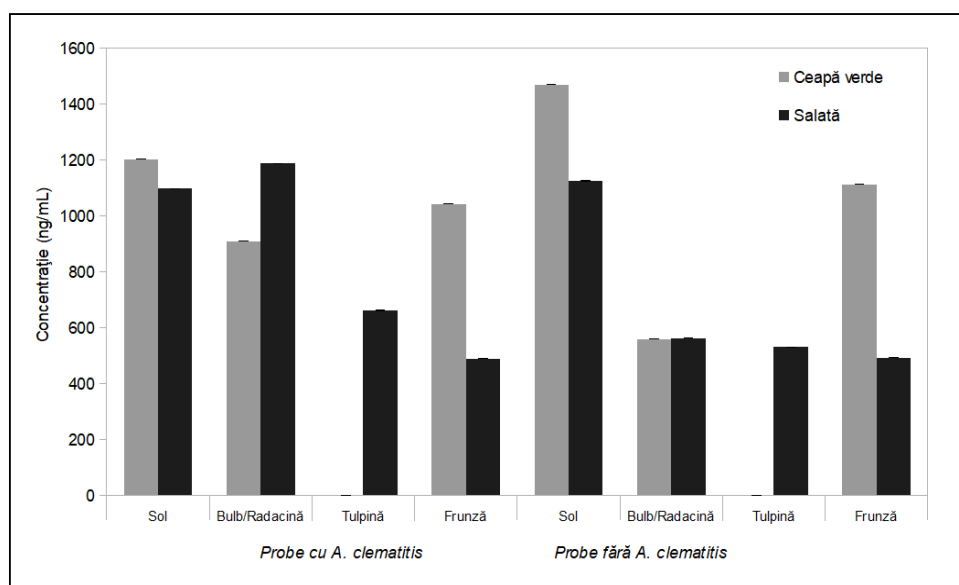


Figura 3. Reprezentarea grafică a concentrațiilor medii de AAI în legume (ceapă verde versus salată) în paralel cu probele de sol corespunzătoare zonelor din imediata apropiere

Rezultatele noastre demonstrează pentru prima dată că concentrații de AAI pot fi găsite și în solurile non-endemice, atâta timp cât plantele de *Aristolochia* cresc în zona respectivă. Presupunând că un sătean este expus la cantitatea maximă de AAI prin consumul tuturor acestor legume pe toată perioada de timp în care acestea cresc (trei luni pe an), înseamnă că el este

expus la aproape 10 mg de AAI annual. Dacă se ia în considerare faptul că BEN se dezvoltă între 40 și 60 ani, înseamnă că expunerea cumulată de AAI este în jur de 400 mg, corespunde perioadei de timp în care se dezvoltă BEN.

Prezența AAI în părțile plantelor crescute deasupra sau sub pământ se atribuie unei căi specifice care explică cum AAI circula în mediu. Concentrațiile de AAI descresc de la sol la bulb (sau rădăcina) la frunze și fructe; concentrațiile cele mai ridicate sunt în părțile subterane, mai exact în bulbul cepei verzi. AAI din frunze și tulpină poate fi atribuită volatilizării și depunerii aeriene pe calea aerului, sau transportului prin întreaga plantă începând de la rădăcina (în salată) sau bulb (în ceapa verde) și mai departe la părțile aeriene, precum frunze (în ceapa verde și salată) și fructe (în castravete), în timp ce AAI din rădăcina poate fi asociat cu un transport pasiv de la sol sau prin legarea de acizii humici din sol, făcând astfel disponibil AAI pentru alte rădăcini de plante.

CONCLUZII FINALE ȘI CONTRIBUȚII PROPRII

Această teză de doctorat a urmărit studiul factorilor de mediu implicați în etiopatologia multifactorială a unei boli cronice de rinichi manifestată în zona Peninsulei Balcanice, boala numită nefropatia endemică balcanică. În contextul acestei boli s-au studiat factorii implicați în apariția acesteia, cei mai recent și intens studiați fiind acizii aristolochici, fitotoxine prezente în plantele din familia *Aristolochiaceae*, iar această specie crește cu precădere în zonele Balcanice, pentru România este caracteristică specia *Aristolochia clematitis* L. Studiile din cadrul acestei teze completează studiile de actualitate realizate de alte grupuri de cercetare care au ca scop comun elucidarea cauzei și prevenirea acestei boli fatale.

Teza cuprinde mai multe studii de analiză și identificare a acidului aristolochic I, compusul preponderent din plantele de *Aristolochia*, cu efect nefrotoxic și cancerigen. Contaminarea mediului cu această fitotoxină reprezintă în sine un studiu complex, având în vedere că până în prezent s-au identificat în sol, în plante cultivate consumate de localnici, în apa din fântâni, astfel ipotezele de studiu pornesc de la aceste date experimentale. Faptul că compusul poate contamina solul care înconjoară plantele de *Aristolochia* și mai apoi poate difuza în sol și astfel ajunge să contamineze și plantele care cresc în apropiere sa. Acest fapt a dus la realizarea unor studii de analiză a probelor colectate din zone endemice dar și nonendemice pentru că există anumite zone rurale unde cresc plantele de *Aristolochia*, dar unde nu sunt cazuri

raportate de Balkan endemic nephropathy. În general acizii aristolochici preferă un sol cu o compoziție asemanătoare celui în care cresc plantele cultivate consumate de localnici. Mai multe colective de cercetare au studiat cum acest compus contaminează: solul din zonele endemice, plantele de cultură cultivate în grădini endemice, precum ceapă, roșie, castravete, salată; dar și cele cultivate în câmpuri endemice, precum: porumb, grâu; apele din fântânile.

Aceste căi multiple de contaminare au loc în lanț: plante *Aristolochia* - sol - plante de cultură - apă și este necesară înțelegerea acestora pentru că ar putea ghida către cauzele bolii și explicarea cauzelor necunoscute, atât pentru nefropatia endemică balcanică cât și pentru alte boli cronice de rinichi similare, care au printre factori declanșatori contaminanți din mediu. De obicei, studiile de mediu se desfășoară pe o perioadă mai îndelungată datorită variabilității mari a factorilor declanșatori sau potențial responsabili: diversitatea plantelor de *Aristolochia*, proprietățile plantelor de cultură, particularitățile regiunii de proveniență a plantelor, tipul solului în care cresc plantele, diferențele sezoniere, perioada de colectare, tehnicile de analiză.

Principalele concluzii evidențiate de munca realizată în această teză de doctorat sunt:

1) Prin utilizarea unor metode sensibile de analiză, am demonstrat că solul și stratul de la suprafața solului - materia organică a solului (SOM) sunt în mare măsură contaminate cu AAI la nivel de nanograme, în zonele în care există *Aristolochia clematitis*.

2) Datorită faptului că plantele de *Aristolochia clematitis* cresc atât în soluri endemice cât și nonendemice, compusul AAI se regăsește în ambele tipuri de soluri, nivelul de contaminare fiind similar.

3) În probele de sol colectate în luna septembrie 2016 am găsit o concentrație de AAI mult mai mare decât în probele din alte sezoane, acest fapt probabil datorându-se unei abundențe mai crescute a plantelor de *Aristolochia clematitis* aflate în stadiul de maturitate, când fructele și semințele au o concentrație crescută de AAI.

4) Metoda GC-MS a fost aplicată cu succes în scopul analizării compoziției chimice a solului colectat din zone endemice și nonendemice, astfel identificând mai mult de 100 de compuși organici.

5) Rezultatele noastre demonstrează pentru prima dată prezența AAI în solurile nonendemice, atata timp cât prezența plantelor de *Aristolochia* este observată în zona respectivă.

6) Am reușit să dezvoltăm și să validăm o metoda nouă de cromatografie lichidă de ultra performanță cuplată cu spectrometru de masă cu

trapă ionică (UHPLC-MS-IT), capabilă să detecteze și cuantifice AAI la nivel de nanograme în soluri și legume.

7) Toate probele identificate pozitiv cu AAI au fost colectate din aceeași locație, o grădina cultivabilă nonendemică cu sau fără prezența directă a plantei *Aristolochia clematitis*, fapt care nu a influențat în mod particular concentrațiile de AAI.

8) Am demonstrat faptul că concentrațiile AAI variază între diferite părți ale plantelor, în funcție de creșterea lor deasupra sau subterană, iar acest fapt este atribuit unei căi specifice care explică modul în care circulă AAI în mediu: de la sol la direcția rădăcinii - frunze - fructe, prin urmare cea mai mare concentrație de AAI a fost identificată în bulbul de ceapă verde.

Nefropatia endemică balcanică împreună cu principalul său factor declanșator, acidul aristolochic I, reprezintă un aspect de îngrijorare pentru sănătatea publică a unor populații. Contaminarea legumelor cu această fitotoxină, felul în care aceasta este preluată și apoi transportată și bioacumulată în tesuturile legumelor de consum, reprezintă un prim pas pentru a se lua măsuri de prevenție și a se evita contaminarea altor alimentelor. Analize frecvente de sol sunt totodată necesare pentru identificarea compușilor organici toxici din sol, cum ar fi hidrocarburile aromatice policiclice, care denotă implicații în sanatatea publică. În acest scop, este necesară o abordare multidisciplinară pentru a putea acoperi complexitatea tuturor ipotezelor elaborate până în prezent: rezolvarea misterului factorilor responsabili pentru declanșarea nefropatiei endemice balcanice, dar și a altor boli cronice de rinichi de etiologie necunoscută induse de diverși factori de mediu.