

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Beata Skowron

**„ANALIZA LABORATORYJNA PATOMECHANIZMÓW
MODELU DOŚWIADCZALNEGO WSTĘPUJĄCEGO
OSTREGO USZKODZENIA NEREK SPOWODOWANEGO
ZAKAŻENIEM PAŁECZKĄ OKRĘŻNICY”**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Piotr J. Thor

Praca została wykonana w Katedrze Patofizjologii

Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego

Collegium Medicum

Kierownik Katedry i Zakładu: Prof. dr hab. n. med. Piotr J. Thor

Kraków 2013

***Składam serdeczne podziękowania
Panu Prof. dr hab. n. med. Piotrowi Thor
za cenne rady i wskazówki
podczas pisania niniejszej pracy.***

*Składam serdeczne podziękowania
Pani Dr hab. n. med. Magdalenie Strus
za cenne rady i wskazówki
podczas pisania niniejszej pracy.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY.....	7
1. WSTĘP.....	10
1.1 Biochemiczne i molekularne aspekty procesu zapalnego.....	11
1.2 Epidemiologia i etiologia zakażeń układu moczowego.....	13
1.3 Podział i specyfika zakażeń układu moczowego.....	17
1.3.1 Odmiedniczkowe zapalenie nerek.....	24
1.4 Ostre uszkodzenie nerek – OUN.....	27
1.5 Laboratoryjna ocena czynności nerek.....	30
1.5.1 Ogólne, specjalistyczne i mikrobiologiczne badanie moczu.....	30
1.5.2 Badania biochemiczne krwi.....	35
2. ZAŁOŻENIA PRACY.....	40
3. CEL PRACY.....	41
4. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ.....	42
4.1 Zwierzęta.....	42
4.2 Procedury.....	42
4.3 Grupy badawcze.....	44
4.4 Charakterystyka pałeczki okrężnicy i schemat badania.....	45
4.5 Analiza laboratoryjna.....	46
4.5.1 Biochemiczna analiza krwi.....	46
4.5.2 Biochemiczna analiza moczu.....	47
4.5.3 Mikrobiologiczna analiza moczu.....	47
4.5.4 Parametry obliczeniowe.....	48
4.5.5 Histologiczna ocena narządów układu moczowego.....	51
5. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW.....	52

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	53
6.1 Ocena zakażenia i intensywności stanu zapalnego.....	53
6.1.1 Posiewy moczu.....	53
6.1.2 Poziom IL-6 w moczu.....	54
6.1.3 Poziom TNF α w surowicy.....	55
6.1.4 Temperatura.....	56
6.2 Laboratoryjna ocena funkcji filtracyjnej nerek.....	58
6.2.1 Objętość DZM.....	58
6.2.2 Stężenie kreatyniny w surowicy – K_{reaP}	59
6.2.3 Stężenie kreatyniny w moczu – K_{reaU}	60
6.2.4 Klirens kreatyniny – Cl_{Kr}	62
6.2.5 Stężenie mocznika w surowicy – U_{reaP}	63
6.2.6 Stężenie mocznika w moczu – U_{reaU}	64
6.2.7 Klirens mocznika – Cl_{Urea}	65
6.2.8 Frakcjonowane wydalanie mocznika – FE_{Urea}	66
6.2.9 Stężenie kwasu moczowego w surowicy.....	67
6.2.10. Stężenie kwasu moczowego w moczu.....	68
6.2.11 Współczynnik mocznik P/kreatynina P – U_{reaP}/K_{reaP}	69
6.2.12 Współczynnik mocznik U/mocznik P – U_{reaU}/U_{reaP}	69
6.2.13 Współczynnik kreatynina U/kreatynina P – K_{reaU}/K_{reaP}	70
6.3 Ocena wpływu ZUM na gospodarkę elektrolitową.....	71
6.3.1 Stężenie sodu w surowicy – Na_P	71
6.3.2 Stężenie sodu w moczu – Na_U	73
6.3.3 Frakcjonowane wydalanie sodu – $FENa$	74
6.3.4 Stężenie potasu w surowicy – K_P	75
6.3.5 Stężenie potasu w moczu – K_U	76
6.3.6 Frakcjonowane wydalanie potasu – FEK	77
6.3.7 Wskaźnik niewydolności nerek – RFI	79
6.4 Analiza laboratoryjna białek moczu.....	80
6.4.1 Dobowe wydalanie białka.....	80

6.4.2 <i>Selektywność białek moczu</i>	81
6.4.3 <i>Densytometria frakcji albuminowej</i>	84
6.5 Ocena dobrostanu zwierząt doświadczalnych.....	85
6.5.1 <i>Masa ciała</i>	85
6.5.2 <i>Waga spożywanego jedzenia</i>	86
6.6 Zbiorcze zestawienie analizowanych parametrów.....	87
6.7 Ocena histologiczna preparatów pęcherzy i nerek.....	89
7. DYSKUSJA	95
8. WNIOSKI	107
9. SUMMARY	108
10. PIŚMENNICTWO	111
11. SPIS RYCIN I TABEL	123

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY:

AKI – Acute Kidney Injury (*ostre uszkodzenie nerek*)

ALP – fosfataza alkaliczna (*Alkaline Phosphatase*)

APC – komórka prezentująca antygen (*Antigen Presenting Cell*)

AT – adhezyny autotransportujące

Cl_{kr} – klirens kreatyniny

Cl_{urea} – klirens mocznika

CRP – białko C-reaktywne (*C-Reactive Protein*)

CŚZN – cewkowo – śródmiąższowe zapalenie nerek

CYR61 – białko wydzielnicze bogate w cysteinę (*cysteine-rich protein 61*)

DAF – *Decay Accelerating Factor*

EPS – pozakomórkowe substancje polimeryczne (*Extracellular Polymeric Substances*)

FEK – frakcjonowane wydalenie potasu (*fractional kalium excretion*)

FENa – frakcjonowane wydalenie sodu (*fractional sodium excretion*)

FEUrea – frakcjonowane wydalenie mocznika (*fractional urea excretion*)

GFR – współczynnik filtracji kłębuszkowej (*Glomerular Filtration Rate*)

H – E – barwienie hematoksylina – eozyna

IL – interleukina

j.t.k. – jednostka tworząca kolonię

INF γ – interferon γ

K – potas

K_P – stężenie potasu w surowicy

K_U – stężenie potasu w moczu

K_{reap} – stężenie kreatyniny w surowicy

K_{creau} – stężenie kreatyniny w moczu

KDIGO – *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

KIM-1 – *Kidney Injury Molecule-1*

KZN – kłębuszkowe zapalenie nerek

LPS – lipolisacharyd

MAC – atakujący kompleks błonowy dopełniacza (*Membrane Attack Complex*)

MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

MHC – białka układu zgodności tkankowej (*Major Histocompatibility Complex*)

Na – sól

Na-K-ATPaza – pompa sodowo – potasowa

Na_p – stężenie sodu w surowicy

Na_u – stężenie sodu w moczu

NGAL – lipokalina

NK – komórki cytotoksyczne (*Natural Killer*)

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

NO – tlenek azotu

NOS1 – syntaza tlenku azotu

OIOM – oddział intensywnej opieki medycznej

OZN – odmiedniczkowe zapalenie nerek

OUN – ostre uszkodzenie nerek

P – oznaczenie wykonywane w surowicy (*Plasma*)

PGE - prostaglandyna

PNN – przewlekła niewydolność nerek

POCT – badania przyłóżkowe (*Point Of Care Testing*)

RAA – układ renina – angiotensyna - aldosteron

RFI – wskaźnik niewydolności nerek (*Renal Failure Index*)

SD – odchylenie standardowe

TNF α – czynnik martwicy guza α (*Tumor Necrosis Factor α*)

Tc – limfocyt T cytotoksyczny (*T cytotoxic lymphocyte*)

Th – limfocyt T pomocniczy (*T helper lymphocyte*)

TLR – *Tool – Like Receptor*

U – oznaczenie wykonywane w moczu (*Urine*)

UPEC – uropatogenne szczepy pałeczki okrężnicy (*Uropathogenic Escherichia Coli*)

UP1a – receptor uroplakinowy 1a

Ureap – stężenie mocznika w surowicy

Ureau – stężenie mocznika w moczu

UTI – Urinary Tract Infection (*zakażenie układu moczowego*)

ZUM – zakażenie układu moczowego

1. WSTĘP

Zakażenie układu moczowego – ZUM – zostało zdefiniowane, jako obecność drobnoustrojów powyżej zwieracza pęcherza moczowego, w jałowych fizjologicznie drogach moczowych [1]. Poza infekcjami dróg oddechowych – ZUM, jest jednym z najczęściej diagnozowanych schorzeń przez lekarzy podstawowej opieki zdrowotnej. Szacuje się, że rocznie zapada na nie ok. 170 milionów ludzi na całym świecie [2].

ZUM jest konsekwencją upośledzenia występujących w organizmie mechanizmów przeciwdziałających infekcjom dróg moczowych. Przyczyną ich osłabienia są m.in. zmiany hormonalne (menopauza, ciąża), zaburzenia w opróżnianiu pęcherza (spowodowane przerostem prostaty lub opadaniem miednicy), ale także wady anatomiczne w układzie moczowym, cukrzyca, dieta i farmakoterapia, głównie sterydowa. Do barier zapobiegających w naturalny sposób przyleganiu bakterii do nabłonka układu moczowego, poza mechanicznym działaniem strumienia moczu, należy: fizjologiczna flora bakteryjna pochwy i ujścia cewki moczowej, uromodulina, wydzielina gruczołu krokowego, oraz mukopolisacharydy błony śluzowej pęcherza. Dodatkowo kwaśne pH moczu, przeciwciała, czynność zastawek pęcherzowo – moczowodowych, perystaltyka moczowodów, utrudniają kolonizację i ułatwiają eliminację drobnoustrojów z układu moczowego. Wraz z wiekiem zmniejsza się skuteczność tych mechanizmów, zwiększając ryzyko i częstość występowania ZUM. Poza zmianami związanymi ze starzeniem się organizmu, skolonizowaniu dróg moczowych sprzyja: zastój moczu na każdym poziomie układu moczowego, refluks moczowodowo – pęcherzowy, kamica moczowa, instrumentacja dróg moczowych, immunosupresja oraz przewlekłe schorzenia nerek.

Dolegliwości związane z zakażeniem dróg moczowych odczuwane są średnio przez 6 dni, oraz wiążą się z koniecznością ograniczenia codziennej i zawodowej

aktywności [3]. Na podstawie objawów klinicznych, wśród których występuje: dyzuria, częstomocz, nykturia, mimowolne oddawanie moczu, ból w okolicy nadłonowej lub lędźwiowej, niekiedy gorączka, można postawić wstępne rozpoznanie ZUM. Ostateczne zdiagnozowanie tego schorzenia, zgodnie z definicją, wymaga wykazania obecności drobnoustrojów w drogach moczowych. Diagnozę potwierdza się badaniem bakteriologicznym moczu, a właściwe leczenie ustala na podstawie wykonanego antybiogramu [4].

1.1 Biochemiczne i molekularne aspekty procesu zapalnego

Kolonizacja drobnoustrojów w drogach moczowych jest czynnikiem uruchamiającym kaskadę reakcji, mających na celu szybką lokalizację, zniszczenie i eliminację patogenu z ustroju, z następową regeneracją uszkodzonych tkanek i wyzdrowieniem. To odpowiedź immunologiczna organizmu, której dwie zasadnicze fazy polegają na rozpoznaniu antygeny i reakcjach umożliwiających jego likwidację. W obrębie nabłonka i błon śluzowych układu moczowego, komórkami odpowiedzialnymi za identyfikację i prezentację antygeny układowi odpornościowemu, są komórki układu białokrwinkowego – fagocyty jednojądrzaste APCs. Komórki te mają dużą ekspresję cząstek MHC klasy II, które umożliwiają rozróżnienie egzogennych antygenów od własnych. W obrębie fagolizosomu komórki APC, dochodzi do częściowej degradacji antygeny na fragmenty peptydowe. Fragmenty te łączą się z konkretną cząsteczką MHC we wnętrzu komórki i jako kompleks – cząsteczka MHC/peptyd – prezentowane są na jej powierzchni limfocytom Th. Rozpoznanie cząsteczek antygenowo obcych przez limfocyty Th, powoduje aktywację mechanizmów efektorowych, czyli produkcję cytokin. Te z kolei pobudzają limfocyty B do produkcji przeciwciał, oraz aktywują lub hamują działania innych komórek efektorowych, w tym limfocytów Tc, makrofagów i granulocytów [5].

W przypadku zapalenia bakteryjnego to LPS i bakteryjne endotoksyny są silnymi czynnikami chemotaktycznymi i aktywatorami produkcji cytokin, wywołującymi napływ komórek do miejsca reakcji zapalnej [6]. W odpowiedzi na składniki drobnoustrojów, szczególnie ważną rolę odgrywają uwalniane przez makrofagi cytokiny, takie jak: $\text{TNF } \alpha$, oraz interleukiny: IL-1, IL-6 i IL-12. Skutkiem ich działania jest zwiększenie aktywności fagocytarnej makrofagów i neutrofilów. Dochodzi do wydzielania $\text{IFN } \gamma$ przez komórki NK, rekrutacji leukocytów do miejsca zapalenia oraz wzrostu ekspresji selektyn, czyli cząstek niezbędnych w procesie migracji leukocytów z krwi do miejsca objętego stanem zapalnym [7].

Wzrost poziomu cytokin, jest przyczyną typowych objawów miejscowych i ogólnoustrojowych stanu zapalnego. Pod ich wpływem, w narządzie objętym procesem zapalnym zwiększony zostaje przepływ krwi, wzrasta temperatura, dochodzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych i przekrwienia łożyska naczyniowego. Wzmoczona przepuszczalność naczyń warunkuje powstanie obrzęku, który drażniąc zakończenia nerwowe jest przyczyną bólu [8]. Dochodzi do upośledzenia funkcji narządu, manifestacji objawów klinicznych. Ponadto $\text{TNF } \alpha$, IL-1 i IL-6 inicjują w hepatocytach syntezę białek ostrej fazy np. CRP, uznanego markera stanu zapalnego.

W inaktywacji drobnoustrojów, komórki procesu zapalnego wykorzystują zależne i niezależne od tlenu mechanizmy. Proces tlenowy związany jest z produkcją reaktywnych form tlenu i azotu. Proces beztlenowy wiąże się z wykorzystaniem substancji bakteriobójczych, zlokalizowanych w ziarnistościach, tworzeniem fagolizosomu i trawieniem enzymatycznym, oraz formowaniem przez białka dopełniacza kompleksu MAC. Komórki, które brały udział w eliminacji drobnoustrojów i spełniły swoją funkcję, prawidłowo ulegają apoptozie, prowadząc do wygaszenia stanu zapalnego. Komórki, które w skutek przeładowania materiałem antygenowym, uległy

procesowi nekrozy, po uwolnieniu zawartości stają się przyczyną przejścia stanu ostrego w przewlekły stan zapalny.

1.2 Epidemiologia i etiologia zakażeń układu moczowego

Epidemiologia. Zakażenie układu moczowego jest schorzeniem dotyczącym zarówno dzieci jak i dorosłych. U dzieci, ze względu na wysoką temperaturę towarzyszącą zakażeniu, oraz w porównaniu do populacji dorosłych, wzmożoną częstość występowania powikłań (bliznowacenie nerek, nadciśnienie, przewlekła choroba nerek), infekcję tą określa się mianem poważnej [9,10]. Dane literaturowe pokazują, że na infekcje dróg moczowych zapada ok. 8 % wszystkich dzieci, w tym 2 % chłopców i 5 – 6 % dziewcząt [11,12].

W populacji dorosłych, ze względu na różnice w długości cewki moczowej, na ZUM kobiety zapadają kilkakrotnie częściej niż mężczyźni. Szacuje się, że około 50 % kobiet i 12 % mężczyzn przynajmniej raz w życiu przechodziło infekcję dróg moczowych [13]. U kobiet między 18 a 24 rokiem życia zapadalność na ZUM wynosi 11 % [14]. W kolejnych dekadach życia częstość zachorowania zwiększa się o 1 – 2 %, osiągając po 60. roku życia wartość ok. 20 %. U mężczyzn w wieku do 50 lat, częstość występowania ZUM utrzymuje się poniżej 1 %, natomiast w wieku 70 lat nie przekracza 3 % [15,16]. Kolejne grupy narażonych na ZUM stanowią pacjenci cewnikowani lub poddani innej instrumentacji dróg moczowych, oraz kobiety w ciąży. Jednorazowe, krótkotrwałe cewnikowanie jest przyczyną infekcji u 20 % pacjentów. Kilkundniowe utrzymywanie cewnika prowadzi do rozwoju ZUM u 90 – 100 % chorych [4,17]. Ze względu na zmiany hormonalne, osłabiające mechanizmy przeciwbakteryjne układu moczowego, u kobiet w ciąży zachorowalność odnotowuje się na poziomie 9 % [18]. Szacuje się, że rocznie w USA koszt leczenia pacjentów z ZUM – o etiologii

niezwiązanej z pobytem w szpitalu – oscyluje w granicy 1,6 bln dolarów, natomiast koszt leczenia wszystkich przypadków to 3 bln [19,20].

Etiologia. W ponad 90 % pozaszpitalnych i 50 % szpitalnych przypadków infekcji dróg moczowych, drobnoustrojem izolowanym z moczu i odpowiedzialnym za objawy kliniczne ZUM, jest pałeczka okrężnicy – *Escherichia coli* [21,22]. W warunkach fizjologicznych bakteria ta stanowi florę przewodu pokarmowego, zakażenie jest natomiast konsekwencją przeniesienia jej w okolice cewki moczowej oraz pasażu drobnoustroju do pęcherza. U pacjentów bez epizodu szpitalnego w etiologii ZUM, przyczyną wystąpienia objawów mogą być także: *Staphylococcus saprophyticus* ~ 5 – 10 %, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp. ~ 5 %. W przypadku infekcji o etiologii szpitalnej ZUM, odsetek izolowanych w posiewach drobnoustrojów z grupy *Enterobacteriaceae* wzrasta do około 45 %, w tym *Enterococcus* spp. stanowi ~ 20 %, *Klebsiella* spp. ~ 15 %, *Proteus* spp. ~ 10 %, *Serratia marcescens* ~ 3 %. Wśród rzadziej izolowanych patogenów znajdują się: *Pseudomonas* spp., *Chlamydia trachomatis*, *Herpes simplex* oraz grzyby. Należy jednak zaznaczyć, że grzybicza (głównie *Candida albicans*) infekcja dróg moczowych występuje prawie wyłącznie u pacjentów hospitalizowanych z cewnikiem, dodatkowo obciążonych cukrzycą i stosujących kortykosteroidoterapię [23,24].

Pałeczka okrężnicy. Pałeczka okrężnicy jest najpowszechniejszym gatunkiem rodzaju *Escherichia*, odpowiedzialnym za większość przypadków bakteryjnych infekcji układu moczowego. To Gram – ujemna bakteria, względnie beztlenowa, fizjologicznie – jako komensal – bytująca w okrężnicy człowieka. W swoim naturalnym środowisku, większość szczepów pałeczki okrężnicy nie wykazuje cech chorobotwórczych. Źródłem poważnych, zagrażających zdrowiu i życiu infekcji, bakterie te stają się dopiero wówczas, gdy przedostaną się do naczyń krwionośnych, oraz innych układów [25].

Pałeczka okrężnicy jest izolowana u 45 % pacjentów z sepsą, u 90 % pacjentów z pozaszpitalnym ZUM, oraz w stanach zapalnych żołądka i jelit. Na podstawie zróżnicowania budowy antygenów somatycznych – O, powierzchniowych – K i rzęskowych – H, gatunek *E. coli* tworzy ponad 180 typów serologicznych o różnej chorobotwórczości. W przypadku infekcji dróg moczowych za wystąpienie objawów klinicznych odpowiadają tzw. uropatogenne szczepy *E. coli* – UPEC [26]. Kolonizacja układu moczowego przez te szczepy, możliwa jest dzięki ich zdolnościom do przylegania do nabłonka wyściełającego drogi moczowe. Niespecyficzny mechanizm adherencji wykorzystuje siłę przyciągania elektrostatycznego, jak również oddziaływania międzycząsteczkowe między nabłonkiem a strukturami bakterii. Specyficzny mechanizm polega na posiadaniu przez nabłonek i komórki bakteryjne pewnych osobiwych struktur i białek, tworzących razem silne wiązania [27].

Czynnikami wirulencji UPEC, warunkującymi chorobotwórczość i zapadalność na infekcje układu moczowego są adhezyny, a wśród nich fimbrie i struktury niefimbriowe. Fimbrie są nitkowatymi tworami, utworzonymi z podjednostek białkowych, ułożonymi równomiernie wokół całej komórki bakteryjnej. Fimbrie typu I, wykazujące powinowactwo do mannozy, są charakterystyczne dla >70 % szczepów UPEC [28]. Za pośrednictwem dystalnego białka FimH łączą się one z resztami mannozowymi receptora UP1a, zlokalizowanego na komórkach nabłonka pęcherza moczowego. Połączenie to umożliwia bakteriom inwazję wewnątrzkomórkową, oraz tworzenie biofilmu – błony biologicznej chroniącej bakterie przed mechanizmami obronnymi gospodarza i działaniem antybiotyków [29]. Białkiem endogennym, zapobiegającym przyleganiu bakterii do nabłonka pęcherza moczowego, jest uromodulina – produkowana w cewce dystalnej nefronu. Łącząc się z fimbrialnym białkiem FimF, do którego ma powinowactwo, uromodulina blokuje adhezję bakterii do

komórki nabłonkowej pęcherza. Niedostateczna skuteczność tego mechanizmu, sprzyja reakcji pałeczki okrężnicy z receptorem nabłonka wyścielającego układ moczowy. W konsekwencji, reakcja białka FimH z receptorem UP1a, włącza sygnał prowadzący do programowanej śmierci komórki, skutkujący wyeliminowaniem patogenów z organizmu przez złuszczenie warstwy komórek zainfekowanych w pęcherzu. W przypadku posiadania przez bakterie struktur wiążących receptory głębszych warstw komórek nabłonkowych odsłoniętych przez apoptozę, mechanizm ten zawodzi, prowadząc do rozprzestrzenienia się infekcji [30]. W przeciwieństwie do fimbrii typu I, mannozooporne fimbrie typu II (P, S, Dr) posiada zdecydowanie mniejszy odsetek szczepów uropatogennych. Najczęściej występujące z typu II – fimbrie P, za pośrednictwem dystalnego białka PapG tworzą wiązanie z resztami galaktozydowymi receptorów glikozydowych kanalików nerkowych. Ponadto fimbrie typu I i P wiążą się z receptorem TLR, rozpoznającym wzory molekularne patogenów, zlokalizowanym na komórkach odporności wrodzonej w drogach moczowych (np. makrofagach APC). Specyficzność tego wiązania oraz obecność bakteryjnego LPS, aktywuje odpowiedź zapalną w układzie moczowym. Lokalizacja stanu zapalnego w miedniczkach nerkowych jest zatem zależna od zainfekowania pałeczką okrężnicy z czynnikiem wirulencji w postaci fimbrii P, natomiast za stan zapalny pęcherza moczowego odpowiadają bakteryjne fimbrie typu I. Odmiedniczkowe zapalenie nerek – OZN, ale także posocznicę czy zapalenie opon mózgowo – rdzeniowych wywołują bakterie *E. coli* z fimbriami typu II – S. Za pośrednictwem białka SfaS wiążą reszty galaktozydowe receptorów zlokalizowanych w kanalikach nerkowych, kłębuszkach i nabłonku naczyniowym. Adhezja bakterii do komórki nabłonka jest aktywatorem wydzielania przez pałeczkę okrężnicy enzymów litycznych, które nadtrawiając otoczenie są przyczyną głębszej penetracji i zakażenia [31,32]. Fimbrie typu II – Dr, są

w głównej mierze winowajcą nawracających ZUM u kobiet ciężarnych. Tworzą one kompleksy z niefimbriowymi strukturami – adhezynami białkowymi Afa. Receptorem dla połączenia Afa/Dr są włókna kolagenu typu IV oraz DAF – czynnik chroniący tkanki gospodarza przed działaniem dopełniacza, zlokalizowany na nabłonku okrężnicy, w macicy i niskich odcinkach układu moczowego. Powtarzające się infekcje układu moczowego u ciężarnych są wynikiem fizjologicznego wzrostu ekspresji DAF w okresie ciąży [33]. Za szpitalne infekcje dróg moczowych, spowodowane instrumentacją układu moczowego, kolonizacją cewników urologicznych oraz tworzeniem biofilmu, odpowiedzialne są bakterie E. coli z czynnikiem wirulencji w postaci fimbrii typu III. W kanalikach nerkowych łączą się one z włóknami kolagenu V za pośrednictwem białka adhezyjnego MrkD [34]. Przyleganie do tworzyw sztucznych cewników, oraz nabłonka układu moczowego powoduje także obecność struktur niefimbriowych – AT. Adhezyny AT – wykazują powinowactwo do syntetyków oraz fibronektyny i lamininy pęcherza moczowego, prowadząc do tworzenia cewnikowego i pęcherzowego biofilmu. Wydzielane do otaczającego środowiska działają także jako toksyny bakteryjne [35]. Za reinfekcje układu moczowego odpowiedzialne są szczepy pałeczki okrężnicy z obecnością niefimbriowych adhezyn – Iha [36].

1.3 Podział i specyfika zakażeń układu moczowego

Drogi zakażenia. ZUM może rozwinąć się w skutek przeniesienia bakterii jelitowych w okolice błony śluzowej przedsionka pochwy oraz cewki moczowej i przemieszczenia ich do pęcherza, lub być konsekwencją bakteryjnego zakażenia krwi. Kolonizacja układu moczowego odbywa się głównie na drodze wstępującej ~ 98 % przypadków. Zakażenie krwiopochodne (hematogenne) bądź limfopochodne diagnozowane jest rzadko, prawie wyłącznie u pacjentów w ciężkim stanie klinicznym. Jest zakażeniem wtórnym do innego układu, spowodowanego najczęściej

przez *Staphylococcus aureus*, *Candida spp.*, *Salmonella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas spp.* i *Proteus spp.* [19,37].

Kryteria rozpoznania. ZUM klasyfikowane jest na podstawie wyników badania moczu i wywiadu z pacjentem, uwzględniającym występowanie lub brak objawów klinicznych, umiejscowienie zakażenia, oraz ocenę budowy anatomicznej i funkcjonalności dróg moczowych. Rozpoznanie opiera się na stwierdzeniu obecności czynnika etiologicznego stanu zapalnego dróg moczowych w badaniu ogólnym i mikrobiologicznym moczu. W przypadku etiologii bakteryjnej do rozpoznania ZUM konieczne jest określenie ilości bakterii w mililitrze wydalanego moczu. Pewną diagnozę ZUM potwierdza bakteriomocz znamieny, określany według poniższych kryteriów:

- a. $\geq 10^5$ j.t.k./ml u osób bez objawów klinicznych;
- b. $\geq 10^3$ j.t.k./ml u kobiet z objawami zapalenia pęcherza moczowego;
- c. $\geq 10^4$ j.t.k./ml u kobiet z objawami ostrego OZN;
- d. $\geq 10^3$ j.t.k./ml u mężczyzn z objawami ZUM;
- e. każda ilość bakterii w moczu pobranym przez nakłucie nadłonowe [1,23,37].

Bakteriomocz bezobjawowy. Bezobjawowe ZUM diagnozowane jest głównie u kobiet. Częstość jego występowania wzrasta wraz z wiekiem, w populacji kobiet po 80 roku życia wynosi 20 %. Jest częstą przypadłością ciężarnych ~ 10 %, dotyczy ~ 30 % kobiet z cukrzycą, rozpoznawany jest u sporego odsetka osób obu płci z uszkodzonym rdzeniem kręgowym i z cewnikiem. W większości przypadków czynnikiem etiologicznym izolowanym z moczu jest pałeczka okrężnicy [38]. Poza okresem ciąży bakteriomocz bezobjawowy nie jest wskazaniem do antybiotykoterapii [39].

Objawowe ZUM. Infekcji dróg moczowych towarzyszyć mogą ogólne i miejscowe objawy kliniczne. Gorączka jest symptomem ZUM u dzieci, występującym

także w 38 % przypadków zapalenia pęcherza moczowego u dorosłych, oraz w większości przypadków OZN [4,40]. Dysuria (trudność w oddawaniu moczu), stranduria (uczucie pieczenia w czasie mikcji), pollakisuria (częstomocz), nykturia (konieczność oddawania moczu w nocy), pyuria (ropomocz), ale także mimowolne oddawanie moczu są objawami zajęcia dolnego odcinka dróg moczowych – cewki i pęcherza moczowego. Zapalenie górnego odcinka układu moczowego – OZN – przebiegać może z objawami ze strony układu pokarmowego (nudności, wymioty), dreszczami oraz z bólami głowy. Ból w okolicy nadłonowej wskazuje na zapalenie pęcherza, w przypadku OZN lokalizuje się w okolicy lędźwiowej (objaw Goldflama). Objawem infekcji dróg moczowych może być także nieprzyjemny zapach moczu, wskazujący na inną niż bakteryjną etiologię ZUM [1,41].

Zakażenie dolnego odcinka układu moczowego. Dolny odcinek układu moczowego stanowi cewka i pęcherz moczowy. Stan zapalny zlokalizowany wyłącznie w obrębie cewki moczowej nie jest z definicji ZUM. Jest traktowany, jako schorzenie przenoszone drogą płciową, wywołane innymi patogenami – niebędącymi czynnikami etiologicznymi zapalenia pęcherza i nerek [42]. Zakażenie dolnego odcinka układu moczowego, diagnozowane głównie w populacji kobiet, to zazwyczaj współistniejące zapalenie cewki (urethritis) i pęcherza moczowego (cystitis). Rozwija się w konsekwencji upośledzenia mechanizmów obronnych zapobiegających infekcji dróg moczowych, a jego przebieg zależny jest od czynników wirulencji patogenów powodujących zakażenie [43]. Ryzyko wystąpienia infekcji cewki i pęcherza moczowego w dorosłym życiu, zwiększa się w okresie wzmożonej aktywności seksualnej, stosowania dopochwowych wkładek antykoncepcyjnych, ale także przypadku posiadania w historii chorób epizodu ZUM w dzieciństwie [44].

Zakażenie górnego odcinka układu moczowego. Dane statystyczne pokazują, że 1 na 28 przypadków (<5 %) niepowikłanego zapalenia pęcherza staje się przyczyną zakażenia górnego odcinka dróg moczowych [45]. Bakterie kolonizujące dolny odcinek układu moczowego, posiadające czynniki wirulencji wiążące poza receptorami pęcherzowymi, także receptory w strukturach nerek, przemieszczają się do górnych dróg moczowych, wywołując OZN. Do zajęcia miedniczek nerkowych dochodzi przez prawidłowe ujścia moczowodowo – pęcherzowe lub w przypadku istnienia wstecznego odpływu pęcherzowo – moczowodowego. Zakażenie nerek rozpoczyna się od rdzenia, przechodząc na przyległe części kory. Obecność patogenu w mięszu nerki powoduje rozwój stanu zapalnego i aktywację procesów immunologicznych, które zmieniając hemodynamikę narządu prowadzą do upośledzenia jego funkcji. Rzadko obserwuje się cechy niewydolności, istnieje jednak ryzyko rozwoju ostrego śródmięszowego zapalenia, będącego jedną z przyczyn ostrego poinfekcyjnego uszkodzenia nerek [46].

Niepowikłane ZUM. ZUM określa się mianem niepowikłanego (prostego), jeśli diagnozowane jest u kobiety w wieku przedmenopauzalnym, z prawidłową anatomią układu moczowego, oraz przy braku chorób upośledzających prawidłowy odpływ moczu i funkcję dróg moczowych. Zarówno zapalenie dolnego jak i górnego odcinka układu moczowego może przebiegać, jako niepowikłane ZUM [47].

Powikłane ZUM. Każda infekcja dróg moczowych, powinna być traktowana, jako potencjalnie powikłana, do czasu wykluczenia czynników predysponujących do rozwoju, przewlekania i nawracania ZUM [48]. Powikłane (wtórne) ZUM rozwija się najczęściej u pacjentów z anatomicznymi lub czynnościowymi dysfunkcjami układu moczowego. Diagnozowane jest, gdy obecności znamiennej bakteriurii towarzyszy dodatkowo, co najmniej jeden z poniżej wymienionych czynników:

- a. zmiany anatomiczne i/lub zaburzenia czynnościowe w układzie moczowym;
- b. płeć męska;
- c. starszy wiek;
- d. stan po transplantacji nerki;
- e. obecność ciała obcego w drogach moczowych;
- f. oporność na antybiotyki drobnoustroju wywołującego ZUM;
- g. niewydolność nerek;
- h. nawracające ZUM;
- i. wcześniejsza instrumentacja układu moczowo – płciowego;
- j. objawy ZUM utrzymujące się dłużej niż 14 dni;
- k. ciąża;
- l. choroby współistniejące;
- m. antybiotykoterapia w okresie ostatnich trzech miesięcy;
- n. obniżona odporność [47,49].

Nawracające ZUM. Nawracające ZUM jest częstą przypadłością młodych, aktywnie seksualnych kobiet. Infekcją nawracającą, określa się wystąpienie ZUM, co najmniej 2 razy w roku u płci żeńskiej powyżej 5 roku życia [50]. Jeżeli ponowne pojawienie się objawów ostrych wystąpiło do trzech tygodni po zakończonej antybiotykoterapii, wtedy ZUM definiowane jest, jako nawrót. Przyczyną wystąpienia nawrotu jest niewłaściwe leczenie przeciwdrobnoustrojowe, a objawy kliniczne są konsekwencją kolonizacji dróg moczowych przez nieskutecznie wyeliminowany patogen. Wystąpienie objawów ostrych po upływie trzech tygodni od zakończonego leczenia przeciwdrobnoustrojowego definiowane jest, jako reinfekcja (ponowne ZUM). Jej przyczyną jest ponowne zakażenie innym, lub tym samym patogenem wywołującym wcześniejsze objawy infekcji dróg moczowych. Szacuje się, że

nawracające ZUM występuje u ok. 20 % pacjentek po pierwszym epizodzie niepowikłanego ZUM [51].

Przewlekłe ZUM. Do przewlekłych schorzeń układu moczowego zalicza się przewlekłe zapalenie pęcherza oraz przewlekłe OZN. Podstawą do zdiagnozowania przewlekłego zapalenia pęcherza są utrzymujące się dłużej niż 2 tygodnie objawy infekcji pęcherza lub nawroty tej infekcji, występujące co najmniej 2 razy w miesiącu w półrocznym okresie czasu. Przewlekłe OZN rozwija się w konsekwencji bakteryjnego zakażenia narządu i jest procesem postępującym mimo skutecznej eradykacji drobnoustroju. Stan zapalny w nerce, przez zajęcie mięszu i cewek nerkowych, upośledza pracę nerki wpływając m.in. na funkcję zagęszczania moczu przez uszkodzenie mechanizmu wzmacniacza przeciwpęcherzowego. Wydalanie jego zwiększonej ilości jest pierwszym niepokojącym pacjentów objawem choroby, która aż w 25 % prowadzi do przewlekłej niewydolności nerek. Zarówno przewlekłe zapalenie pęcherza, jak i przewlekłe OZN mogą być poprzedzone wystąpieniem objawów ostrych, lub też od początku rozwijać się podstępnie, jako zapalenia przewlekłe [52]. W patogenezie przewlekłego zapalenia pęcherza oraz nawracających epizodów ZUM coraz częściej uwagę poświęca się roli biofilmu. Biofilm to wielokomórkowa struktura utworzona przez mikrokolonie bakterii zarówno Gram – ujemnych i Gram – dodatnich, otoczonych warstwą trójwymiarowej macierzy – EPS. Macierz tą budują polisacharydy, białka, kwasy nukleinowe i zagęszczone metabolity drobnoustrojów, dzięki którym możliwy jest rozwój mikroorganizmów i ochrona przed mechanizmami obronnymi gospodarza oraz lekami. Biofilm utrudnia antybiotekom penetrację w głąb trójwymiarowej struktury uniemożliwiając oddziaływanie na zlokalizowane w nim komórki. Stanowi, więc przyjazne i stabilne środowisko życia ułatwiające kontakt i wzajemne interakcje bakterii oraz dodatkowo

umożliwia przetrwanie w niesprzyjających warunkach [53]. Do powstawania biofilmu przyczyniają się niekorzystne dla życia bakterii zmiany w środowisku. Wśród nich wymienia się: zmniejszenie dostępności składników odżywczych, spadek lub wzrost temperatury, zmiana pH środowiska, zwiększenie stężenia reaktywnych form tlenu, działanie środków dezynfekcyjnych czy antybiotyków [54]. Powstawanie biofilmu bakteryjnego jest czynnikiem pogarszającym rokowania, skutkującym wydłużeniem czasu potrzebnego do eradykacji zakażenia. Utrudniona lub niemożliwa penetracja antybiotyków do kolejnych warstw trójwymiarowej macierzy, w znacznym stopniu komplikuje proces leczenia wielu schorzeń, w tym zapalenia pęcherza. Badania wykazały, że komórki mikroorganizmów stanowiące część biofilmu są ok. 1000 razy bardziej odporne na działanie związków przeciwdrobnoustrojowych, niż formy planktoniczne [55]. Ze względu na ten fakt, leczenie przewlekłego zapalenia pęcherza poza standardowo zalecaną antybiotykoterapią doustną, wiąże się czasami z koniecznością zastosowania leczenia dopęcherzowego.

Urosepsa. Najgroźniejszą dla życia i zdrowia pacjenta postacią ZUM jest posocznica moczopochodna – urosepsa. Do jej rozwinięcia dochodzi z powodu przedostania się do krwioobiegu bakterii kolonizujących układ rozrodczy i drogi moczowe. Może być konsekwencją zarówno niepowikłanej jak i powikłanej infekcji, dolnego lub górnego odcinka układu moczowego [56]. Do czynników predysponujących do rozwinięcia posocznicy moczopochodnej należą: nieprawidłowości anatomiczne układu moczowego, starszy wiek, stan po transplantacji nerki, AIDS, leczenie immunosupresyjne i terapia przeciwnowotworowa. Ryzyko zachorowania zwielokrotnia się w przypadku pacjentów hospitalizowanych, cewnikowanych długoterminowo, z ZUM, którego czynnikiem etiologicznym jest szczep lekooporny [57,58]. W 50 % przypadków

izolowanym z krwi i moczu czynnikiem etiologicznym jest pałeczka okrężnicy. Śmiertelność w grupie pacjentów z rozpoznaną urosepsą wynosi ~ 40 % [59].

1.3.1 Odmiedniczkowe zapalenie nerek

Etiopatogeneza OZN. OZN rozwija się w konsekwencji bakteryjnego niepowikłanego lub powikłanego zakażenia dolnego odcinka układu moczowego. Grupą o najwyższym odsetku zachorowalności są kobiety między 15 a 29 rokiem życia, następnie niemowlęta i osoby starsze. W ponad 80 % przypadków czynnikiem etiologicznym izolowanym z moczu pacjentów jest pałeczka okrężnicy [60]. Czynnikiem ryzyka predysponującymi do zachorowania na OZN jest ciąża, wzmożona aktywność seksualna, przebyte w ciągu ostatniego roku ZUM, cukrzyca, wysiłkowe nietrzymanie moczu, korzystanie ze środków plemnikobójczych, ale także zakażenia dróg moczowych w historii chorób matki pacjentki [61]. Ostra postać choroby, zajmując jedną lub obie nerki, może manifestować się bólami w okolicy lędźwiowej, objawami ze strony przewodu pokarmowego, temperaturą i dolegliwościami dysurycznymi. W 30 – 50 % przypadków ostrego zapalenia pęcherza, ostre OZN przebiega subklinicznie, pozostając niezdiagnozowane [1]. W przeciwieństwie do niepowikłanego, powikłane ostre OZN charakteryzuje się szerszym spektrum objawów klinicznych i zwiększonym ryzykiem wystąpienia komplikacji, takich jak ropnie nerki [62]. Przewlekłe OZN zazwyczaj przebiega bezobjawowo lub skąpoobjawowo prowadząc do nieodwracalnego uszkodzenia i przewlekłej niewydolności nerek – PNN.

Patomorfologicznie ostre bakteryjne OZN klasyfikowane jest jako ostre cewkowo – śródmiąższowe zapalenie nerek – CŚZN. Charakteryzuje się gwałtownym pogorszeniem funkcji narządu, spowodowanym naciekiem zapalnym – głównie granulocytarnym – w obrębie śródmiąższu i cewek nerkowych [63]. Strukturę

śródmiażdżową nerek budują komórki typu I, II oraz makrofagi i komórki dendrytyczne. Komórki te odpowiadają za syntezę i rozkład macierzy pozakomórkowej, oraz produkcję erytropoetyny i prostaglandyn. Podtrzymują one struktury nefronu, odpowiadają za fagocytozę i prezentację antygenów komórkom układu odpornościowego, stanowią drogę transportu elektrolitów. Łącznie – cewki nerkowe i część śródmiażdżowa zajmują około 80 % objętości narządu i określane są czynnościowo, jako przedział cewkowo – śródmiażdżowy [64]. OZN w początkowym etapie choroby ogranicza się jedynie do cewek i komórek śródmiażdżowych, nie obejmując przy tym naczyń krwionośnych ani kłębuszków nerkowych. Reakcja immunologiczna ma charakter komórkowy, z wydzielaniem przez granulocyty, limfocyty, makrofagi i plazmocyty cytokin prozapalnych. Zapalenie określa się mianem ropnego z występowaniem zmian w korze i pasmowatych międzykanalikowych nacieków zapalnych w piramidach. Etapem końcowym zmian zachodzących w narządzie jest ostre uszkodzenie nerek – OUN [65].

Ostre CŚZN w 70 % przypadków jest konsekwencją reakcji nadwrażliwości na leki. Może rozwinąć się również w wyniku zakażenia dolnego odcinka układu moczowego, uogólnionej infekcji bakteryjnej, wirusowej, pierwotniakowej, chorób immunologicznych oraz chorób kłębuszków nerkowych. Niekiedy nie można ustalić przyczyny jego wystąpienia [66]. U ~ 60 % pacjentów ostra postać choroby jest całkowicie odwracalna, często ogranicza się jedynie do monitorowania stanu chorego lub wprowadzenia leczenia nerkozastępczego. W 40 % wszystkich przypadków CŚZN ostra postać choroby przechodzi w stadium przewlekłe, prowadząc do PNN [67,68].

Modele doświadczalne OZN. W modelach doświadczalnego OZN, wykorzystuje się zarówno wstępującą jak i krwiopochodną drogę rozwoju zakażenia. Procedury mające na celu wywołanie choroby polegają na:

- a. indukcji wstępującego ZUM przez przezcewkowy wlew czynnika etiologicznego [69,70];
- b. dopęcherzowym (przez odsłonięcie powłok brzusznych) podaniu czynnika etiologicznego [71,72];
- c. wprowadzeniu czynnika etiologicznego bezpośrednio do mięszu nerki [73-75];
- d. dożylnym podaniu patogenu [76,77].

Model wstępującego ZUM, polegający na przezcewkowym wlewie patogenu (a.) najdokładniej odzwierciedla patogenezę OZN występującego u ludzi. Procedura poza znieczuleniem ogranicza się do cewnikowania dróg moczowych, przez co minimalizuje możliwość pojawienia się komplikacji. Niska inwazyjność zabiegu i brak konieczności naruszenia struktury narządu, eliminuje ryzyko wystąpienia powikłań. W porównaniu do powyższego modelu, dopęcherzowa iniekcja czynnika etiologicznego (b.) obarczona jest większym ryzykiem komplikacji. Wymagająca odsłonięcia powłok brzusznych procedura, może skutkować zakażeniem rany pooperacyjnej, zakłócając okres rekonwalescencji i zaburzając obraz choroby. Z ryzykiem wystąpienia najpoważniejszych powikłań w postaci krwaków, krwawienia z układu moczowego, uszkodzenia innych narządów oraz powstania przetoki tętniczo – żyłnej w nerce związany jest model, w którym rozwój OZN jest wynikiem wprowadzenia patogenu wprost do mięszu nerki (c.). W kolejnym modelu, dożylne podanie patogenu (d.) powoduje rozwój zakażenia ogólnoustrojowego – sepsy, którego OZN jest konsekwencją. Model ten, w przeciwieństwie do wywołujących izolowane OZN (a, b, c) daje możliwość monitorowania przebiegu choroby, będącej wynikiem zakażenia drogą krwiopochodną.

1.4 Ostre uszkodzenie nerek – OUN

Etiopatogeneza OUN. Ostre uszkodzenie nerek – OUN to zespół kliniczny gwałtownego upośledzenia funkcji nerek objawiający się wzrostem stężenia kreatyniny w surowicy i zaburzeniami diurezy, klasyfikowany na podstawie kryteriów KDIGO. Może rozwinąć się w konsekwencji choroby nerek o różnej etiologii, być skutkiem zmniejszenia perfuzji narządu wywołanej spadkiem objętości krwi krążącej, uszkodzenia toksycznego lub utrudnionego odpływu moczu.

Czynnikami ryzyka predysponującymi do rozwoju tego schorzenia jest podeszły wiek, cukrzyca, przewlekła choroba nerek, sepsa, niewydolność krążenia, zabiegi operacyjne oraz spożywanie substancji nefrotoksycznych. Ze względu na starzenie się populacji, przedłużenie życia osób przewlekle chorych i zwiększenie wykrywalności, z roku na rok odnotowuje się coraz więcej pacjentów z OUN. Dane z 2010 roku pokazują, że na terenie Stanów Zjednoczonych rocznie diagnozuje się ok. 600 tys. przypadków OUN [78]. Najczęściej OUN rozpoznaje się u pacjentów po zabiegach kardiochirurgicznych, przebywających na oddziałach intensywnej opieki medycznej (8 – 42 % pacjentów OIOM), oraz u pacjentów po podaniu radiologicznego środka cieniującego [79].

Podstawą do zdiagnozowania OUN jest spełnienie, co najmniej jednego z poniższych kryteriów rozpoznania [80]:

- a) wzrost stężenia kreatyniny w surowicy $\geq 0,3\text{mg/dl}$ ($26,5\text{ }\mu\text{mol/l}$) w czasie 48h;
- b) 1,5 – krotny wzrost stężenia kreatyniny w surowicy w przeciągu 7 dni;
- c) diureza mniejsza niż $0,5\text{ml}$ moczu/kg masy ciała/h monitorowany przez 6h.

Stopień zaawansowania OUN w skali trójstopniowej, określa się na podstawie wzrostu poziomu kreatyniny w surowicy krwi do wartości wyjściowej i wielkości diurezy. Wyższy stopień zaawansowania wiąże się z gorszym rokowaniem (1 stopień –

śmiertelność 10 %, 3 stopień – śmiertelność 50 %), zmniejszeniem prawdopodobieństwa powrotu funkcji nerek do stanu z przed OUN (15 % chorych po OUN wymaga dializoterapii), oraz zwiększonym ryzykiem rozwoju PNN (50 % pacjentów, którzy przeżyli OUN rozwija PNN) [81].

W zależności od czynnika etiologicznego, wyróżnia się trzy postacie kliniczne OUN: przednerkową (~ 80 % przypadków), nerkową oraz zanerkową (w sumie ~ 20 % przypadków). Niezależnie od postaci, przebieg OUN wygląda następująco:

- a) etap wstępny, trwający minuty lub godziny, to czas od momentu zadziałania czynnika uszkadzającego nerkę do momentu wystąpienia uszkodzenia;
- b) etap wzrostu kreatyninemii, bezmoczu lub skąpomoczu trwa od 10 do 14 dni;
- c) etap wielomoczu i regeneracji nerek trwa od kilku dni do kilku tygodni;
- d) etap zdrowienia trwa kilka miesięcy.

Objawy kliniczne OUN zależą od przyczyny wystąpienia uszkodzenia i chorób towarzyszących. OUN może przebiegać z prawidłową diurezą, mieć ciężki, łagodny a nawet bezobjawowy przebieg [82].

W przednerkowej postaci OUN, spadek GFR i wzrost kreatyniny w surowicy w głównej mierze są konsekwencją zmniejszonej perfuzji narządu. Bezmocz lub skąpomocz, będące objawami OUN, wynikają z uruchomienia fizjologicznych mechanizmów zapobiegających utracie wody i soli z organizmu [83]. W przypadku utrudnionego odpływu moczu za zwiększony poziom kreatyniny i zaburzenia diurezy odpowiada wewnątrzcewkowy wzrost ciśnienia. Jest on przyczyną obkurczenia naczyń nerkowych i spadku GFR. Uszkodzenie narządu pogłębiają dodatkowo produkowane przez komórki stanu zapalnego cytokiny i wolne rodniki [84].

W konsekwencji braku usunięcia przyczyny i przedłużającej się przednerkowej lub zanerkowej postaci choroby dochodzi do rozwinięcia nerkowej komponenty OUN [85].

OUN jako konsekwencja ZUM. Do nerkowych przyczyn wystąpienia OUN zalicza się m.in. choroby cewkowo – śródmiąższowe, w tym OZN będące najczęściej konsekwencją zakażenia bakteryjnego. W przebiegu OZN ryzyko wystąpienia OUN u pacjenta zwiększa się w przypadku powikłanego przebiegu zakażenia, głównie spowodowanego anomaliami anatomicznymi układu moczowego, długoterminowym cewnikowaniem, immunosupresją, ciążą, oraz brakiem jednej nerki [86, 87]. Dane pokazują, że OUN rozwija ~ 2 – 3 % dorosłych pacjentów z powikłanym OZN [88].

W OUN wynikającym z zakażenia górnego odcinka układu moczowego, mechanizm prowadzący do wzrostu kreatyniny i zaburzenia diurezy polega na ograniczeniu przepływu krwi przez nerkę pod wpływem cytokin prozapalnych, produkowanych przez nagromadzone w miejscu zapalenia komórki układu białokrwinkowego. Cytokiny działając naczynioobkurczająco na tętniczkę doprowadzającą lub naczyniorozszerzającą na tętniczkę odprowadzającą kłębuszka nerkowego powodują spadek ciśnienia filtracyjnego. Spadek GFR jest przyczyną zmian w obrębie cewek, polegających na rozpadzie aktywnego cytoszkieletu nabłonka, rozluźnienia połączeń międzykomórkowych, zaburzenia funkcji integryn oraz złuszczenia nabłonka do światła cewek [89, 90]. Przez uszkodzone błony cewek nasila się wchłanianie zwrotne moczu pierwotnego (moczenie się nerki do nerki), wzmagając obrzęk tkanki śródmiąższowej. Konsekwencją zatkania cewek przez wałeczki powstałe z uromoduliny i komórki złuszczonego nabłonka jest wzrost ciśnienia hydrostatycznego wewnątrz cewek. Upośledza on przesączanie kłębuszkowe, które dodatkowo ograniczone jest przez zmiany wsteczne w obrębie miocytów i

śródbłónka naczyń krwionośnych. Niedokrwienie narządu nasila się także ze względu na przewagę produkcji związków tkankowych o działaniu wazopresyjnym (endotelina, tromboksany) nad wazodylatacyjnym (NO, prostacyklina) [91]. Do regeneracji komórek nabłonkowych cewek dochodzi w ostatnim etapie OUN, w którym miejsca po złuszczonego nabłonku zastępowane są komórkami różnicującymi się z komórek macierzystych pnia [92]. Proces odbudowy tkanek jest długotrwały. Może prowadzić do całkowitego powrotu funkcji nerki do stanu z przed uszkodzenia, jednak prawie w połowie przypadków OUN jest przyczyną trwałego upośledzenia funkcji narządu.

1.5 Laboratoryjna ocena czynności nerek

Ocena wydolności nerek zajętych procesem chorobowym opiera się na analizie laboratoryjnej parametrów moczu i krwi, diagnostyce obrazowej oraz badaniu materiału biopsyjnego. Badania pozwalają określić stopień uszkodzenia narządu, oraz służą monitorowaniu leczenia. Analizy laboratoryjne stosowane w diagnostyce funkcji nerek polegają na: pomiarze w surowicy i moczu stężeń substancji wydalanych przez nerki, badaniach czynnościowych nerek, oraz fizyko – chemicznym i morfologicznym badaniu moczu. W schorzeniach układu moczowego, znajomość zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami ww. analiz, jest kluczowym elementem służącym postawieniu prawidłowej diagnozy. Pełen obraz funkcji nerek daje zestawienie wyników ogólnego i specjalistycznego badania moczu wraz z wynikami badań krwi, badań obrazowych i histopatologicznych.

1.5.1 Ogólne, specjalistyczne i mikrobiologiczne badanie moczu

Badanie ogólne moczu. Badanie ogólne moczu jest jedną z najczęściej wykonywanych analiz laboratoryjnych. Przemawia za tym łatwość pozyskania materiału do badania, diagnostyczne znaczenie wyników i niewielki koszt usługi. W diagnostyce chorób nerek i dróg moczowych badanie ogólne moczu jest badaniem

przesiewowym, pozwalającym na wykrycie patologii jeszcze w okresie bezobjawowym. Służy określeniu fizyko – chemicznych właściwości moczu (badanie metodą paskową) i identyfikacji znajdujących się w nim elementów morfotycznych (badanie mikroskopowe). Wykonuje się go głównie w laboratoriach medycznych w pracowni analitycznej, ale także na OIOM – ach jako badanie POCT. Po odpowiednim poinstruowaniu, badanie moczu po części może zostać wykonane samodzielnie w domu pacjenta.

Poranną próbkę moczu do analizy ogólnej pozyskuje się głównie w trakcie mikcji, oraz zabiegów: cewnikowania lub przez nakłucie nadłonowe. Analiza odbywa się przy użyciu wieloparametrowych testów paskowych, wykrywających jednocześnie albuminę, azotyny, bilirubinę, ciała ketonowe, ciężar właściwy, erytrocyty, glukozę leukocyty, pH, urobilinogen, ale także kwas askorbinowy. Reakcja chemiczna odczynników umieszczonych na pasku testowym ze związkami zawartymi w moczu, prowadzi do zmiany zabarwienia pola testowego. Wyniki otrzymuje się przez odczytanie za pośrednictwem analizatora lub wzroku, zmiany zabarwienia pól reakcyjnych. Mikroskopowe badanie osadu, polegające na policzeniu w kilku polach widzenia elementów morfotycznych moczu (krwinek białych, czerwonych, komórek nabłonkowych, wałeczków, śluzu, bakterii, kryształów) jest kolejnym etapem analizy. Wyniki tego badania pozwalają ustalić pochodzenie erytrocytów i komórek nabłonkowych, oraz przed wykonaniem badania mikrobiologicznego bliżej określić przyczynę infekcji (bakterie, grzyby, pierwotniaki) [93,94]. Wyniki badania ogólnego moczu dają podstawę do postawienia wstępnej diagnozy chorób nerek, chorób uwarunkowanych genetycznie (specyficzny zapach), chorób metabolicznych w tym także cukrzycy. Wyniki nieprawidłowe kwalifikują pacjenta do wykonania badań

specjalistycznych, przeprowadzanych głównie w oparciu o dobową zbiórkę moczu i biochemiczną analizę jego zawartości.

Specjalistyczne badanie moczu. Specjalistyczne badania moczu polegają na analizie jakościowej, służącej stwierdzeniu obecności danej substancji w moczu, lub analizie ilościowej, czyli pomiarze stężenia substancji czy też wydalania dobowego. Badania te, wykonywane są w automatycznych analizatorach, wyłącznie w laboratorium medycznym w wyspecjalizowanych pracowniach biochemii, toksykologii i immunochemii. Do grupy badań specjalistycznych zalicza się: pomiar GFR, wydalanie dobowe elektrolitów, związków azotu, albuminy, białek specyficznych moczu, hormonów, leków, środków narkotycznych, toksyn i związków powstałych w wyniku wrodzonych zaburzeń metabolicznych. Prawidłowo przeprowadzona dobową zbiórka moczu, w której porcja moczu porannego jest odrzucona, a każda następna wraz z ostatnią porcją przypadającą na 24 – tą godzinę trwania zbiórki oddana jest do pojemnika, to klucz do uzyskania wiarygodnych wyników ww. badań [95].

W ocenie sprawności filtracyjnej nerek, produkty metabolizmu azotowego – kreatynina, mocznik, kwas moczowy – są parametrami należącymi do grupy najczęściej analizowanych w dobowej zbiórce moczu. Znajomość stężenia kreatyniny w moczu i surowicy, oraz ilości moczu wydalonego w ciągu doby pozwala na wyliczenie klirensu tej substancji, czyli ilości osocza oczyszczanego przez nerki z kreatyniny w jednostce czasu. Za istotnym w klinice znaczeniem tego parametru przemawia fakt, że jest on miarą GFR, a jego spadek zawsze świadczy o malejącej liczbie czynnych nefronów i spadku wydolności narządu. Analizę wydalania kwasu moczowego wykonuje się m.in. w celu wykrycia i monitorowania przebiegu OUN. Towarzyszący temu schorzeniu spadek GFR, skutkuje wzrostem stężenia kwasu

moczowego w surowicy i zmniejszeniem wydalania z moczem. Prowadzi to do krystalizacji kwasu w nerce i niedrożności kanalików nerkowych. Proces ten powoduje zaostrenie miejscowego stanu zapalnego i pogorszenie funkcji narządu. Ze względu na te właściwości, kwas moczowy jest markerem wykrywania i oceny rozwoju OUN. Analiza wydalania mocznika służy m.in. różnicowaniu przyczyn OUN, oraz ustalenia pochodzenia azotemii (stosunek stężenia mocznika wydalanego z moczem do stężenia w surowicy) [96].

Do równie ważnych i często wykonywanych badań specjalistycznych, oceniających integralność i funkcję filtracyjną nerek, należy pomiar ilości białka wydalanego z moczem. Fizjologicznie, białko – głównie albumina i uromodulina – wydalane jest w ilości nieprzekraczającej 150 mg/24h. Taka ilość białka jest niewykrywalna rutynową, paskową metodą badania moczu. Pozytywny wynik testu paskowego uzyskuje się dopiero przy utracie albuminy powyżej 200mg/l. Mniejsze ilości białka w moczu (mikroalbuminuria) – świadczące o wczesnym stadium choroby nerek (nefropatii cukrzycowej, nadciśnieniowej) – wykrywa się jedynie przy użyciu automatycznych analizatorów i metod immunochemicznych [97]. Wzrost stężeń pewnych specyficznych białek w moczu może świadczyć nie tylko o utracie integralności struktur nerek, ale także o procesie ostrego uszkodzenia narządu. NGAL, KIM-1, oraz CYR61 to białka określane mianem markerów OUN. Analiza ich wydalania z moczem ma służyć wczesnemu wykrywaniu, ocenie intensywności przebiegu i rokowania np. u pacjentów na OIOM – ach obarczonych największym ryzykiem wystąpienia tego schorzenia [98]. Przyczynę i miejsce ucieczki białek do moczu, ustalić można przez zastosowanie techniki elektroforezy i ocenę selektywności. Na podstawie frakcji białek uzyskanych w rozdziale, stwierdza się czy utrata następuje przez uszkodzoną błonę filtracyjną kłębuszków nerkowych (frakcja

albuminy, transferyny i gamma-globulin), cewki (frakcja α 1- i β 2-mikroglobuliny), czy też obecność białek w moczu jest skutkiem rozrostu nowotworowego (frakcja łańcuchów lekkich gamma-globulin) [99].

Zajęcie nerek przez proces chorobowy wiąże się z rozregulowaniem mechanizmów odpowiedzialnych za właściwy poziom elektrolitów. Sytuacja ta zmusza do kontroli poziomu elektrolitów w surowicy, ale także w moczu. Nerki są najważniejszym narządem regulującym gospodarkę sodowo – potasową organizmu. W przypadku ich dysfunkcji obserwuje się dyselektrolitemie (m.in. hiperkaliemia, hiponatremia), spowodowaną zmniejszonym wydalaniem potasu oraz utratą sodu z moczem.

Badanie mikrobiologiczne moczu. Badanie mikrobiologiczne moczu jest nieodzownym elementem diagnostyki i leczenia ZUM, wykonywanym również w celu ustalenia infekcyjnego czynnika OUN. Pozwala na wyizolowanie patogenu odpowiedzialnego za stan zapalny dróg moczowych, oraz oszacowanie liczebności bakterii w mililitrze moczu – kryterium rozpoznania ZUM. Na podstawie wyniku zawierającego opis gatunku patogenu i antybiogramu, możliwe jest wdrożenie właściwego leczenia, minimalizującego niepowodzenie terapii. Wiarygodność wyników zwiększa się przy właściwym pobraniu próbki, polegającym na pozyskaniu moczu ze środkowego strumienia po wcześniejszym oczyszczeniu okolic cewki moczowej.

Wykonanie badania polega na wysianiu moczu na płytkę z krwią baranią, do izolacji drobnoustrojów o różnych wymaganiach wzrostowych oraz płytkę z podłożem Mac Conkey'a, przeznaczoną do wzrostu pałeczek Enterobacteriaceae. Płytki te, umieszcza się w warunkach tlenowych w temperaturze zapewniającej wzrost drobnoustrojów, następnie identyfikuje się oraz zlicza kolonie bakterii, które wyrosły

na odpowiednich podłożach wzrostowych. W celu szczegółowej identyfikacji drobnoustrojów, poza wzrokową oceną płytek, stosuje się również testy biochemiczne oraz barwienia mikroskopowe. Po wyizolowaniu i identyfikacji czynnika etiologicznego ZUM, w kolejnym etapie badania określa się jego wrażliwość na antybiotyki, najczęściej wykorzystując metodę testu krążkowego. Polega ona na pomiarze obszaru zahamowania wzrostu bakterii wokół krążka lub paska nasączonego antybiotykiem, na płytce z wysianą określoną ilością wyizolowanych uprzednio bakterii. Na podstawie wielkości tej strefy określa się wrażliwość lub oporność wyizolowanego patogenu na antybiotyki [100]. W ZUM zastosowanie terapii celowanej dobranej na podstawie wyniku antybiogramu zwiększa szansę powodzenia leczenia, minimalizuje ryzyko reinfekcji i wystąpienie powikłań.

1.5.2 Badania biochemiczne krwi

Ważnym elementem laboratoryjnej oceny funkcji nerek jest biochemiczna analiza surowicy, polegająca przede wszystkim na pomiarze stężeń substancji wydalanych w głównej mierze przez nerki. Adekwatnie do DZM, w surowicy najczęściej oznaczanymi parametrami są produkty metabolizmu azotowego, elektrolity oraz białko. Uzyskanie pełnego obrazu stanu narządu możliwe jest tylko wtedy, gdy analiza moczu zestawiona zostaje z wynikami analiz krwi. Znajomość stężeń substancji w surowicy i w moczu pozwala dodatkowo na obliczenie szeregu parametrów, służących m.in. określeniu przyczyn niewydolności narządu.

Produkty metabolizmu azotowego. W diagnostyce laboratoryjnej chorób nerek zastosowanie znalazła analiza stężeń produktów metabolizmu azotowego. Za użytecznością tych związków, przemawia fakt, że eliminowane są z organizmu głównie przez nerki (~ 100 % kreatynina, ~ 90 % mocznik, ~ 70 % kwas moczowy),

oraz wzrost stężenia tych substancji w surowicy, przy równoczesnym zmniejszeniu wydalania z moczem świadczy o upośledzeniu funkcji filtracyjnej narządu.

Oznaczenie kreatyniny w surowicy krwi, przy równoczesnym pomiarze wydalania kreatyniny z moczem jest podstawą obliczenia najistotniejszego parametru funkcji nerek – GFR. Ze względu na to, że kreatynina wydzielana jest z organizmu tylko drogą nerek, a jej stężenie we krwi ujemnie koreluje z wielkością GFR, uznawana jest za marker filtracyjnej funkcji narządu. Istnieją wzory, za pośrednictwem których możliwe jest wyliczenie wartości GFR tylko w oparciu o stężenie kreatyniny w surowicy (wzór Cockrofta – Gaulta, MDRD). Powinny one służyć jedynie wykonaniu badań przesiewowych, gdyż stają się nieużyteczne np. w OUN, u pacjentów z bezmoczem, dzieci, lub gdy Cl_{kr} jest mniejszy niż 10ml/min [101]. Pomiar stężenia kreatyniny w surowicy jest ważnym elementem diagnostyki, także ze względu na obecność tego parametru w wielu wzorach mających na celu określenie postaci klinicznej OUN (FENa, FEK, FEUrea, RFI, współczynników: $Krea_U/Krea_P$, $Urea_P/Krea_P$). Oznaczenie stężenia mocznika w surowicy służy podobnie jak oznaczenie kreatyniny różnicowaniu przyczyn azotemii w OUN, ale także wskazaniem do badania jest ocena nasilenia toksemii mocznicowej u pacjentów z niewydolnością nerek i u chorych dializowanych. Wzrost stężenia tych metabolitów w surowicy występuje dopiero wówczas, gdy dojdzie do znacznej utraty czynnych nefronów, a GFR obniży się o połowę [102].

U pacjentów z upośledzoną funkcją filtracyjną nerek, poza wzrostem kreatyniny i mocznika w surowicy, dochodzi do zwiększenia stężenia kwasu moczowego. Hiperurykemia prowadzi do uszkodzenia śródbłonna, spadku produkcji NO, zwiększenia ciśnienia w kłębuszku nerkowym, a w konsekwencji do jego przerostu i szkliwienia. Ze względu na swoje właściwości, kwas moczowy należy do

istotnych parametrów diagnostyki funkcji nerek, oraz jest markerem ostrego uszkodzenia narządu. Podniesienie jego poziomu może świadczyć o procesie chorobowym nerki, ale także jest czynnikiem inicjującym produkcję prozapalnych cytokin, wywołujących progresję już obecnej nefropatii [103].

Elektrolyty. W nerce objętej procesem zapalnym za upośledzony transport jonów odpowiedzialne są mediatory stanu zapalnego. Zaburzenia elektrolitowe wynikają z redukującego wpływu IL-1 i PGE2 na aktywność Na-K-ATPazy, oraz wpływu prostaglandyn na hemodynamikę narządu [104-106]. Dyselektrolitemia w przebiegu chorób nerek może prowadzić do szeregu powikłań, m.in. zaburzeń rytmu serca, a także porażennej niedrożności jelit. Hiperkaliemia jest najczęściej występującą przyczyną zgonów w przebiegu OUN, dlatego też takie parametry jak potas i sód są monitorowane na bieżąco w przebiegu tego stanu chorobowego, ale także w przebiegu chorób nerek o odmiennej etiologii [82].

Białko. Białko całkowite i albumina należą do grupy regularnie monitorowanych parametrów u pacjentów z chorobami nerek. Albumina jest białkiem wydalany w największym stopniu przez nerki objęte procesem chorobowym. Jej funkcja w organizmie polega na utrzymaniu prawidłowego ciśnienia onkotycznego i transporcie szeregu substancji. Zmniejszenie poziomu tego białka w surowicy do wartości poniżej 20g/L jest stanem zagrażającym życiu w skutek głębokiej hipowolemii. Z tego też powodu, oznaczenie poziomu albuminy nie tylko w moczu, ale i w surowicy jest istotnym elementem diagnostyki i znalazło zastosowanie w laboratoryjnej ocenie funkcji nerek. Nerkowe zespoły utraty białka prowadzące do obniżenia poziomu białka całkowitego to przede wszystkim zespół nerczycowy, prawie w 80 % przypadków wywołany KZN, nefropatia cukrzycowa, nefropatia toczniowa oraz amyloidoz nerek [107].

Markery ostrego uszkodzenia nerek. Rutynowo wykonywanym oznaczeniem w laboratorium medycznym, które daje klinicyście podstawę do rozpoznania OUN według kryteriów KDIGO jest pomiar stężenia kreatyniny. Zazwyczaj uzupełniony zostaje on o analizę stężeń końcowych produktów przemiany związków azotowych – mocznika i kwasu moczowego oraz pomiar diurezy. Niestety, wzrost stężenia kreatyniny obserwowany jest nie tylko przy znacznym upośledzeniu funkcji nerek wywołanym ich ostrym uszkodzeniem [108]. Poziom tego metabolitu zależy również od stanu nawodnienia, wieku, płci oraz diety stosowanej przez pacjenta. Z tego powodu, kreatynina nie spełnia kryteriów markera specyficznego wyłącznie dla OUN. Alternatywą dla kreatyniny są związki, których wzrost stężenia w surowicy lub w moczu jednoznacznie wskazywałby na proces ostrego uszkodzenia narządu. Takie kryterium spełniają oznaczane w surowicy i moczu białka NGAL i cystatyna C. NGAL jest białkiem neutrofilowym, biorącym udział w mechanizmach odporności nieswoistej skierowanym przeciw zakażeniom bakteryjnym. Jego stężenie analizuje się zarówno w surowicy jak i w moczu, a podwyższenie wartości stężenia świadczy o toczącym się w czasie rzeczywistym procesie uszkadzającym nerki. Kumulacja w surowicy i nerce, wynikająca ze spadku GFR, następuje już w początkowym etapie uszkodzenia. Wzrost stężenia nie jest opóźniony w stosunku do zmniejszonego GFR, dlatego też marker ten nadaje się do oceny ryzyka rozwoju OUN. Oznaczenie NGAL ma zastosowanie u pacjentów po zabiegach kardiochirurgicznych, podaniu kontrastu lub w przebiegu sepsy, czyli w ocenie ryzyka wystąpienia przednerkowej postaci OUN [109,110]. Cystatyna C jest białkiem w 100 % filtrowanym przez nerki, którego stężenie nie jest zależne od płci, stanu nawodnienia, rasy ani wieku. Nie podlega wpływom infekcji, chorób wątroby i chorób zapalnych. U osób zdrowych wydalana jest z moczem w ilościach śladowych. Z tych powodów jest dobrym markerem filtracji

kłębuszkowej, której niewielki spadek, oraz zwiększone wydalanie z moczem może świadczyć o ryzyku wystąpienia i początkowym etapie OUN. Za pomocą oznaczenia stężenia cystatyny C w surowicy możliwa jest ocena ryzyka wystąpienia OUN u pacjentów w ciężkim stanie, nawet 48 godzin wcześniej niż w przypadku oznaczenia stężenia kreatyniny [111]. Wzrost wydalania cystatyny C z moczem jest czynnikiem świadczącym o niekorzystnym przebiegu OUN i konieczności zastosowania dializ [112].

Analiza stężeń markerów OUN możliwa jest dzięki nieustannemu rozwojowi technologicznemu w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej. Ze względu na łatwość pozyskania materiału do badań, zdecydowana większość markerów OUN analizowana jest w moczu. Należą do nich białka: CYR61, KIM-1, α -1-mikroglobulina, β -2-mikroglobulina; interleukiny – 6, 8 i 18 i enzymy np. ALP. Analiza moczu i surowicy pod kątem markerów OUN pozwala na rozróżnienie postaci klinicznej, określenie stopnia zaawansowania uszkodzenia, rokowanie oraz prognozowanie przebiegu [98].

2. ZAŁOŻENIA PRACY

Dotychczasowe modele doświadczalne OUN rozwijającego się w konsekwencji zakażenia dróg moczowych, w głównej mierze polegają na podaniu zawiesiny patogenu wprost do miąższu nerki. W ten sposób wykonany zabieg i droga podania patogenu zwiększają ryzyko wystąpienia powikłań, oraz nie odzwierciedlają najczęściej występującej drogi ZUM – możliwej przyczyny OUN. Dodatkowo w badaniach wykorzystywane są różne gatunki, oraz dawki drobnoustrojów, co wpływa na różnorodność i rozbieżność wyników badań.

Założeniem pracy jest analityczne opracowanie modelu doświadczalnego OUN, będącego konsekwencją wstępującego ZUM, z wykorzystaniem czynnika etiologicznego – pałeczki okrężnicy – najczęściej izolowanej od pacjentów z bakteryjnym zakażeniem dróg moczowych.

Przedmiotem zainteresowania niniejszej pracy jest ocena zależności między dawką czynnika etiologicznego, wywołującego wstępujące ZUM a stopniem uszkodzenia nerek. Wykonana w tym celu analiza stanowi podsumowanie dwu dziedzin powiązanych wzajemnie, patofizjologii i mikrobiologii. Określenie toksyczności bakterii koniecznych do rozwoju doświadczalnego wstępującego uszkodzenia nerek pozwoli na zrozumienie patomechanizmów uszkodzenia narządu przez proces zapalny. Spodziewane różnice w wieloparametrowej analizie potwierdzą nie tylko rolę czynników wirulencji bakterii, ale także wpływ dawki na przebieg zakażenia i stopień uszkodzenia nerek.

3. CEL PRACY

Celem pracy jest stworzenie modelu doświadczalnego OUN, rozwijającego się w konsekwencji wstępującego, bakteryjnego ZUM. Do badań wykorzystane zostaną różne dawki pałeczki okrężnicy – najczęściej izolowanej bakterii w zakażeniu dróg moczowych, oraz oceniony zostanie stopień upośledzenia pracy nerek przez poszczególne dawki bakterii.

Cele szczegółowe:

1. Określenie ilości bakterii pałeczki okrężnicy koniecznych do rozwoju OUN;
2. Opracowanie zależności pomiędzy parametrami uszkodzenia a obrazem histopatologicznym uszkodzonych nerek;
3. Ocena wartości klinicznej wskaźników laboratoryjnych w doświadczalnym wstępującym OUN.

4. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Opisane poniżej procedury przeprowadzono w Katedrze Patofizjologii i Katedrze Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz w pracowniach Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Wszystkie procedury eksperymentalne zostały zaakceptowane przez Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

4.1 Zwierzęta

Do badań użyto ogółem 40, 10 – tygodniowych szczurów rasy Wistar (Zwierzętarnia Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie) o masie ciała ok. 200g. W zgodzie z zasadami protokołu doświadczeń eksperymentalnych, zwierzęta przebywały w pojedynczych klatkach, w starannie utrzymywanych warunkach higienicznych w klimatyzowanym pomieszczeniu o ustalonej temperaturze 21 – 25°C. Został zachowany dwunasto – godzinny cykl dnia i nocy oraz dostęp ad libitum do wody i pokarmu (Labofeed, Kcynia, Polska). Badania przeprowadzono na osobnikach płci żeńskiej, ze względu na mniejsze ryzyko uszkodzenia aparatu zwieraczowego cewki moczowej i pęcherza moczowego podczas cewnikowania przez cewkę moczową, w porównaniu z osobnikami płci męskiej.

4.2 Procedury

W trakcie 21 – dniowego eksperymentu zwierzęta podlegały następującym procedurom:

Procedura 1. Indukcja wstępującego zapalenia układu moczowego ZUM.

Zwierzęta będące w stanie znieczulenia ogólnego (narkoza pentobarbitalowa, Morbital, Biowet Puławy, Polska, sposób podania – dootrzewnowo, 20mg/kg m.c.)

jednokrotnie w trakcie eksperymentu podlegały zabiegowi cewnikowania przez cewkę moczową (sterylny, polietylenowy cewnik o średnicy 1mm i długości 10cm) z podaniem do pęcherza moczowego 0,5ml zawiesiny bakterii pałeczki okrężnicy o wysokiej wirulencji w trzech różnych dawkach – 1×10^5 , 1×10^7 , 1×10^9 j.t.k./ml. Procedura wywołania wstępującego zapalenia układu moczowego została po zmodyfikowaniu przeprowadzona na podstawie opisu Lee i wsp. [69].

Procedura 2. Pobieranie krwi. Zwierzęta będące w stanie znieczulenia ogólnego (narkoza pentobarbitalowa, Morbital, Biowet Puławy, Polska, sposób podania – dootrzewnowo, 20mg/kg m.c.) poddawano procedurze pobierania krwi z żyły ogonowej. Procedurę powtarzano czterokrotnie w trakcie trwania eksperymentu. Trzykrotnie pobrano 0,6ml krwi. W ostatnim dniu doświadczenia pobrano 2ml krwi. Krew pobierano w celu wykonania biochemicznej analizy laboratoryjnej.

Procedura 3. Dobowa zbiórka moczu. W celu zgromadzenia moczu do badań mikrobiologicznych i biochemicznych, zwierzęta umieszczano w uprzednio wysterylizowanych (sterylizator parowy, typ ASHE/A, temp. 121°C, 15 min.) klatkach metabolicznych (klatka metaboliczna dla szczurów 150 – 300g, Tecniplast, Włochy). Czas przebywania zwierząt w klatkach metabolicznych wynosił 24 h. Mocz do badań mikrobiologicznych pobierany był w ilości 50μl w pierwszej godzinie trwania DZM. Procedurę powtarzano czterokrotnie w trakcie trwania eksperymentu.

Procedura 4. Kontrola wagi i temperatury. Zwierzęta podlegały procedurze kontroli masy ciała, masy spożytego pokarmu i temperatury (cyfrowy termometr rektalny dla gryzoni, Vivari, UK). Procedurę powtarzano czterokrotnie w trakcie trwania eksperymentu.

Procedura 5. Sekcja zwłok. W ostatnim dniu doświadczenia zwierzęta zostały uśmiercone przez przedawkowanie środka anestetycznego (pentobarbital, Morbital,

Biowet Puławy, Polska, sposób podania – dootrzewnowo, 100mg/kg m.c.). Następnie przeprowadzono sekcję zwłok, w trakcie której pobrano nerki i pęcherz moczowy w celu wykonania preparatów histologicznych. Sekcję zwłok wykonano w warunkach jałowych w komorze laminarnej, z użyciem uprzednio dwukrotnie wysterylizowanych narzędzi chirurgicznych (sterylizator parowy, typ ASHE/A, temp.121°C, 15 min.) i aseptycznych środków higienicznych (sterylne rękawiczki, gaziki, gazy).

4.3 Grupy badawcze

Zwierzęta włączone do eksperymentu zostały losowo przydzielone do czterech grup badawczych. Grupę 1, 2, 3 stanowiły zwierzęta podlegające procedurom 1 – 5 z indukowanym wstępującym ZUM trzema różnymi dawkami pałeczki okrężnicy, odpowiednio:

Grupa 1 (n=10) – zainfekowana dawką 1×10^5 j.t.k./ml;

Grupa 2 (n=10) – zainfekowana dawką 1×10^7 j.t.k./ml;

Grupa 3 (n=10) – zainfekowana dawką 1×10^9 j.t.k./ml.

Grupa 4 (n=10) – zwierzęta zdrowe, podlegające tylko procedurze 4 i 5.

Kontrolą parametrów laboratoryjnych dla grup 1 – 3 z indukowanym ZUM, były wyniki uzyskane z badania moczu i krwi, pobranych zwierzętom tych grup w dniu zerowym doświadczenia – przed dopęcherzowym podaniem zawiesiny bakterii. Wyniki te, były średnią wartością z otrzymanych analiz wszystkich 30 zdrowych zwierząt (połączenie grup wynikało z braku istotnych statystycznie różnic między grupami w analizie wszystkich parametrów laboratoryjnych).

Kontrolą dla pozostałych parametrów: temperatury, wagi ciała, wagi spożywanego pokarmu były wyniki uzyskane z pomiarów przeprowadzonych w obrębie grupy 4, w zerowym, 7, 14 i 21 dniu doświadczenia.

4.4 Charakterystyka pałeczki okrężnicy i schemat badania

Charakterystyka pałeczki okrężnicy. Bakterie pałeczki okrężnicy wykorzystane w eksperymencie wyizolowano od pacjentki z ostrym OZN. Szczep posiadał geny dla kilku czynników wirulencji w tym: geny fimH, papC i sfaD/E kodujące adhezyny typu 1 i fimbrie typu P i S. Dodatkowo stwierdzono obecność genu iroN odpowiedzialnego za kodowanie salmocheliny – receptora dla jonów żelaza oraz genu cnf-1 odpowiedzialnego za kodowanie cytotoksyny, czyli cytotoksycznego czynnika martwicy typu 1 – TNF1.

Schemat badania. Trwający 21 dni eksperyment podzielono na 4 etapy:

Etap 1. Dzień zerowy. W zerowym dniu doświadczenia zwierzętom wszystkich grup zmierzono temperaturę ciała, ustalono początkową wagę pokarmu, oraz masę ciała. W celu poznania dobowej objętości wydalanego moczu u zwierząt zdrowych, osobniki z grup 1 – 3 umieszczano w wysterylizowanych klatkach metabolicznych z zapewnionym dostępem do wody i pokarmu. Po godzinie od rozpoczęcia DZM, z pojemników na mocz pobierano do sterylnych probówek (probówki typu Eppendorf 200 µl, Profilab, Polska) 50µl moczu, celem wykonania badania mikrobiologicznego. Mocz natychmiast po pobraniu transportowano do Katedry Mikrobiologii i wysiewano na płytki z podłożem różnicującym. Po zakończeniu 24 – godzinnej DZM, zwierzęta znieczulano i poddawano w kolejności procedurom pobierania krwi oraz indukcji ZUM trzema różnymi dawkami pałeczki okrężnicy – 1×10^5 , 1×10^7 , 1×10^9 j.t.k./ml w zależności od grup.

Etap 2 i 3. Dzień 7 i 14. W 7 i 14 dniu eksperymentu zwierzętom wszystkich grup kontrolowano temperaturę, wagę spożywanego pokarmu i masę ciała. W celu poznania zmian w objętości dobowego wydalania moczu u zwierząt z toczącym się ZUM, osobniki z grup 1 – 3 umieszczano w wysterylizowanych klatkach

metabolicznych z zapewnionym dostępem do wody i pokarmu. Po godzinie od rozpoczęcia DZM, z pojemników na mocz pobierano do sterylnych probówek (probówki typu Eppendorf 200 μ l, Profilab, Polska) 50 μ l moczu, celem oceny zmian w badaniu mikrobiologicznym. Mocz natychmiast po pobraniu transportowano do Katedry Mikrobiologii i wysiewano na płytki z podłożem różnicującym. Po zakończeniu 24 – godzinnej DZM, zwierzęta poddawano procedurze pobierania krwi.

Etap 4. Dzień 21. Po wykonaniu wszystkich czynności nieodbiegających od protokołu badań z dnia 7 i 14, zwierzęta wszystkich grup poddawano eutanazji przez przedawkowanie leków znieczulających wg procedury 5, zgodnie z wytycznymi American Public Health Service In Bowman School of Medicine [113]. Celem procedury było uzyskanie materiału – pęcherzy i nerek – do badań histopatologicznych i oceny stopnia nasilenia stanu zapalnego w układzie moczowym.

4.5 Analiza laboratoryjna

4.5.1 Biochemiczna analiza krwi

Po pobraniu krwi do probówek do wykrzepiania krwi i separacji surowicy (probówki do pozyskiwania surowicy krwi, Profilab, Polska), krew odstawiono na 30 – 45 minut, a następnie wirowano przez 10 minut z prędkością 3000 obrotów/minutę. Surowicę przeznaczono do analizy następujących parametrów: kreatynina, kwas moczowy, mocznik, TNF α , sód i potas. W pierwszej kolejności przystąpiono do oznaczenia poziomu elektrolitów. Oznaczenia jonów – Na, K – wykonano na fotometrze płomieniowym, model Corning 450. Oznaczenia kreatyniny, kwasu moczowego i mocznika, wykonano na analizatorze Cobas 6000, module biochemicznym C501, firmy Roche. Poziom TNF α oznaczono metodą ELISA używając testu Rat TNF-alpha ELISA KIT, RayBiotech®, USA.

4.5.2 Biochemiczna analiza moczu

Po zmierzeniu ilości dobowego wydalania moczu, mocz odwirowano (5 min, 2000 obrotów/min) i rozdzielono na porcje. Mocz przeznaczono do analizy następujących parametrów: białko, selektywność białek moczu i densytometria frakcji albuminowej, kreatynina, kwas moczowy, mocznik, IL-6, sód i potas. W pierwszej kolejności przystąpiono do oznaczenia poziomu elektrolitów. Oznaczenia jonów – Na, K – wykonano na fotometrze płomieniowym, model Corning 450. Oznaczenia białka, kreatyniny, kwasu moczowego i mocznika, wykonano na analizatorze Cobas 6000, module biochemicznym C501, firmy Roche. Poziom IL-6 oznaczono metodą ELISA używając testu Rat IL-6 ELISA KIT, RayBiotech®, USA. Wyniki tych oznaczeń przeliczano na wydalaną dobowo ilość moczu. Ocenę selektywności białek moczu wykonano metodą rozdziału elektroforetycznego w 11,5 % żelu poliakrylamidowym SDS – page. Densytometria frakcji albuminowej oceniona została przez zastosowanie metody cyfrowej analizy obrazu przy użyciu Skanera Epson V330 i programu DensyGraf.

4.5.3 Mikrobiologiczna analiza moczu

Mikrobiologiczne badanie moczu wykonywane było w celu potwierdzenia wystąpienia ZUM u zwierząt poddanych procedurze cewnikowania oraz monitorowania wielkości bakteriurii na wszystkich etapach doświadczenia. Po przetransportowaniu moczu do Katedry Mikrobiologii UJ CM, mocz wysiewano w ilości 1µl na odpowiednie podłoża różnicujące. Wśród nich wykorzystano:

1. Columbia Lab-Agar Base, Biocorp z 5 % krwią baranią, podłoże przeznaczone do izolacji drobnoustrojów o różnych wymaganiach wzrostowych (bakterii tlenowych Gram+ i Gram-);

2. Mac Conkey Lab-Agar, Biocorp, podłoże przeznaczone do wzrostu pałeczek Enterobacteriaceae (Gram-);

Po wysianiu płytki umieszczano w warunkach tlenowych na 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie kolonie bakterii, które wyrosły na odpowiednich podłożach wzrostowych, identyfikowano oraz liczono podając liczebność populacji tych bakterii w j.t.k. w przeliczeniu na 1ml moczu.

4.5.4 Parametry obliczeniowe

Poza oznaczeniami bezpośrednimi, do obliczenia analizowanych w niniejszej pracy parametrów korzystano z następujących wzorów:

Klirens kreatyniny (ml/min)

$$Cl_{kr} = (U \times V)/P$$

U – stężenie kreatyniny w moczu (μmol/l)

V – objętość moczu (ml/min)

P – stężenie kreatyniny w surowicy (μmol/l)

Klirens mocznika (ml/min)

$$Cl_{urea} = (U \times V)/P$$

U – stężenie mocznika w moczu (mmol/l)

V – objętość moczu (ml/min)

P – stężenie mocznika w surowicy (mmol/l)

Współczynnik mocznik P/kreatynina P

$$\mathbf{Urea_P / Krea_P}$$

Urea_P – stężenie mocznika w surowicy (mg%)

Krea_P – stężenie kreatyniny w surowicy (mg%)

Współczynnik kreatynina U/kreatynina P

$$\mathbf{Krea_U / Krea_P}$$

Krea_U – stężenie kreatyniny w moczu (μmol/l)

Krea_P – stężenie kreatyniny w surowicy (μmol/l)

Współczynnik mocznik U/mocznik P

$$\mathbf{Urea_U / Urea_P}$$

Urea_U – stężenie mocznika w moczu (mmol/l)

Urea_P – stężenie mocznika w surowicy (mmol/l)

Wskaźnik niewydolności nerek RFI (mmo/l)

$$\mathbf{RFI = Na_U \times (Krea_P / Krea_U)}$$

Na_U – stężenie sodu w moczu (mmol/l)

Krea_P – stężenie kreatyniny w surowicy (μmol/l)

Krea_U – stężenie kreatyniny w moczu (μmol/l)

Frakcjonowane wydalanie sodu FENa (%)

$$\mathbf{FENa = [(Na_U \times Krea_P)/(Na_P \times Krea_U)]*100\%}$$

Na_U – stężenie sodu w moczu (mmol/l)

Krea_P – stężenie kreatyniny w surowicy (μmol/l)

Na_P – stężenie sodu w surowicy (mmol/l)

Krea_U – stężenie kreatyniny w moczu (μmol/l)

Frakcjonowane wydalanie mocznika FEUrea (%)

$$\mathbf{FEUrea = [(Urea_U \times Krea_P)/(Urea_P \times Krea_U)]*100\%}$$

Urea_U – stężenie mocznika w moczu (mmol/l)

Krea_P – stężenie kreatyniny w surowicy (μmol/l)

Urea_P – stężenie mocznika w surowicy (mmol/l)

Krea_U – stężenie kreatyniny w moczu (μmol/l)

Frakcjonowane wydalanie potasu FEK (%)

$$\mathbf{FEK = [(K_U \times Krea_P)/(K_P \times Krea_U)]*100\%}$$

K_U – stężenie potasu w moczu (mmol/l)

Krea_P – stężenie kreatyniny w surowicy (μmol/l)

K_P – stężenie potasu w surowicy (mmol/l)

Krea_U – stężenie kreatyniny w moczu (μmol/l)

4.5.5 Histologiczna ocena narządów układu moczowego

Pobrane w trakcie sekcji zwłok nerki i pęcherze płukano w soli fizjologicznej, następnie utrwalano przez 24 godziny w 8 % formalinie w roztworze buforu fosforanowego (PBS pH 7.4). Pobrane wycinki płukano następnie w bieżącej wodzie przez 2h, a następnie odwadniano w etanolu o wzrastających stężeniach (50 – 100 %). Przed zatopieniem w parafinie preparaty przeprowadzono przez roztwór ksylenu w celu ich przeświecenia. Z ksylenu wycinki przeniesiono do mieszaniny ksylenu i parafiny, w stosunku 1: 1 i inkubowano w temperaturze 37°C przez 2h. Następnie poszczególne fragmenty tkanek przenoszono dwukrotnie do czystej parafiny i inkubowano w temperaturze 62°C. Po upływie 2h, preparaty zatapiano w bloczki, które po zastygnięciu krojono na mikrotomie, a skrawki po umieszczeniu na szkiełku podstawowym suszono w cieplarni w temperaturze 37°C. W celu oceny histologicznej nasilenia stanu zapalnego preparaty barwiono metodą hematoksyliny – eozyna (HE). Analizie poddano 10 kolejnych pól widzenia w poszczególnych preparatach przy użyciu mikroskopu świetlnego AXIOPHOT (Zeiss, Niemcy). W opisie preparatów uwzględniono umiejscowienie i charakterystykę nacieku w obrębie nerek i ściany pęcherza moczowego przez komórki zapalne (neutrofile oraz komórki jednojądrzaste). Naciek oceniony został w poszczególnych polach widzenia przy powiększeniu 400x, w skali punktowej 0-3 pkt., odpowiednio 0pkt.: brak pozanaczyniowych komórek zapalnych, 1pkt.: < 20 komórek, 2pkt.: 20 – 45 komórek, 3pkt.: > 45 komórek zapalnych w polu widzenia.

5. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Analizie poddano 30 parametrów. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu pakietu Statistica 8 (StatSoft). Wyniki dla poszczególnych grup przedstawiono jako średnią wraz z odchyleniem standardowym. Grupą kontrolną dla parametrów laboratoryjnych grup 1 – 3 z 7, 14 i 21 dnia doświadczenia, były wyniki zwierząt zdrowych uzyskane z badania moczu i krwi, pobranych zwierzętom tych grup w dniu zerowym doświadczenia – przed dopęcherzowym podaniem zawiesiny bakterii. Kontrolą dla pozostałych parametrów: temperatury, wagi ciała, wagi spożywanego pokarmu były wyniki uzyskane z pomiarów przeprowadzonych w obrębie grupy 4, na każdym etapie doświadczenia. Do analizy wszystkich parametrów (poza selektywnością białek w moczu) i porównania różnic między analizowanymi grupami zastosowano metodę ANOVA. Test HSD Tukey’a dodatkowo posłużył do wskazania różniących się między sobą grup. Do analizy selektywności białek w moczu wykorzystano test CHI – KWADRAT.

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci tabel i wykresów, opartych na wartościach średnich z wąsami prezentującymi odchylenia standardowe SD. Za statystycznie znamienne przyjęliśmy te wyniki testów, dla których poziom prawdopodobieństwa błędu był mniejszy lub równy 0,05 ($p \leq 0,05$).

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW

W przeprowadzonych eksperymentach obserwowano przebieg ZUM, będącego konsekwencją dopęcherzowej iniekcji różnych dawek pałeczki okrężnicy. Za pośrednictwem analizy laboratoryjnej krwi i moczu, obserwacji zmian fizjologicznych oraz badań histopatologicznych oceniono nasilenie stanu zapalnego w obrębie układu moczowego.

6.1 Ocena zakażenia i intensywności stanu zapalnego

Przed i po dopęcherzowej iniekcji pałeczki okrężnicy u zwierząt wszystkich grup wykonano posiewy moczu w celu potwierdzenia lub wykluczenia ZUM. Zbadano poziom cytokin prozapalnych: IL-6 w moczu i TNF α w surowicy. Pomiaru temperatury ciała zwierząt dodatkowo służyły monitorowaniu toczącego się w obrębie dróg moczowych stanu zapalnego.

6.1.1 Posiewy moczu

Potwierdzenie obecności bakterii powyżej zwieracza pęcherza moczowego jest z definicji warunkiem koniecznym do rozpoznania ZUM. W badaniach mikrobiologicznych moczu wykonanych po indukcji ZUM u zwierząt wszystkich grup wyizolowano podaną przezcewkowo pałeczkę okrężnicy. Bakteriomocz nie ustępował i utrzymywał się do ostatniego etapu doświadczenia. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że ilość izolowanych bakterii z moczu pozyskanego według opisanej metodyki nie zależała od dawki indukującej ZUM (Tab.1.).

Tabela nr 1. Posiewy moczu (j.t.k./ml)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	0	-	-	-	-
7.	-	2x10 ⁶ ±5x10 ⁶	4,8x10 ⁴ ±7,1x10 ⁴	13,5x10 ⁴ ±14,5x10 ⁴	p=0,198
14.	-	2x10 ⁶ ±5x10 ⁶	3,8x10 ⁴ ±2,9x10 ⁴	2,5x10 ⁶ ±3,8x10 ⁶	p=0,119
21.	-	9x10 ⁴ ±1x10 ⁵	5,3x10 ⁴ ±1,5x10 ⁴	3,5x10 ⁶ ±8x10 ⁶	p=0,11

p>0,05 wskazuje na brak statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

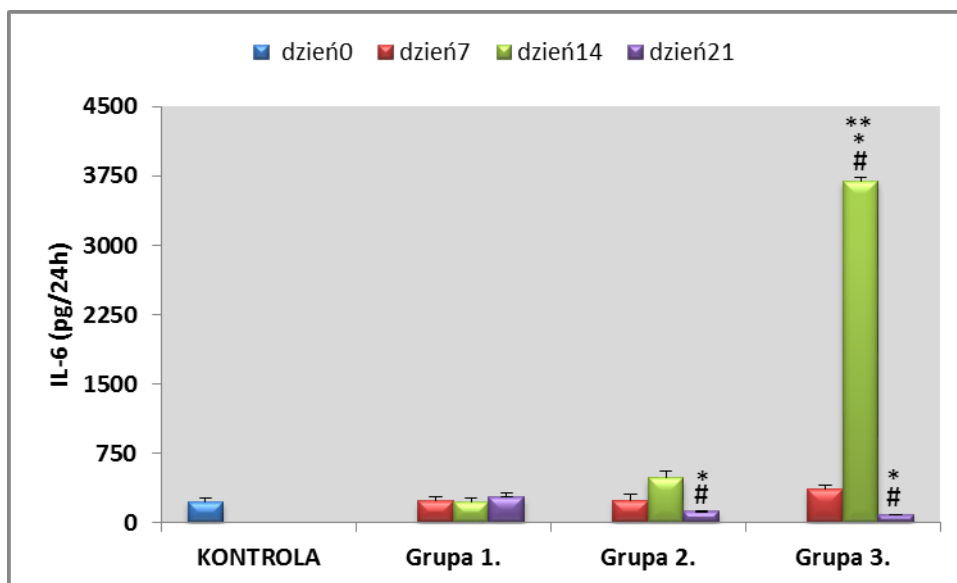
6.1.2 Poziom IL-6 w moczu

Służącym określeniu intensywności stanu zapalnego parametrem, była wykazująca prozapalne działanie IL-6. Największy, bo aż 15 – krotny wzrost stężenia tej cytokiny w wydalonym moczu w porównaniu z grupą kontrolną, zaobserwowano w 14 dniu doświadczenia u grupy zainfekowanej najwyższą dawką bakterii (grupa 3 – 10⁹j.t.k./ml). W grupie, której podana została pośrednia dawka pałeczki okrężnicy (grupa 2 – 10⁷ j.t.k./ml), w 14 dniu stężenie IL-6 wydalanego z moczem wzrosło 2 – krotnie w odniesieniu do kontroli, jednakże wartość ta nie osiągnęła istotności statystycznej. Zaobserwowano natomiast istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.2, Ryc.1.).

Tabela nr 2. Stężenie IL-6 w DZM (pg/24h)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	226,46±42,88	-	-	-	-
7.	-	233,8±52,86	243,38±41,5	368,52±147,13	p=0,063
14.	-	226,42±69,85	483,67±75,74	3695±1602 # * **	p<0,001
21.	-	279,27±30,81	121,6±41,42 # *	89,33±2,02 # *	p<0,001

p<0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi
- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)
* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)
** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 1. Stężenie IL-6 w DZM (pg/24h)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

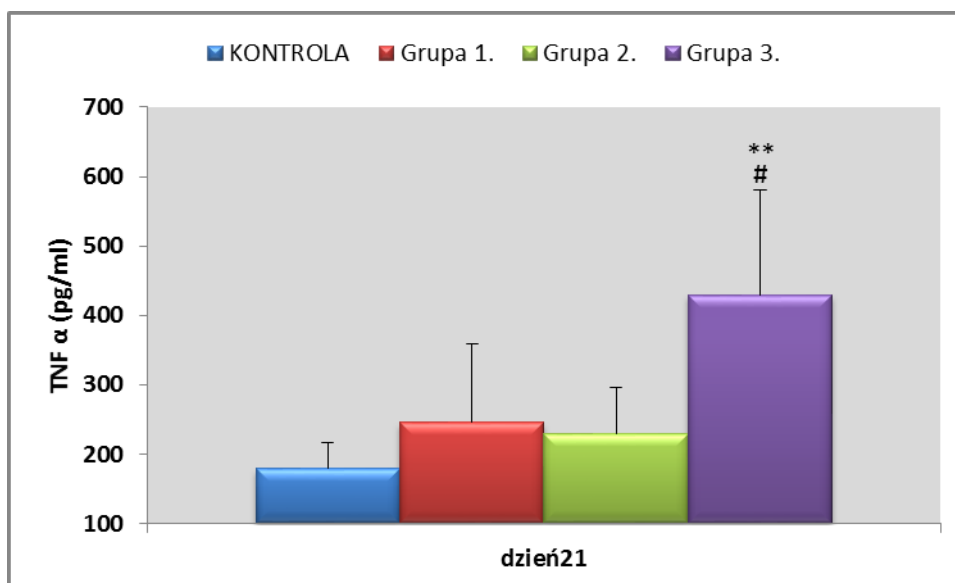
** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

6.1.3 Poziom TNF α w surowicy

Do zbadania poziomu TNF α – cytokiny prozapalnej – posłużyła surowica krwi, pobranej w 21 dniu doświadczenia. Wzrost stężenia tej cytokiny w odniesieniu do grupy kontrolnej obserwowano u wszystkich grup z indukowanym ZUM. W grupie 1 i 2 poziom TNF α wzrósł odpowiednio 27 % i 22 %, jednakże wartości te nie osiągnęły istotności statystycznej. Najwyższy, ponad 2 – krotny wzrost poziomu cytokiny odnotowano w grupie 3, zainfekowanej najwyższą dawką pałeczki okrężnicy (10^9 j.t.k./ml). Zaobserwowano także istotne statystycznie różnice między grupą eksperymentalną 2 i 3. (Tab.3., Ryc.2.).

Tabela nr 3. Stężenie TNF α w surowicy (pg/ml)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
21.	179,2±37,84	245,5±112,41	229,25±67,24	429,5±150,42 # **	p=0,007
p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi # - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05) ** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 (p≤0,05)					



Rycina nr 2. Stężenie TNF α w surowicy (pg/ml)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)
 ** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 (p≤0,05)

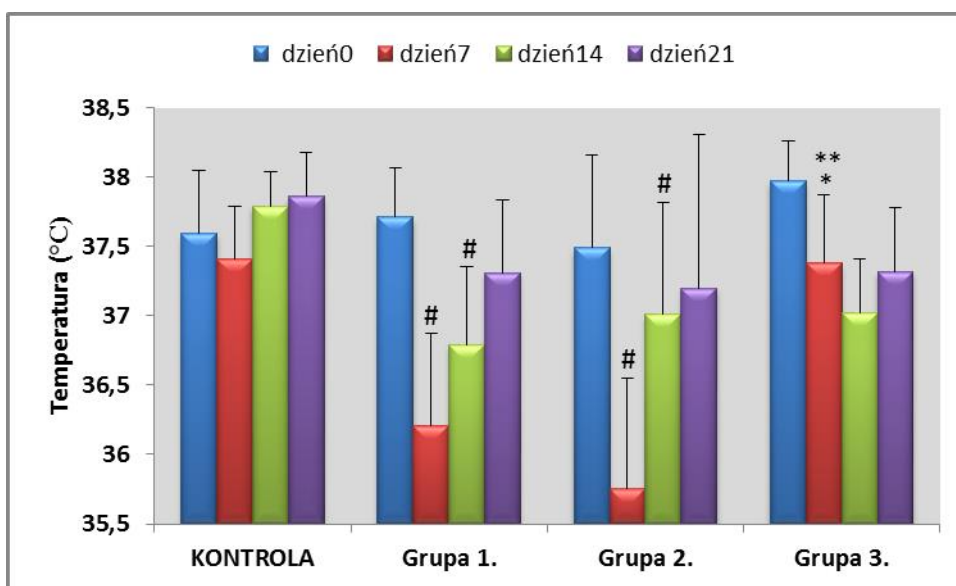
6.1.4 Temperatura

Interpretacja wyników pochodzących z pomiaru temperatury w poszczególnych grupach, przeprowadzona została na podstawie literatury dotyczącej hodowli, użytkowania i chorób zwierząt laboratoryjnych. Prawidłową temperaturą u zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu wg źródeł jest 37,5 – 38,5⁰C, a obniżenie temperatury poniżej dolnej granicy tego zakresu świadczy o aktywności procesu zapalnego [114,115]. Na wszystkich etapach doświadczenia temperatura zwierząt zdrowych, stanowiących grupę kontrolną dla pomiaru temperatury, wagi ciała i wagi spożywanego jedzenia, nie odbiegała od normy. W pozostałych grupach poddanych

indukcji ZUM, zaobserwowano spadki temperatury ciała świadczące o stanie zapalnym. W 7 dniu po dopęcherzowym podaniu pałeczki okrężnicy najniższą temperaturę w porównaniu z kontrolą zanotowano w grupie 2, gdzie spadek temperatury wynosił 1,66⁰C. Obniżona o 0,78⁰C temperatura w obrębie grupy 2 utrzymywała się także w kolejnym – 14 dniu pomiaru. W grupie 1 spadek ciepłoty ciała w 7 i 14 dniu doświadczenia w odniesieniu do pomiarów prowadzonych w tych dniach w grupie kontrolnej wynosił odpowiednio 1,2⁰C i 1⁰C. W 14 dniu doświadczenia do znacznego obniżenia temperatury ciała (0,77⁰C) doszło także w obrębie grupy 3, jednakże wartość ta nie osiągnęła istotności statystycznej. Zaobserwowano również istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.4, Ryc.3.).

Tabela nr 4. Pomiar temperatury (C⁰)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	37,59±0,46	37,71±0,36	37,49±0,67	37,97±0,29	p=0,307
7.	37,41±0,38	36,21±0,66 #	35,75±0,8 #	37,38±0,49 * **	p<0,001
14.	37,79±0,25	36,79±0,56 #	37,01±0,81 #	37,02±0,39	p=0,007
21.	37,86±0,32	37,31±0,52	37,2±1,11	37,32±0,46	p=0,242
p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi # - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolą w odpowiadającym dniu (p≤0,05) * - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05) ** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)					



Rycina nr 3. Pomiar temperatury (C°)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolą w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

6.2 Laboratoryjna ocena funkcji filtracyjnej nerek

Parametry laboratoryjne niezbędne do oceny funkcji nerek oznaczano w moczu pochodzącym z dobowej zbiórki, oraz w surowicy krwi pobranej zaraz po jej zakończeniu. Wśród tych parametrów uwzględniono: objętość DZM, $Krea_p$, $Krea_U$, $Urea_p$, $Urea_U$, Cl_{kr} i Cl_{Urea} , $FEUrea$, stężenie kwasu moczowego w surowicy i w moczu, oraz współczynniki – $Urea_p/Krea_p$, $Urea_U/Urea_p$, $Krea_U/Krea_p$.

6.2.1 Objętość DZM

W grupach zwierząt z indukowanym ZUM wykazano spadek objętości wydalanego moczu w odniesieniu do grupy kontrolnej w 14 i 21 dniu doświadczenia. W 14 dniu spadek objętości wydalanego moczu dotyczył wszystkich grup eksperymentalnych. Objętość moczu obniżyła się o 32 % w grupie 1, 48 % w grupie 2, oraz 48 % w grupie 3. W 21 dniu w grupie 1, dobowe wydalenie moczu znajdowało się na poziomie zbliżonym do prawidłowego, natomiast w pozostałych grupach nadal obserwowano zmniejszoną objętość dobową wydalanego moczu. Wynosiła ona w

grupie 2 i 3 odpowiednio 62 % i 56 % wartości początkowej, natomiast spadki w kształtowały się na poziomie 38 % i 44 %. Zaobserwowano ponadto istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.5.,Ryc.4.).

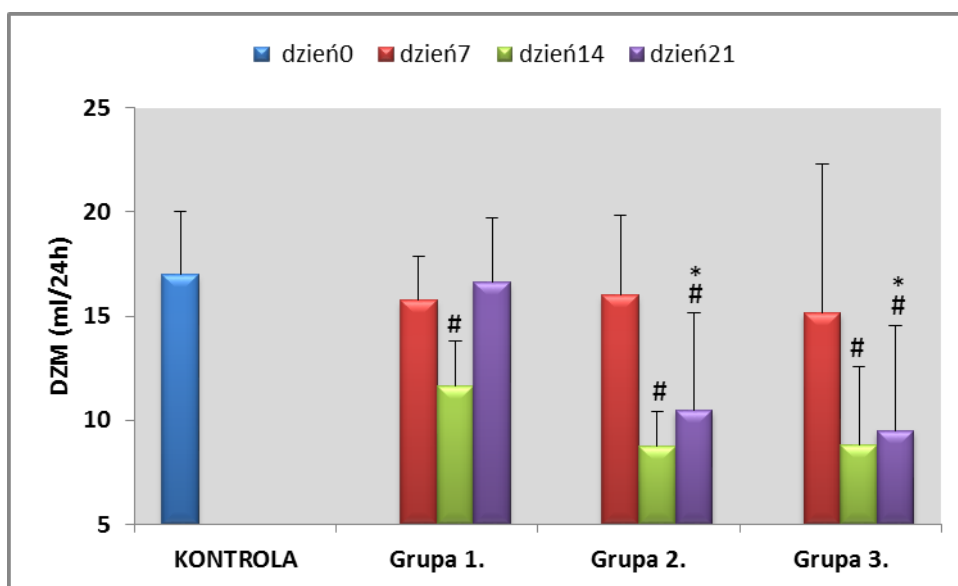
Tabela nr 5. Objętość DZM (ml/24h)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	17±3,05	-	-	-	-
7.	-	15,75 ±2,12	16±3,85	15,17±7,11	p=0,7
14.	-	11,62±2,2 #	8,75±1,67 #	8,83±3,76 #	p<0,001
21.	-	16,62±3,11	10,5±4,66 # *	9,5±5,05 # *	p<0,001

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 4. Objętość DZM (ml/24h)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.2.2 Stężenie kreatyniny w surowicy – Krea_p

Wzrost stężenia poziomu Krea_p, świadczący o pogorszeniu sprawności filtracyjnej nerki obserwowano już w 7 dniu doświadczenia. U zwierząt zainfekowanych najwyższą dawką pałeczki okrężnicy (grupa 3 – 10⁹j.t.k./ml), poziom Krea_p w 7 dniu wzrósł o 40 % w odniesieniu do grupy kontrolnej. Do podobnego

wzrostu stężenia (35 %) w grupie zainfekowanej pośrednią dawką bakterii (grupa 2 – 10^7 j.t.k./ml) doszło dopiero w 14 dniu doświadczenia. Zaobserwowano także istotne statystycznie różnice między grupą eksperymentalną 1 i 3 (Tab.6., Ryc.5.).

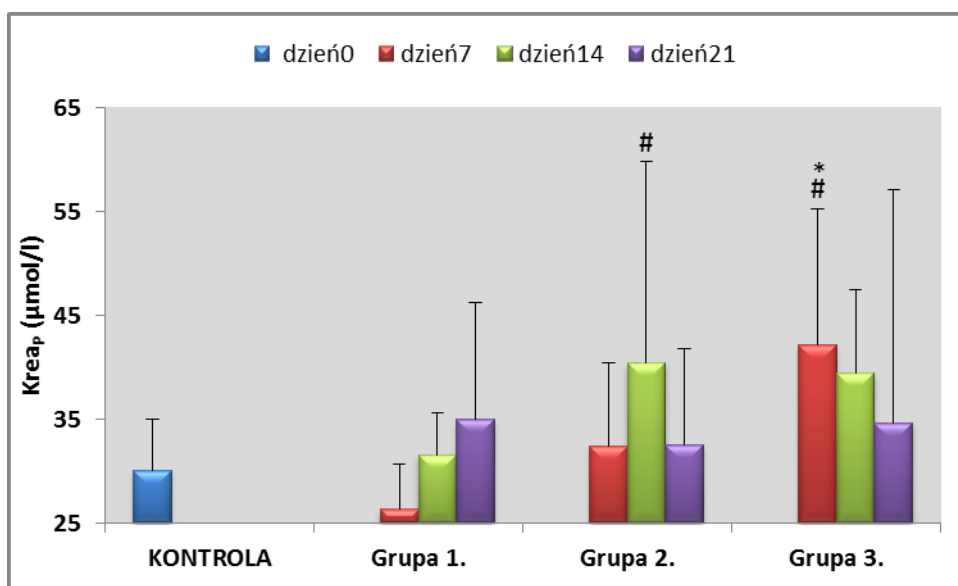
Tabela nr 6. Krea_P (μmol/l)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	30,1±4,93	-	-	-	-
7.	-	26,38±4,31	32,38±8,05	42,17±13,11 # *	p=0,001
14.	-	31,62±4,03	40,5±19,29 #	39,5±7,97	p=0,037
21.	-	35±11,25	32,62±9,23	34,67±22,38	p=0,659

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 5. Krea_P (μmol/l)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.2.3 Stężenie kreatyniny w moczu – Krea_U

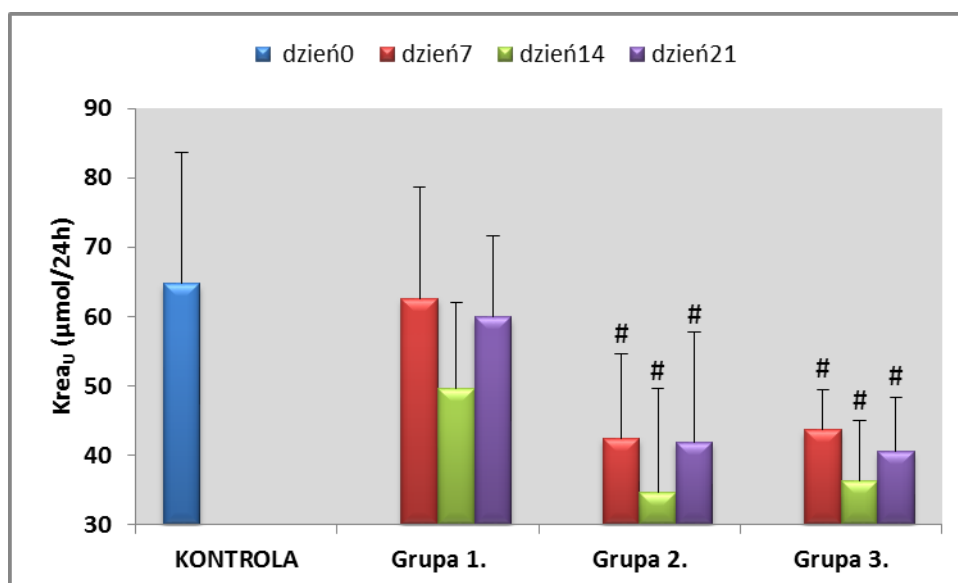
Potwierdzeniem upośledzenia funkcji filtracyjnej nerki, poza wzrostem Krea_P był także spadek wydalania tego metabolitu z moczem. Zaobserwowano, że zmniejszone dobowe wydalanie Krea_U w porównaniu do kontroli dotyczyło grup zainfekowanych pośrednią i najwyższą dawką pałeczki okrężnicy (grupa 2 –

10⁷j.t.k./ml i 3 – 10⁹j.t.k./ml). W dniu 7 spadek wydalania Krea_U w odniesieniu do grupy kontrolnej w grupie 2 i 3 wynosił odpowiednio 35 % i 33 %. W dniu 14 wydalanie Krea_U w obu tych grupach nadal utrzymywało się na obniżonym poziomie, a spadki osiągnęły wartości 48 % i 45 %. Z kolei w 21 dniu w grupie 2 spadek wydalania Krea_U wynosił 35 % a w grupie 3 – 39 % (Tab.7., Ryc.6.).

Tabela nr 7. Krea_U (μmol/24h)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	64,72±18,91	-	-	-	-
7.	-	62,62±16,02	42,48±12,23 #	43,62±5,77 #	p=0,003
14.	-	49,55±12,51	34,64±15,06 #	36,38±8,67 #	p<0,001
21.	-	59,95±11,61	41,9±15,8 #	40,55±7,86 #	p=0,002

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi
- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)



Rycina nr 6. Krea_U (μmol/24h)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

6.2.4 Klirens kreatyniny – Cl_{Kr}

U zwierząt zainfekowanych najwyższą dawką pałeczki okrężnicy (grupa 3 – 10^9 j.t.k./ml) obniżenie wartości Cl_{Kr} o 43 % w porównaniu do kontroli zaobserwowano już w 7 dniu doświadczenia. W 14 dniu w grupie 3 nadal obserwowano tendencję spadkową i odnotowano obniżenie wartości Cl_{Kr} o 52 %. Grupie, której podano pośrednią dawkę bakterii (grupa 2 – 10^7 j.t.k./ml) wartość Cl_{Kr} obniżyła się o 48 % dopiero w 14 dniu doświadczenia. Odnotowano także istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.8., Ryc.7.).

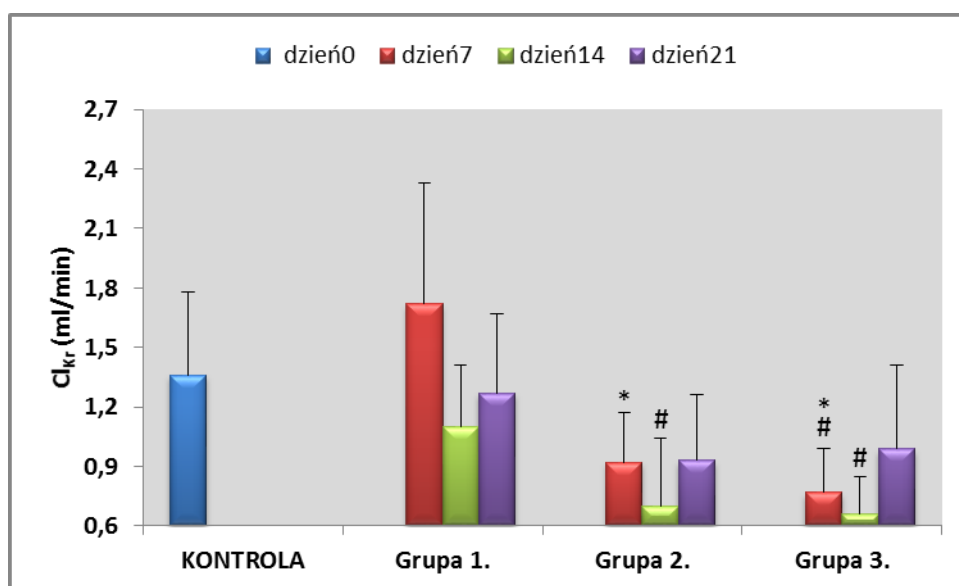
Tabela nr 8. Cl_{Kr} (ml/min)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10^5 j.t.k./ml	Grupa 2. 10^7 j.t.k./ml	Grupa 3. 10^9 j.t.k./ml	ANOVA
0.	1,36±0,42	-	-	-	-
7.	-	1,72±0,61	0,92±0,25 *	0,77±0,22 # *	p<0,001
14.	-	1,1±0,31	0,7±0,34 #	0,66±0,19 #	p<0,001
21.	-	1,27±0,4	0,93±0,33	0,99±0,42	p=0,051

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 7. Cl_{Kr} (ml/min)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

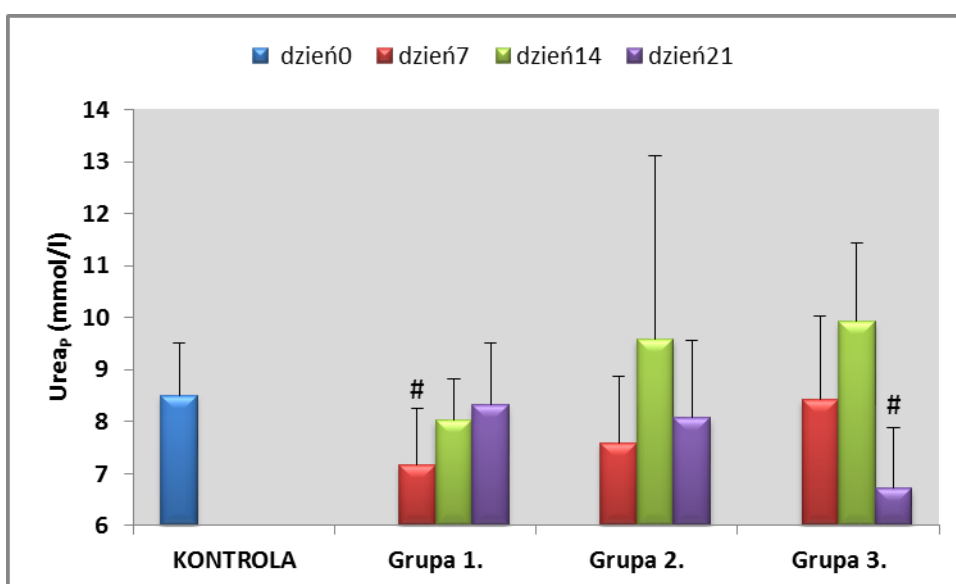
6.2.5 Stężenie mocznika w surowicy – Urea_P

Zmiany stężenia Urea_P zaobserwowano najwcześniej u grupy zainfekowanej niską dawką pałeczki okrężnicy (grupa 1 – 10⁵j.t.k./ml). Odwrotnie do oczekiwań, w 7 dniu eksperymentu stwierdzono obniżony w porównaniu do kontroli o 16 % poziom tego metabolitu w surowicy krwi. Wzrost stężenia Urea_P w grupie 2 o 13 % i grupie 3 o 17 % zaobserwowano w 14 dniu doświadczenia, jednakże wartości te nie osiągnęły istotności statystycznej. W 21 dniu ponownie odnotowano spadek stężenia mocznika w surowicy (21 %), tym razem w obrębie grupy 3 (Tab.9., Ryc.8).

Tabela nr 9. Urea_P (mmol/l)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	8,51±0,99	-	-	-	-
7.	-	7,18±1,08 #	7,6±1,28	8,43±1,61	p=0,036
14.	-	8,03±0,78	9,59±3,51	9,93±1,51	p=0,128
21.	-	8,32±1,2	8,07±1,5	6,72±1,17 #	p=0,019

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi
- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)



Rycina nr 8. Urea_P (mmol/l)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

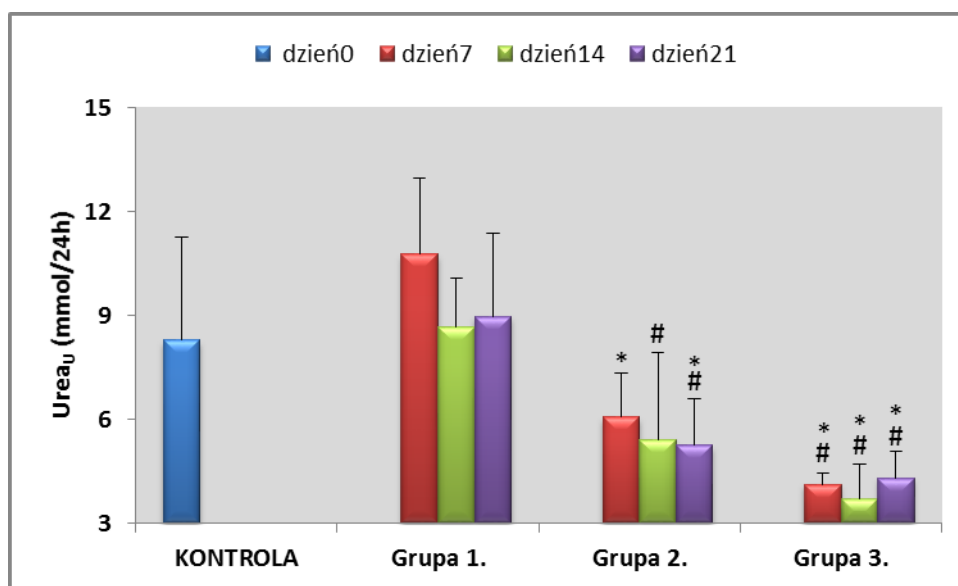
6.2.6 Stężenie mocznika w moczu – Urea_U

Znaczne, niemal 2 – krotne w odniesieniu do kontroli zmniejszenie wydalania dobowego Urea_U zaobserwowano początkowo w grupie 3. W obrębie tej grupy spadek wydalania mocznika wynosił odpowiednio w 7,14 i 21 dniu – 50 %, 55 % i 48 %. W grupie 2 zmniejszone stężenie Urea_U o 35 % stwierdzono dopiero w 14 dniu doświadczenia, w 21 dniu wydalanie dobowe Urea_U nadal utrzymywało się na niskim poziomie, a spadek zwiększył się do 37 %. Zaobserwowano także istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.10., Ryc.9).

Tabela nr 10. Urea_U (mmol/24h)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	8,3±2,97	-	-	-	-
7.	-	10,77±2,2	6,07±1,27 *	4,13±0,32 # *	p<0,001
14.	-	8,66±1,42	5,43±2,51 #	3,71±1,02 # *	p<0,001
21.	-	8,97±2,41	5,25±1,36 # *	4,31±0,77 # *	p=0,001

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi
- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)
* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 9. Urea_U (mmol/24h)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.2.7 Klirens mocznika – Cl_{Urea}

Aдекватnie do zmian stężenia $Urea_p$ w 7 dniu doświadczenia w grupie 1 zaobserwowano wzrost Cl_{Urea} o 73 % w odniesieniu do grupy kontrolnej. W pozostałych grupach zarówno w 14 i 21 dniu odnotowano spadki tego parametru, jednakże tylko w 14 dniu w grupie 3 wartość Cl_{Urea} osiągnęła istotność statystyczną, a spadek tej wartości w odniesieniu do kontroli wynosił 58 %. Zaobserwowano także istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.11., Ryc.10).

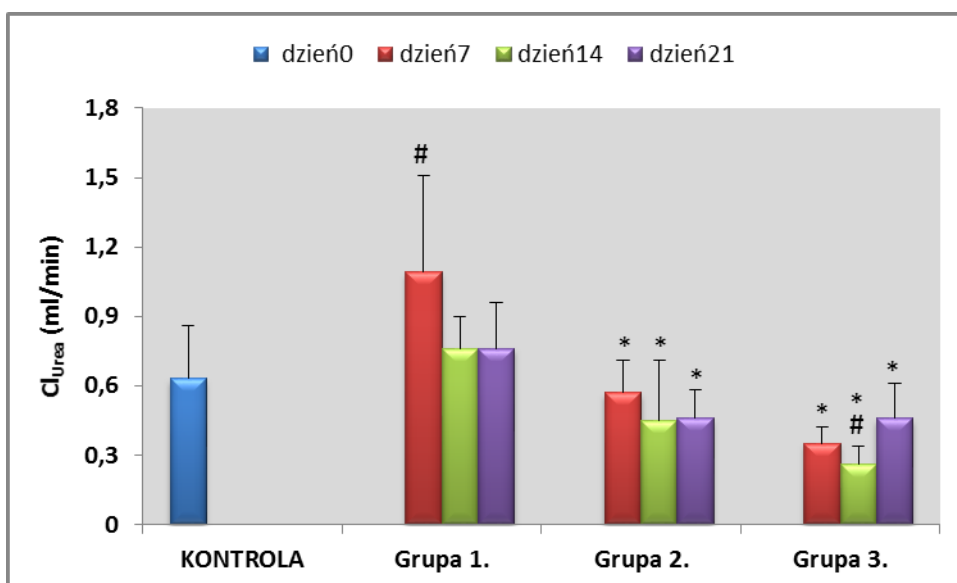
Tabela nr 11. Cl_{Urea} (ml/min)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	0,63±0,23	-	-	-	-
7.	-	1,09±0,42 #	0,57±0,14 *	0,35±0,07 *	p<0,001
14.	-	0,76±0,14	0,45±0,26 *	0,26±0,08 # *	p<0,001
21.	-	0,76±0,2	0,46±0,12 *	0,46±0,15 *	p=0,011

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 10. Cl_{Urea} (ml/min)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.2.8 Frakcjonowane wydalanie mocznika – FEUrea

Wartość FEUrea to stosunek ilości wydalanego mocznika z moczem do ilości mocznika przefiltrowanego w kłębuszku. W naszym doświadczeniu zaobserwowano, że w 14 dniu u zwierząt zainfekowanych najwyższą dawką pałeczki okrężnicy (grupa 3 – 10^9 j.t.k./ml), parametr ten różni się znacząco od wartości FEUrea w grupie 1 i grupie 2. Spadek ten wynosi odpowiednio 39 % i 36 %. W odniesieniu do grupy kontrolnej, w grupie 3 w 14 dniu – FEUrea było o 18 % niższe, jednakże wartość ta nie osiągnęła istotności statystycznej (Tab.12., Ryc.11.).

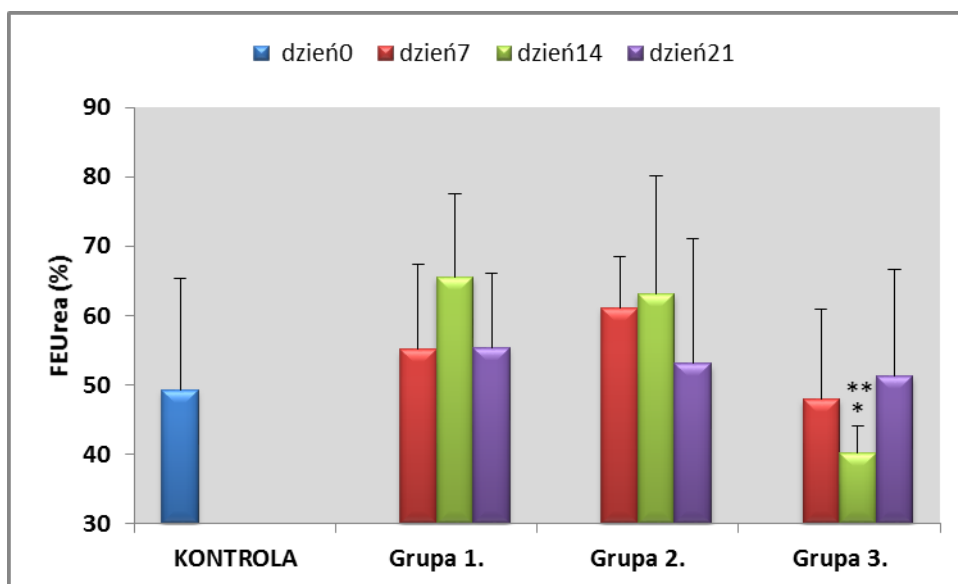
Tabela nr 12. FEUrea (%)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10^5 j.t.k./ml	Grupa 2. 10^7 j.t.k./ml	Grupa 3. 10^9 j.t.k./ml	ANOVA
0.	49,29±16,05	-	-	-	-
7.	-	55,14±12,24	61,12±7,4	48±12,92	p=0,181
14.	-	65,57±11,94	63,12±17	40,17±3,97 * **	p=0,005
21.	-	55,43±10,64	53,12±17,88	51,33±15,31	p=0,813

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

* - statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

** - statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 11. FEUrea (%)

* - statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

** - statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.2.9 Stężenie kwasu moczowego w surowicy

Wzrost stężenia kwasu moczowego w surowicy w odniesieniu do kontroli zaobserwowano najwcześniej u zwierząt, zainfekowanych pośrednią dawką bakterii (grupa 2 – 10^7 j.t.k./ml). W grupie tej wzrost poziomu metabolitu wynosił w 7, 14 i 21 dniu odpowiednio 192 %, 71 % i 76 %. W grupie 3 w dniu 14, wzrost poziomu kwasu moczowego wyniósł 42 %, w grupie 1 w dniu 21 – 51 %. Zaobserwowano też istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.13., Ryc.12.).

Tabela nr 13. Stężenie kwasu moczowego w surowicy ($\mu\text{mol/l}$)

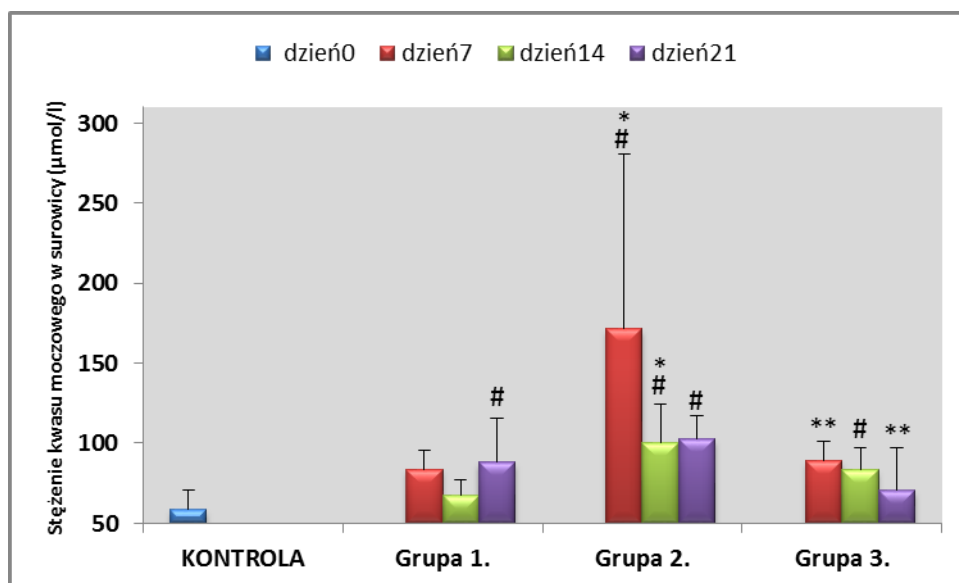
Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10^5 j.t.k./ml	Grupa 2. 10^7 j.t.k./ml	Grupa 3. 10^9 j.t.k./ml	ANOVA
0.	58,58 $\pm$ 12,43	-	-	-	-
7.	-	83,62 $\pm$ 11,83	171,5 $\pm$ 108,89 # *	89 $\pm$ 12,25 **	p<0,001
14.	-	67,38 $\pm$ 9,87	100,12 $\pm$ 24,22 # *	83,33 $\pm$ 13,75 #	p<0,001
21.	-	88,25 $\pm$ 27,4 #	102,75 $\pm$ 14,2 #	70,5 $\pm$ 26,39 **	p<0,001

$p \leq 0,05$ wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)



Rycina nr 12. Stężenie kwasu moczowego w surowicy ($\mu\text{mol/l}$)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

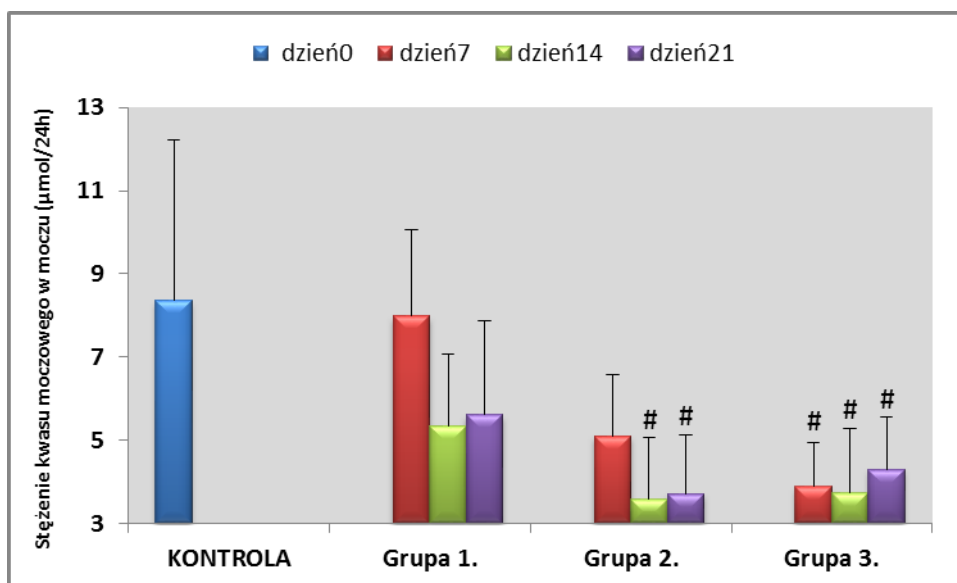
6.2.10. Stężenie kwasu moczowego w moczu

Do znamiennego obniżenia poziomu kwasu moczowego wydalanego z moczem w porównaniu do grupy kontrolnej doszło już w 7 dniu doświadczenia w grupie 3. Spadek w 7, 14 i 21 dniu wynosił w tej grupie odpowiednio – 53 %, 55 % i 49 %. W grupie 2, w 14 dniu spadek wydalania odnotowano na poziomie 57 % i 55 %. W grupie 1 nie zaobserwowano powyższych zmian (Tab.14., Ryc.13.).

Tabela nr 14. Stężenie kwasu moczowego w moczu ($\mu\text{mol}/24\text{h}$)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10^5j.t.k./ml	Grupa 2. 10^7j.t.k./ml	Grupa 3. 10^9j.t.k./ml	ANOVA
0.	$8,36 \pm 3,85$	-	-	-	-
7.	-	$7,99 \pm 2,06$	$5,11 \pm 1,47$	$3,89 \pm 1,07$ #	p=0,005
14.	-	$5,36 \pm 1,71$	$3,59 \pm 1,48$ #	$3,73 \pm 1,55$ #	p=0,001
21.	-	$5,61 \pm 2,27$	$3,72 \pm 1,42$ #	$4,3 \pm 1,27$ #	p=0,002

p $\leq 0,05$ wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi
- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p $\leq 0,05$)



Rycina nr 13. Stężenie kwasu moczowego w moczu ($\mu\text{mol}/24\text{h}$)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p $\leq 0,05$)

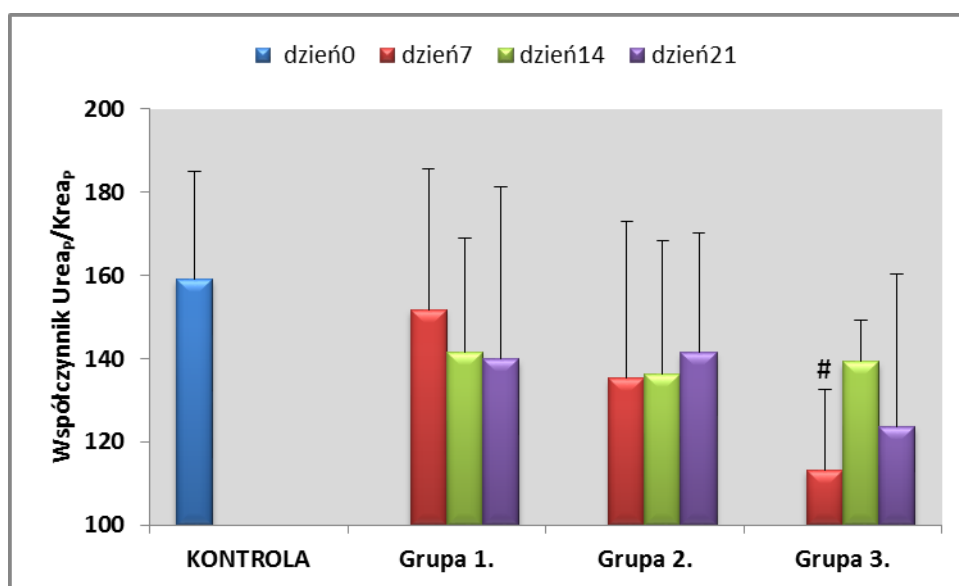
6.2.11 Współczynnik mocznik P/kreatynina P – UreaP/KreaP

Znaczne obniżenie współczynnika Urea_P/Krea_P (29 %) w odniesieniu do kontroli zaobserwowano w 7 dniu doświadczenia w grupie zainfekowanej najwyższą dawką bakterii (grupa 3 – 10⁹j.t.k./ml). W grupie 2 współczynnik ten obniżony był o 10 – 15 % na wszystkich etapach doświadczenia, jednakże wartości te nie osiągnęły istotności statystycznej (Tab.15.,Ryc.14).

Tabela nr 15. Współczynnik Urea_P/Krea_P

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	159,19±25,63	-	-	-	-
7.	-	151,75±33,75	135,25±37,65	113,17±19,36 #	p=0,009
14.	-	141,62±27,46	136,25±32,21	139,33±9,75	p=0,101
21.	-	139,88±41,39	141,38±28,91	123,67±36,6	p=0,08

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi
- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)



Rycina nr 14. Współczynnik Urea_P/Krea_P

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

6.2.12 Współczynnik mocznik U/mocznik P – UreaU/UreaP

Znaczny wzrost współczynnika Urea_U/Urea_P (83 %) w odniesieniu do kontroli zaobserwowano w grupie 1 już w 7 dniu doświadczenia. Jego wartość utrzymywała

się na wysokim poziomie również w 14 dniu eksperymentu i była nadal o 77 % wyższa w odniesieniu do grupy kontrolnej. W grupie 2 wartości współczynnika w 7 dniu różniły się statystycznie od wartości z grupy 1, natomiast w grupie 3 różnice te wystąpiły zarówno w 7 i 14 dniu. W 7 dniu w grupie 3 odnotowano spadek $Urea_U/Urea_P$ o 17 %, przy czym $p > 0,05$. Zaobserwowano ponadto istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.16., Ryc.15.).

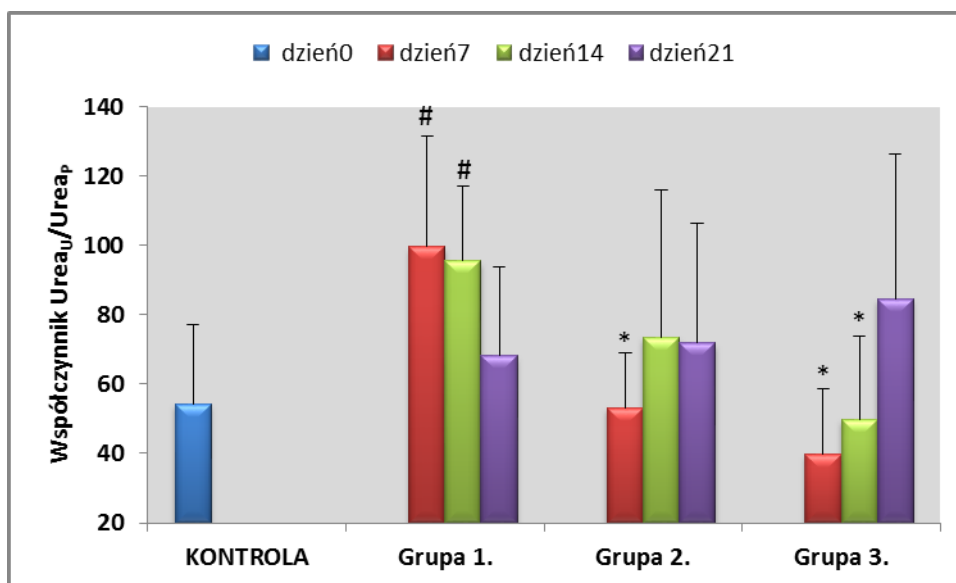
Tabela nr 16. Współczynnik $Urea_U/Urea_P$

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10^5 j.t.k./ml	Grupa 2. 10^7 j.t.k./ml	Grupa 3. 10^9 j.t.k./ml	ANOVA
0.	54,33±22,65	-	-	-	-
7.	-	99,62±32,06 #	53,12±15,87 *	39,83±18,94 *	p<0,001
14.	-	95,62±21,29 #	73,5±42,33	49,83±24,07 *	p=0,005
21.	-	68,12±25,63	71,88±34,49	84,67±41,63	p=0,145

$p \leq 0,05$ wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)



Rycina nr 15. Współczynnik $Urea_U/Urea_P$

- statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

6.2.13 Współczynnik kreatynina U/kreatynina P – Krea_U/Krea_P

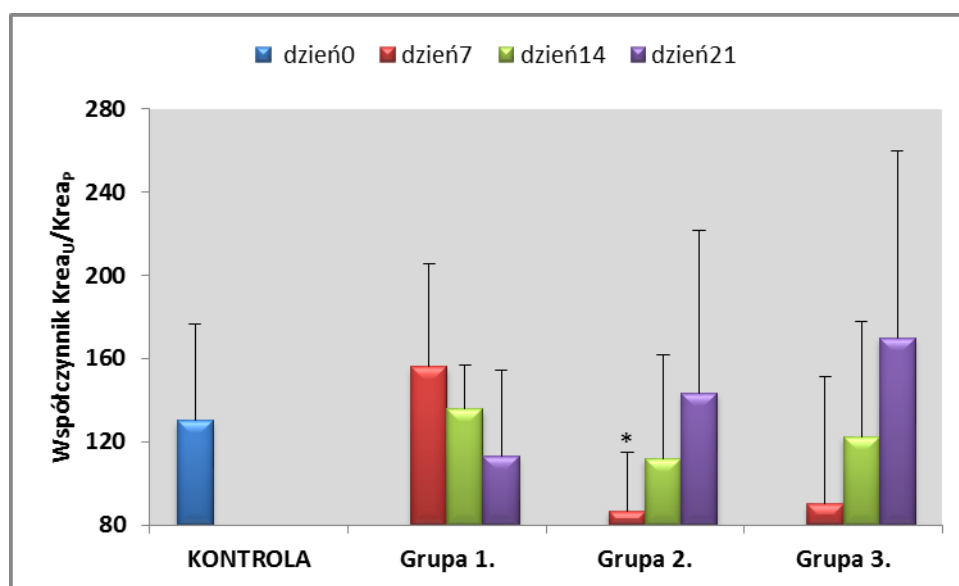
W 7 dniu doświadczenia w grupie 2 odnotowano spadek wartości współczynnika Krea_U/Krea_P o 44 % w porównaniu do grupy 1. Zarówno w grupie 2 i 3 w 7 dniu eksperymentu, wartości współczynników były niższe o odpowiednio 33 % i 30 % w odniesieniu do grupy kontrolnej, jednakże nie osiągnęły istotności statystycznej (Tab.17., Ryc.16.).

Tabela nr 17. Współczynnik Krea_U/Krea_P

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	130±46,44	-	-	-	-
7.	-	155,88±49,9	86,75±28,12 *	90,17±61,04	p=0,013
14.	-	135,62±21,37	118,88±50,02	122,33±55,55	p=0,719
21.	-	113±41,2	143,38±78,07	170±89,56	p=0,337

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 16. Współczynnik Krea_U/Krea_P

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.3 Ocena wpływu ZUM na gospodarkę elektrolitową

Aby ocenić wpływ ZUM na gospodarkę elektrolitową, analizie poddano następujące parametry: stężenie Na i K w surowicy, dobowe wydalanie Na i K, FENa, FEK oraz RFI.

6.3.1 Stężenie sodu w surowicy – Na_p

W 14 dniu doświadczenia w grupie eksperymentalnej 2 i 3 zaobserwowano spadek Na_p w porównaniu do kontroli odpowiednio o 7 % i 6 %. W grupie 2 hiponatremia utrzymywała się do 21 dnia eksperymentu a spadek poziomu Na_p w tym dniu wynosił 9 %. W 21 dniu w grupie 1 odnotowano także obniżenie poziomu Na_p o 14 %, natomiast w grupie 3 stężenie Na_p w 21 dniu oscylowało wokół wartości prawidłowych. Zaobserwowano ponadto istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.18., Ryc.17.).

Tabela nr 18. Na_p (mmol/l)

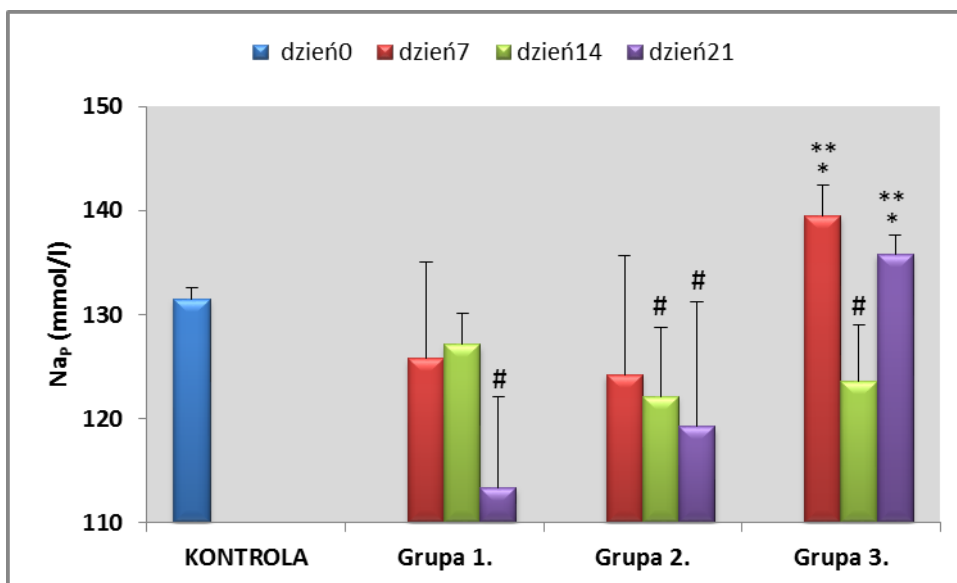
Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	131,52±4,32	-	-	-	-
7.	-	125,75±9,29	124,25±11,44	139,5±2,95 * **	p<0,001
14.	-	127,12±3	122,12±6,66 #	123,6±5,37 #	p<0,001
21.	-	113,38±8,72 #	119,25±12 #	135,83±1,83 * **	p<0,001

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 17. Na_P (mmol/l)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

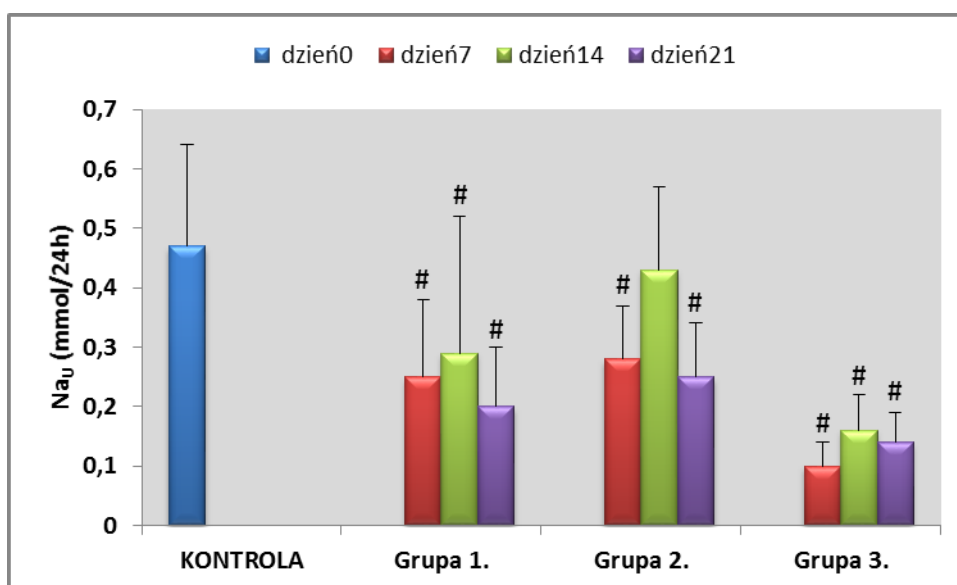
6.3.2 Stężenie sodu w moczu – Na_U

Zmiany w dobowym wydalaniu Na_U widoczne są na każdym etapie doświadczenia w każdej z grup. Już w 7 dniu zaobserwowano zmniejszone dobowe wydalanie Na_U u zwierząt wszystkich grup w odniesieniu do grupy kontrolnej. Stan ten utrzymywał się do ostatniego dnia doświadczenia. W obrębie grupy 1 spadek wydalania Na_U w 7, 14 i 21 dniu wynosił odpowiednio 47 %, 38 % i 58 %. W grupie 2 wydalanie Na_U w 7 dniu obniżyło się o 40 %, natomiast w 21 dniu o 47 %. W grupie 3 wydalanie Na_U kształtowało się na najniższym poziomie i obniżyło się odpowiednio w 7, 14 i 21 dniu o 78 %, 66 % i 70 % (Tab.19., Ryc.18.).

Tabela nr 19. Na_U (mmol/24h)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10^5 j.t.k./ml	Grupa 2. 10^7 j.t.k./ml	Grupa 3. 10^9 j.t.k./ml	ANOVA
0.	$0,47 \pm 0,17$	-	-	-	-
7.	-	$0,25 \pm 0,13$ #	$0,28 \pm 0,09$ #	$0,1 \pm 0,04$ #	$p < 0,001$
14.	-	$0,29 \pm 0,23$ #	$0,43 \pm 0,14$	$0,16 \pm 0,06$ #	$p < 0,001$
21.	-	$0,2 \pm 0,1$ #	$0,25 \pm 0,09$ #	$0,14 \pm 0,05$ #	$p < 0,001$

$p \leq 0,05$ wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi
- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)



Rycina nr 18. Na_U (mmol/24h)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

6.3.3 Frakcjonowane wydalanie sodu – FENa

Wartość FENa to stosunek ilości wydalanego Na z moczem do ilości Na przefiltrowanego w kłębuszku. W grupie 1 wartość FENa zmalała o 53 % w odniesieniu kontroli w 7 dniu doświadczenia. Podobna sytuacja miała miejsce w grupie 3, gdzie wartość FENa w 7 i 21 dniu w porównaniu z grupą kontrolną zmniejszyła się o odpowiednio 63 % i 53 %. W grupie 2, w 14 dniu eksperymentu odnotowano wzrost FENa o 147 %.

Zaobserwowano ponadto istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.20., Ryc.19.).

Tabela nr 20. FENa (%)

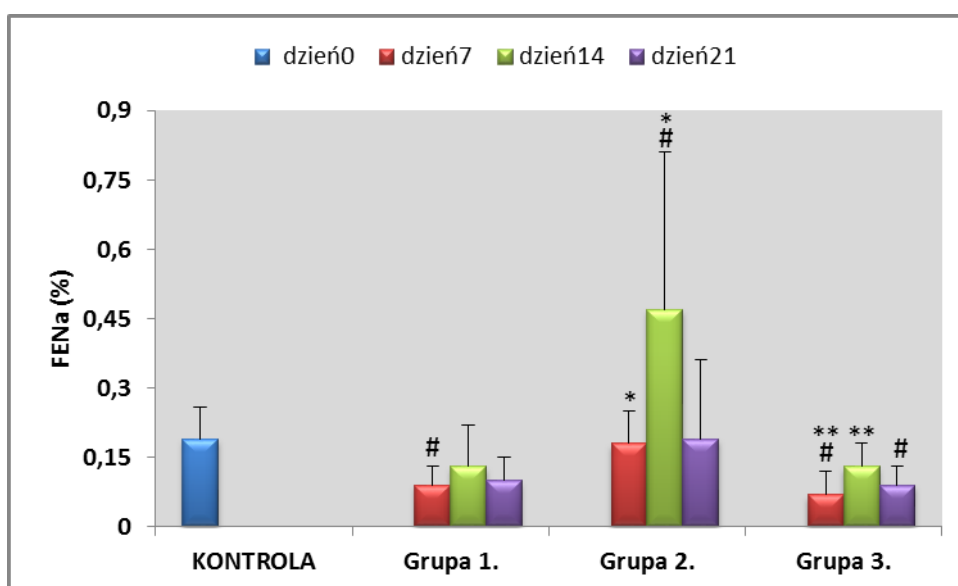
Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	0,19±0,07	-	-	-	-
7.	-	0,09±0,04 #	0,18±0,07 *	0,07±0,05 # **	p<0,001
14.	-	0,13±0,09	0,47±0,34 # *	0,13±0,05 **	p<0,001
21.	-	0,1±0,05	0,19±0,17	0,09±0,04 #	p=0,03

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 19. FENa (%)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.3.4 Stężenie potasu w surowicy – K_P

W trakcie doświadczenia zaobserwowano wzrost stężenia K_P w stosunku do kontroli w grupie 2 i 3. Hiperkaliemia w grupie 2 wystąpiła w 7 dniu doświadczenia, a wzrost stężenia K_P wynosił 59 %. W grupie 3 hiperkaliemia utrzymywała się w 7 i 14 dniu eksperymentu, a poziom K_P był wyższy w odniesieniu do grupy kontrolnej

odpowiednio o 35 % i 66 %. W ostatnim dniu w grupie 3 odnotowano obniżenie poziomu K_p o 12 %. Zaobserwowano również istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.21., Ryc.20.)

Tabela nr 21. K_p (mmol/l)

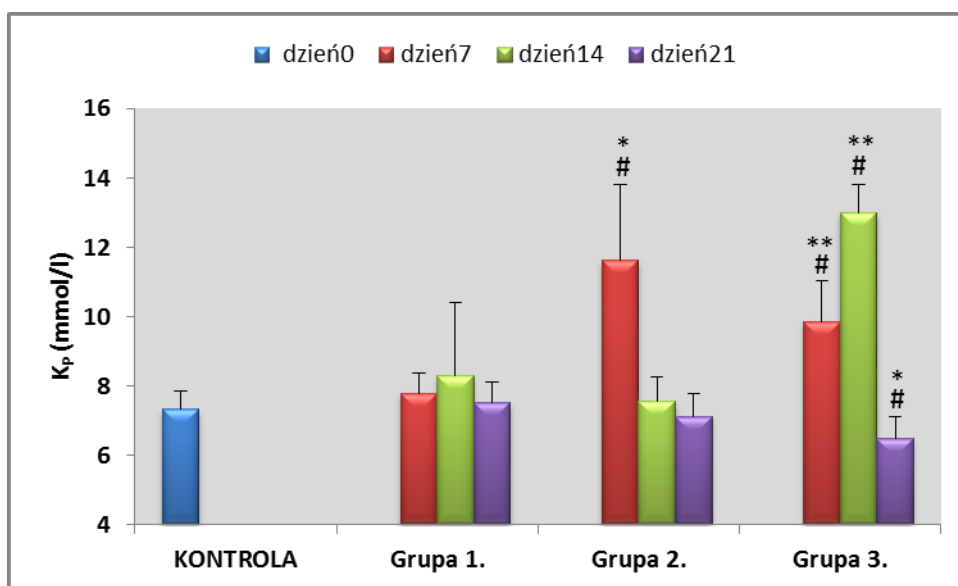
Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	7,32±0,55	-	-	-	-
7.	-	7,8±0,56	11,63±2,17 # *	9,87±1,17 # * **	p<0,001
14.	-	8,3±2,12	7,56±0,72	13±0,82 # * **	p<0,001
21.	-	7,52±0,61	7,13±0,65	6,47±0,63 # *	p=0,012

$p \leq 0,05$ wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)



Rycina nr 20. K_p (mmol/l)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

6.3.5 Stężenie potasu w moczu – K_u

W przebiegu doświadczenia odnotowano spadek dobowego wydalania K_u w odniesieniu do grupy kontrolnej u każdej z grup. W grupie 1 wydalanie obniżyło się o 21 %, 49 % i 32 % odpowiednio w 7, 14 i 21 dniu doświadczenia. W grupie 2 w 7, 14,

i 21 dniu wydalanie K_U zmalało o 68 %, 72 % i 52 %. Największe spadki wartości stężenia K_U zaobserwowano w grupie 3. Wynosiły one odpowiednio w 7, 14 i 21 dniu – 70 %, 83 % i 80 %. Wystąpiły także istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.22., Ryc.21).

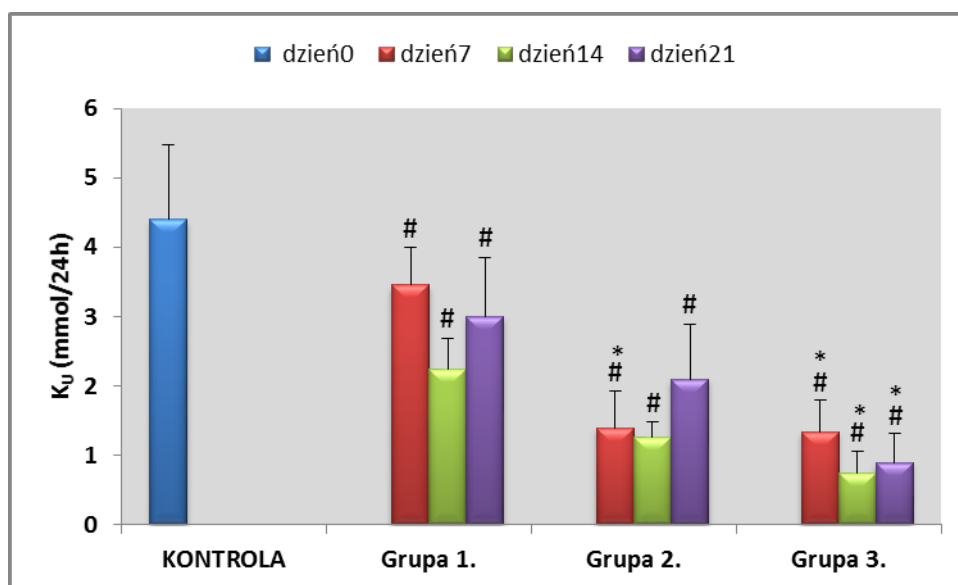
Tabela nr 22. K_U (mmol/24h)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	4,4±1,07	-	-	-	-
7.	-	3,45±0,55 #	1,39±0,53 # *	1,34±0,46 # *	p<0,001
14.	-	2,23±0,45 #	1,25±0,24 #	0,75±0,3 # *	p<0,001
21.	-	3±0,84 #	2,1±0,79 #	0,89±0,42 # *	p<0,001

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 21. K_U (mmol/24h)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.3.6 Frakcjonowane wydalanie potasu – FEK

Wartość FEK to stosunek ilości wydalanego K z moczem do ilości K przefiltrowanego w kłębuszku. Do obniżenia wartości FEK w odniesieniu do kontroli

doszło w grupie 2 w 7 dniu doświadczenia. Spadek artości FEK wyniósł 59 %. W grupie 3 FEK utrzymywało się na obniżonym poziomie od 7 do 21 dnia doświadczenia. Wartości FEK obniżone były odpowiednio o 49 %, 74 % i 57 %. Zaobserwowano ponadto istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 2 i 3 (Tab.23., Ryc.22).

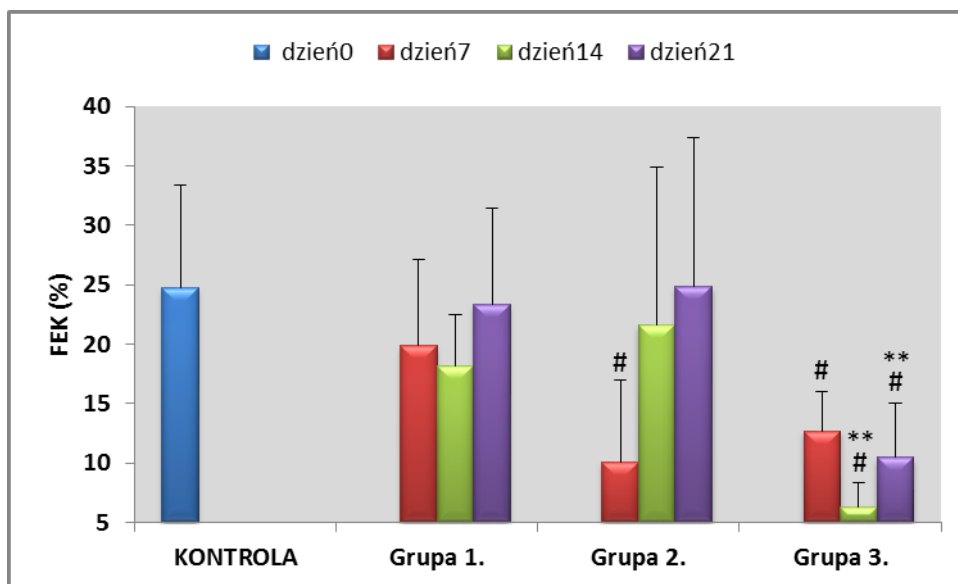
Tabela nr 23. FEK (%)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	24,69±8,72	-	-	-	-
7.	-	19,88±7,18	10,12±6,83 #	12,67±3,33 #	p<0,001
14.	-	18,12±4,32	21,62±13,22	6,33±2,07 # **	p=0,001
21.	-	23,38±8	24,88±12,43	10,5±4,51 # **	p=0,015

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 22. FEK (%)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.3.7 Wskaźnik niewydolności nerek – RFI

Obniżenie wartości RFI w odniesieniu do kontroli zaobserwowano w grupie 1 i 3 w 7 dniu doświadczenia. Spadki wynosiły odpowiednio 48 % i 43 %. W grupie 3 obniżona wartość RFI utrzymywała się do końca doświadczenia, w 21 dniu była niższa o 52 % od wartości wyjściowej. Natomiast w 14 dniu w grupie 2 – RFI było wyższe o 248 % od wartości z dnia „0”. Dodatkowo zaobserwowano istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2 i 3 (Tab. 24., Ryc. 23.).

Tabela nr 24. RFI (mmol/l)

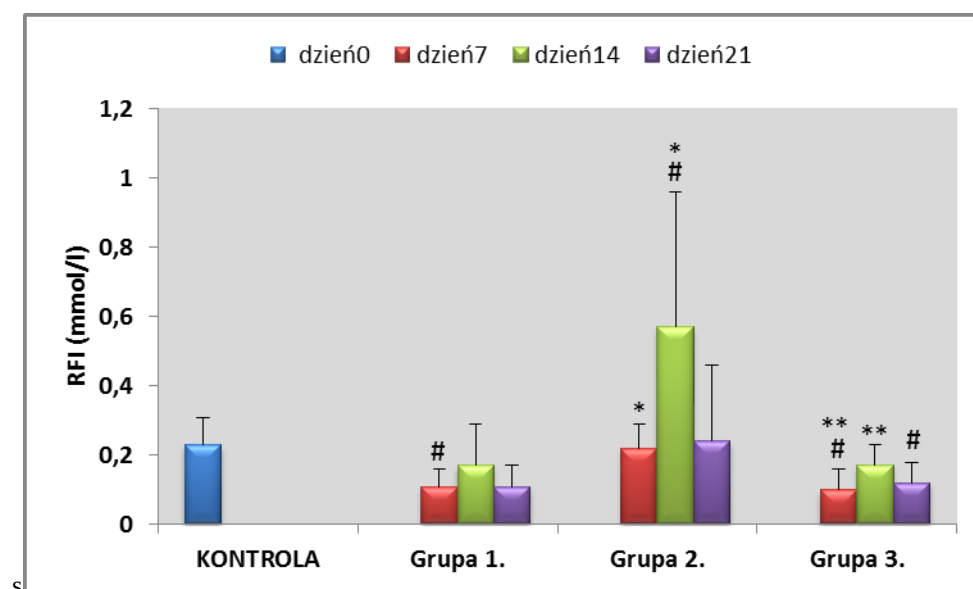
Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	0,23±0,08	-	-	-	-
7.	-	0,11±0,05 #	0,22±0,07 *	0,1±0,06 # **	p<0,001
14.	-	0,17±0,12	0,57±0,39 # *	0,17±0,06 **	p<0,001
21.	-	0,11±0,06	0,24±0,22	0,12±0,06 #	p=0,039

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 23. RFI (mmol/l)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.4 Analiza laboratoryjna białek moczu

Analiza laboratoryjna białek moczu polegała na pomiarze dobowego wydalania białka, ocenie selektywności białek oraz densytometrii frakcji albuminowej.

6.4.1 Dobowe wydalanie białka

Wzrost dobowego wydalania białka z moczem w odniesieniu do grupy kontrolnej, zaobserwowano w grupie 1 i 3. W grupie 1 do prawie 2 – krotnego zwiększenia stężenia białka w DZM doszło w 21 dniu doświadczenia. Podobny wzrost wydalania wystąpił w 7 dniu doświadczenia w grupie 2, jednakże wartości te nie osiągnęły istotności statystycznej. W grupie 3 prawie 3 – krotny wzrost wydalania odnotowano już w 7 dniu doświadczenia. Dodatkowo zaobserwowano istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1 i 3 (Tab.25., Ryc.24).

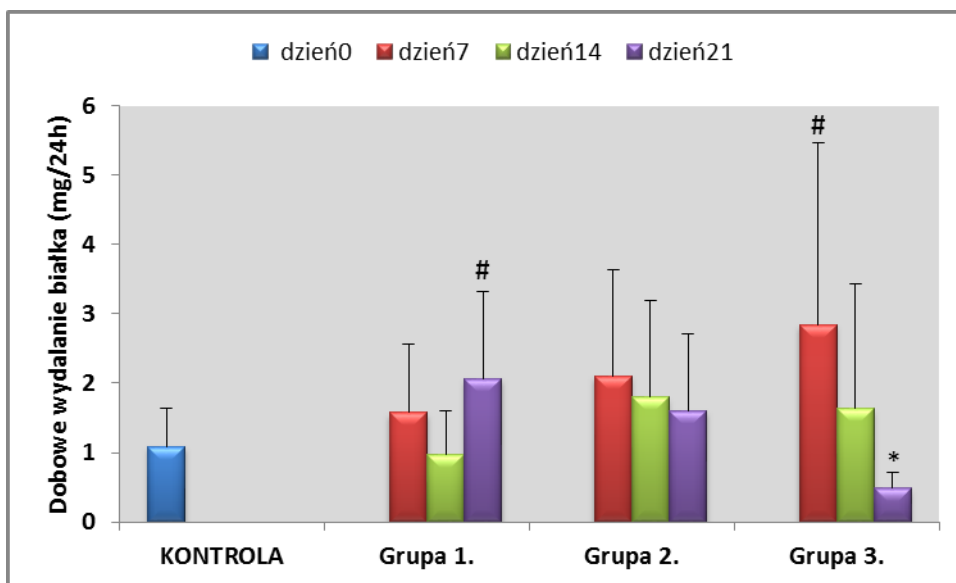
Tabela nr 25. Dobowe wydalanie białka (mg/24h)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	1,09±0,54	-	-	-	-
7.	-	1,58±0,99	2,11±1,53	2,85±2,61 #	p=0,022
14.	-	0,97±0,64	1,8±1,39	1,63±1,8	p=0,235
21.	-	2,07±1,25 #	1,61±1,1	0,49±0,23 *	p=0,006

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 24. Dobowe wydalenie białka (mg/24h)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

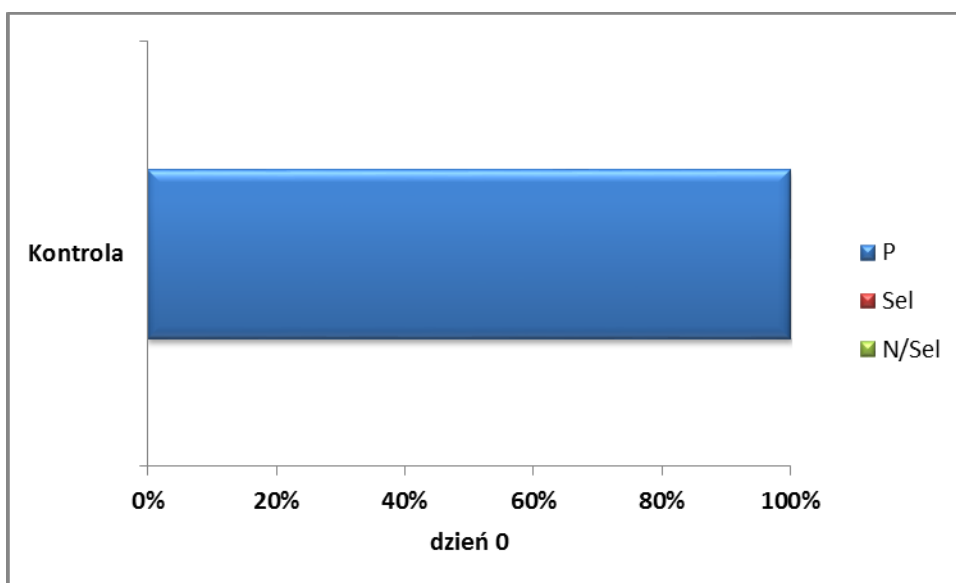
6.4.2 Selektowność białek moczu

Pierwsze zmiany selektowności białek moczu zaobserwowano już w 7 dniu doświadczenia w grupie 2 i 3. W grupie 2 – 25 % poddanych badaniu moczy miało charakter prawidłowy, 25 % selektywny oraz 50 % nieselektywny. W grupie 3 nie występowały mocze prawidłowe, 75 % stanowiły mocze o charakterze selektywnym i 25 % nieselektywnym. W 14 dniu w żadnej z tych grup nie występował mocz o charakterze prawidłowym. W grupie 2 połowę moczy stanowiły te o charakterze selektywnym, oraz pozostałe o charakterze nieselektywnym. W grupie 3 występowało 75 % moczy o charakterze nieselektywnym i tylko 25 % o charakterze selektywnym. Na wszystkich etapach doświadczenia mocz w grupie 1 miał charakter prawidłowy (Tab.26., Ryc.25,26,27,28.).

Tabela nr 26. Selektowność białek moczu

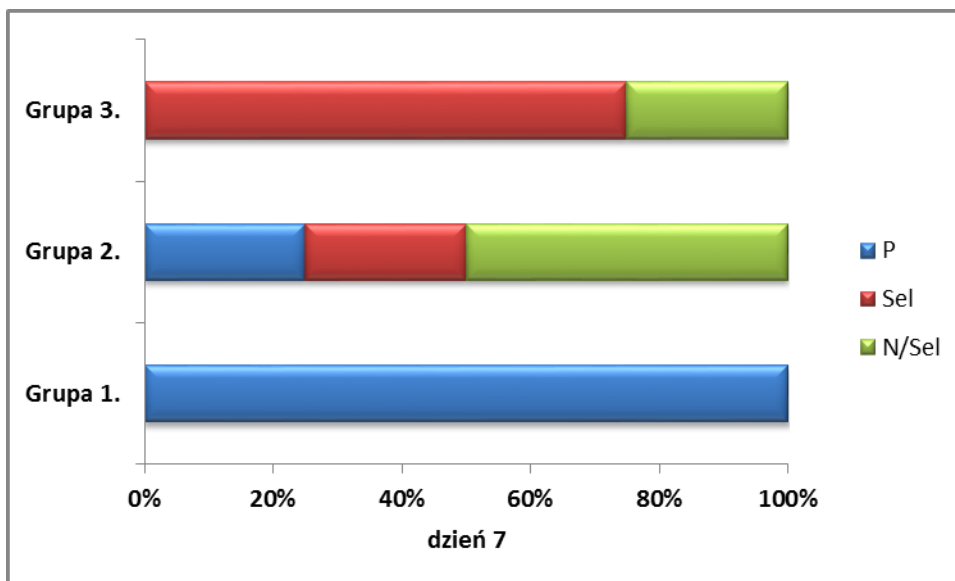
Dzień	Rodzaj moczu	KONTROLA	Grupa1.	Grupa2.	Grupa3.	CHI-KWADRAT
0.	Prawidłowy	100%				
	Selektywny	-	-	-	-	p=1
	Nieselektywny	-				
7.	Prawidłowy		100%	25%	0%	
	Selektywny	-	-	25%	75%	p=0,02
	Nieselektywny		-	50%	25%	
14.	Prawidłowy		100%	0%	0%	
	Selektywny	-	-	50%	25%	p=0,01
	Nieselektywny		-	50%	75%	
21.	Prawidłowy		100%	50%	50%	
	Selektywny	-	-	25%	50%	p=0,418
	Nieselektywny		-	25%	0%	

$p \leq 0,05$ wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

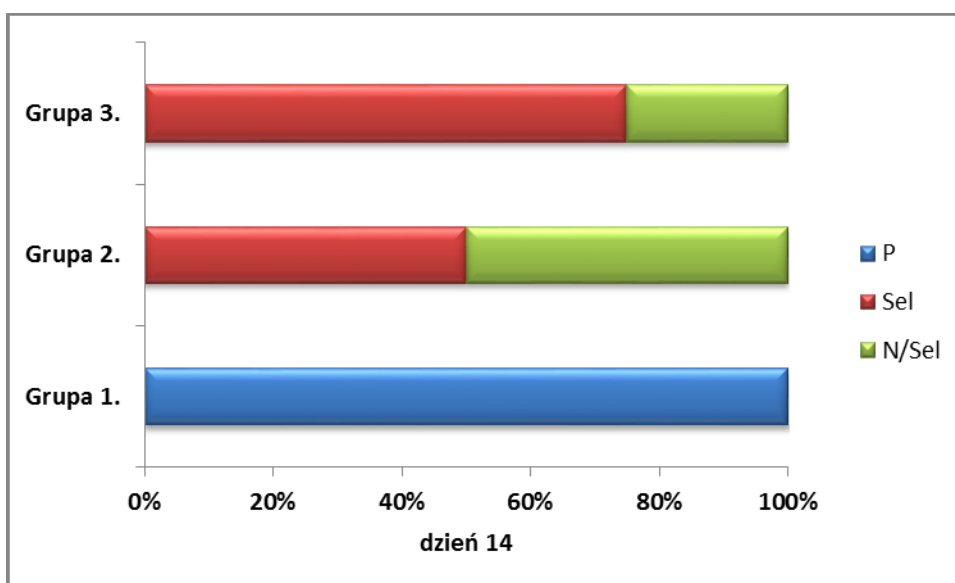


Rycina nr 25. Selektowność białek moczu/ dzień 0

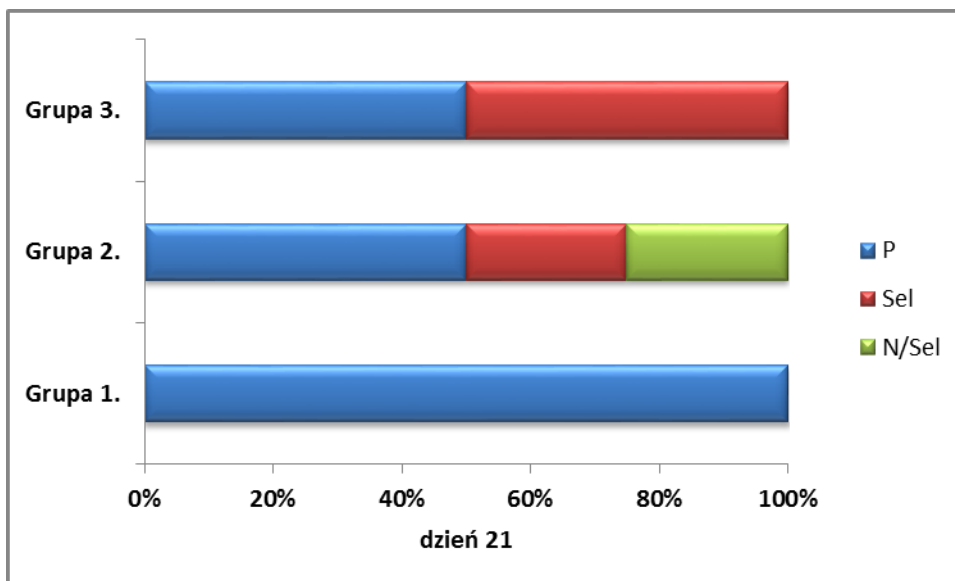
P – mocz prawidłowy, **Sel** – mocz selektywny, **N/Sel** – mocz nieselektywny



Rycina nr 26. Selektowność białek moczu/ dzień 7
P – mocz prawidłowy, Sel – mocz selektywny, N/Sel – mocz nieselektywny



Rycina nr 27. Selektowność białek moczu/ dzień 14
P – mocz prawidłowy, Sel – mocz selektywny, N/Sel – mocz nieselektywny



Rycina nr 28. Selektowność białek moczu/ dzień 21
P – mocz prawidłowy, Sel – mocz selektywny, N/Sel – mocz nieselektywny

6.4.3 Densytometria frakcji albuminowej

Do zwiększenia gęstości frakcji albuminowej w porównaniu do kontroli doszło u wszystkich grup eksperymentalnych. W grupie 1 wartość relatywna frakcji albuminowej wzrosła o 315 % w 14 dniu doświadczenia. W 7, 14 i 21 dniu w grupie 2 wzrost ten wynosił odpowiednio – 400 %, 368 % i 461 %. W grupie 3 zwiększenie gęstości frakcji albumin wystąpiło w 7 i 14 dniu i wynosiło 425 % oraz 500 %. Dodatkowo zaobserwowano istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1 i 3 (Tab.27., Ryc.29.).

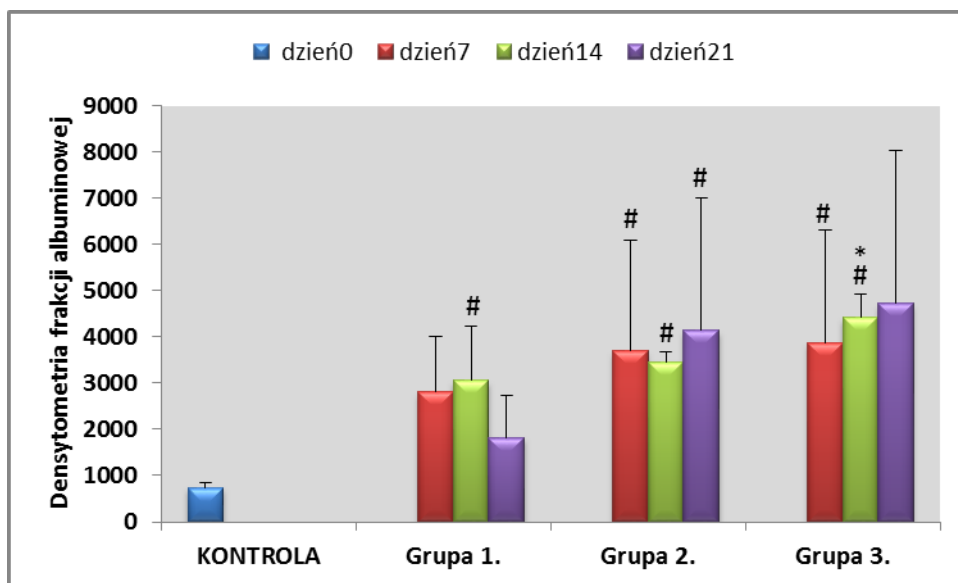
Tabela nr 27. Densytometria frakcji albuminowej

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0.	737,09±111,66	-	-	-	-
7.	-	2815,25±1206,19	3694±2386,88 #	3870,33±2436,82 #	p=0,002
14.	-	3062,25±1172,65 #	3455,25±214,55 #	4422±490,82 # *	p<0,001
21.	-	1821±908,38	4135,75±2861,6 #	4719±3307,08	p=0,002

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (p≤0,05)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 29. Densytometria frakcji albuminowej

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną ($p \leq 0,05$)

* - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu ($p \leq 0,05$)

6.5 Ocena dobrostanu zwierząt doświadczalnych

Do oceny dobrostanu zwierząt doświadczalnych posłużyła kontrola masy ciała oraz masy spożywanego pokarmu.

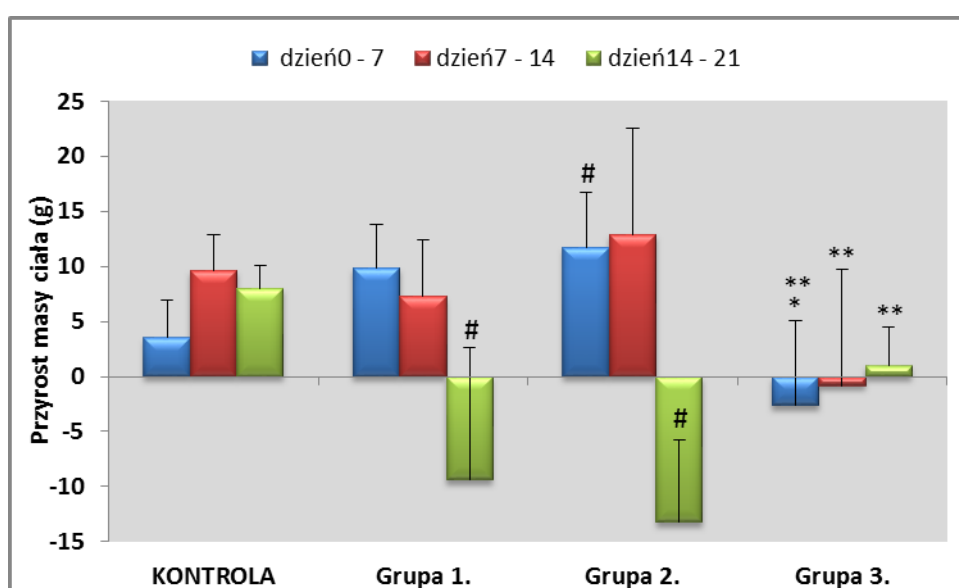
6.5.1 Przyrost masy ciała

W grupie kontrolnej, zwierzęta przybierały na wadze na każdym etapie eksperymentu. Utratę wagi u zwierząt zainfekowanych najniższą i pośrednią dawką pałeczki okrężnicy (grupa 1 – 10^5 j.t.k./ml i 2 – 10^7 j.t.k./ml), zaobserwowano między 14 a 21 dniem doświadczenia. W grupie 3 spadek wagi ciała odnotowano już w pierwszych dniach eksperymentu, jednakże wartości te nie osiągnęły istotności statystycznej. Zaobserwowano natomiast istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.28., Ryc.30.).

Tabela nr 28. Przyrost masy ciała (g)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0-7	3,5±3,42	9,88±3,87	11,75±4,98 #	-2,67±7,74 * **	p<0,001
7-14	9,62±3,29	7,25±5,2	12,88±9,63	-0,83±10,55 **	p=0,018
14-21	8±2,07	-9,43±12,03 #	-13,25±7,5 #	1±3,55 **	p<0,001

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi
 # - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolą w odpowiadającym dniu (p≤0,05)
 * - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)
 ** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 30. Przyrost masy ciała (g)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolą w odpowiadającym dniu (p≤0,05)
 * - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)
 ** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.5.2 Waga spożywanego jedzenia

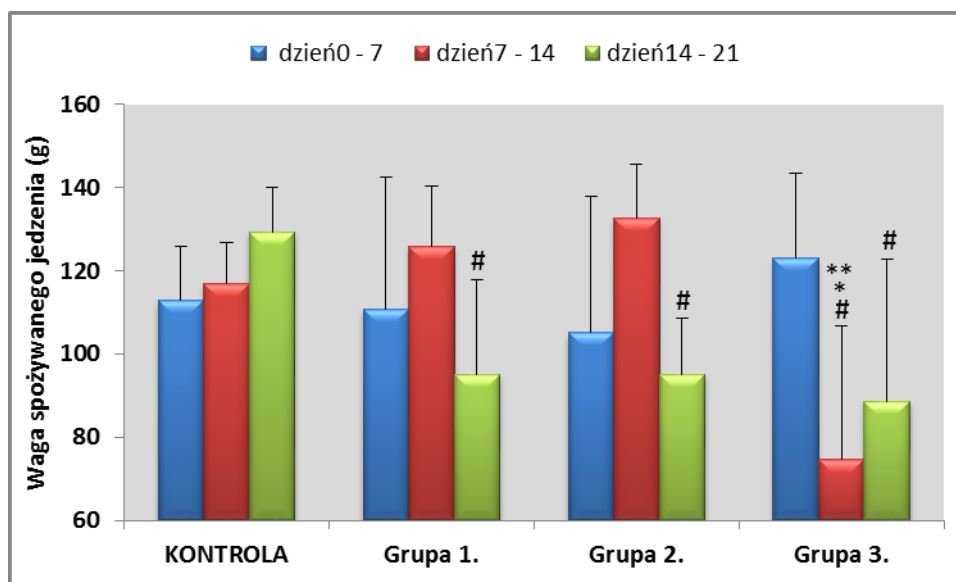
W trakcie doświadczenia zaobserwowano, że w grupie zainfekowanej najniższą i pośrednią dawką bakterii (grupa 1 – 10⁵j.t.k./ml i 2 – 10⁷j.t.k./ml) do zmniejszenia apetytu zwierząt w odniesieniu do grupy kontrolnej doszło między 14 a 21 dniem. W grupie 3 już między 7 a 14 dniem waga spożywanego jedzenia była niższa niż w grupie kontrolnej w odpowiadających pomiarom dniach, a tendencja ta

utrzymała się do ostatniego dnia doświadczenia. Dodatkowo zaobserwowano istotne statystycznie różnice między grupami eksperymentalnymi 1, 2, 3 (Tab.29., Ryc.31.).

Tabela nr 29. Waga spożywanego jedzenia (g)

Dzień	KONTROLA	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml	Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml	Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml	ANOVA
0-7	112,75±13,07	110,88±31,53	105,12±32,78	123±20,5	p=0,656
7-14	116,88±9,89	125,75±14,68	132,62±12,92	74,67±31,92 # * **	p<0,001
14-21	129,95±10,77	95±22,7 #	95,12±13,35 #	88,67±33,93 #	p=0,003

p≤0,05 wskazuje na występowanie statystycznie istotnych różnic między grupami eksperymentalnymi
 # - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolą w odpowiadającym dniu (p≤0,05)
 * - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)
 ** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)



Rycina nr 31. Waga spożywanego jedzenia (g)

- statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolą w odpowiadającym dniu (p≤0,05)
 * - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 1 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)
 ** - statystycznie znamienne różnice pomiędzy grupą badaną a grupą 2 w odpowiadającym dniu (p≤0,05)

6.6 Zbiornicze zestawienie analizowanych parametrów

Poniżej przedstawiono zestawienie większości analizowanych w pracy parametrów. Zamieszczona tabela uwzględnia zmiany w pomiarach o statystycznie istotnym znaczeniu (p≤0,05) (Tab.30.).

Tabela nr 30. Zbiorcze zestawienie analizowanych parametrów

	Grupa 1. 10 ⁵ j.t.k./ml			Grupa 2. 10 ⁷ j.t.k./ml			Grupa 3. 10 ⁹ j.t.k./ml		
Parametr	7	14	21	7	14	21	7	14	21
IL-6	-	-	-	-	-	↓	-	↑	↓
TNF α	-	-	-	-	-	-	-	-	↑
Temperatura	↓	↓	-	↓	↓	-	-	-	-
Objętość DZM	-	↓	-	-	↓	↓	-	↓	↓
KreatP	-	-	-	-	↑	-	↑	-	-
KreatU	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Cl _{Kr}	-	-	-	-	↓	-	↓	↓	-
Ureap	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓
UreaU	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓
Cl _{Urea}	↑	-	-	-	-	-	-	↓	-
FEUrea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kwas moczowy P	-	-	↑	↑	↑	↑	-	↑	-
Kwas moczowy U	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓
Ureap/KreatP	-	-	-	-	-	-	↓	-	-
UreaU/ Ureap	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-
KreatU/ KreatP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaP	-	-	↓	-	↓	↓	-	↓	-
NaU	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓	↓

FENa	↓	-	-	-	↑	-	↓	-	↓
Kp	-	-	-	↑	-	-	↑	↑	↓
Ku	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
FEK	-	-	-	↓	-	-	↓	↓	↓
RFI	↓	-	-	-	↑	-	↓	-	↓
Białko w DZM	-	-	↑	-	-	-	↑	-	-
Densytometria fr. albuminowej	-	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	-
Masa ciała	-	-	↓	↑	-	↓	-	-	-
Waga spożytego pokarmu	-	-	↓	-	-	↓	-	↓	↓

6.7 Ocena histologiczna preparatów pęcherzy i nerek

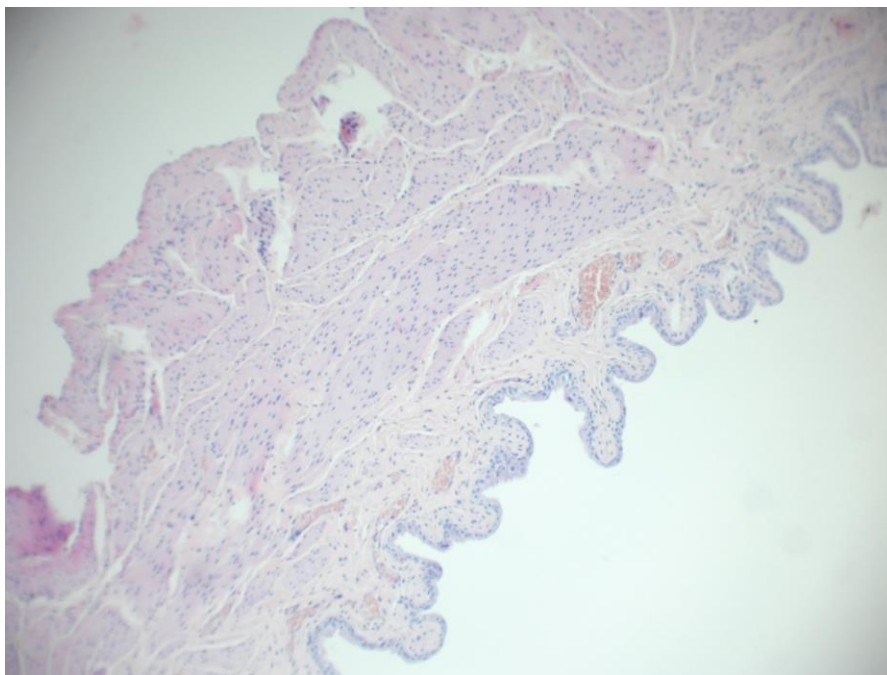
Kontrola. W preparatach histologicznych pęcherzy i nerek nie stwierdzono zmian patologicznych.

Grupa 1 (10^5 j.t.k./ml). W preparatach histologicznych stwierdzono przewlekłe zapalenie pęcherza moczowego z towarzyszącym owrzodzeniem, oraz masywnym naciekiem granulocytarnym i limfocytarnym. Dodatkowo rozpoznano przewlekłe odmiedniczkowe i śródmiąższowe zapalenie nerek charakteryzujące się w obrazie niewielkim naciekiem limfocytarnym. Proces zapalny nie wykraczał poza rdzeń nerki.

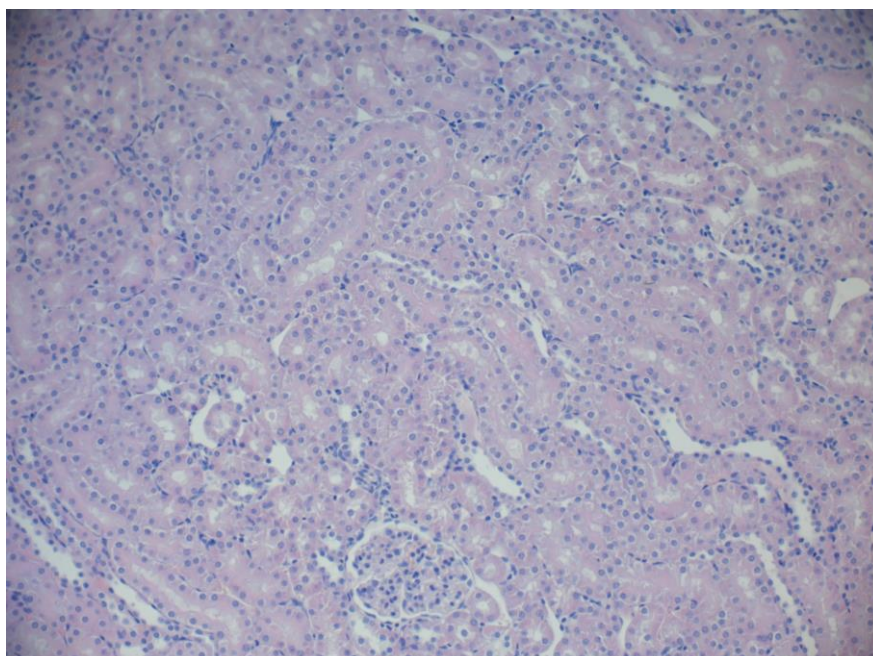
Grupa 2 (10^7 j.t.k./ml). W preparatach histologicznych stwierdzono przewlekłe zapalenie pęcherza moczowego z masywnym naciekiem granulocytarnym i

limfocytarnym. Rozpoznano także przewlekłe odmiedniczkowe zapalenie nerek z towarzyszącymi owrzodzeniami, oraz śródmiąższowe zapalenie nerek z masywnym naciekiem granulocytarnym i limfocytarnym zarówno w obrębie miedniczki i rdzenia. Proces zapalny nie wykraczał poza rdzeń nerki.

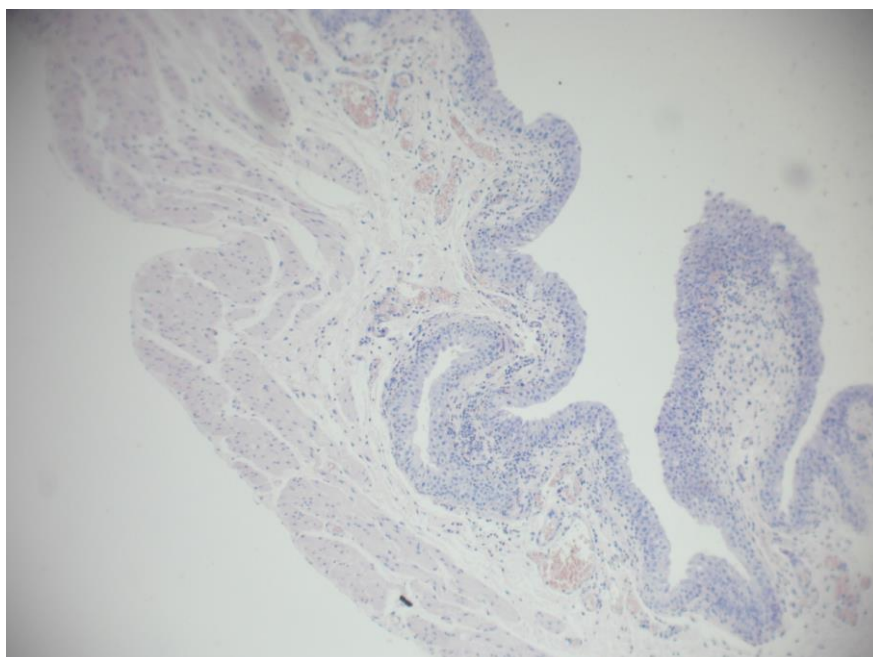
Grupa 3 (10^9 j.t.k./ml). W preparatach histologicznych stwierdzono przewlekłe zapalenie pęcherza moczowego z masywnym naciekiem granulocytarnym i limfocytarnym. Rozpoznano także przewlekłe odmiedniczkowe zapalenie nerek, oraz śródmiąższowe zapalenie nerek obejmujące zarówno rdzeń i korę narządu. Nacieki granulocytarny i limfocytarny w obrębie nerki scharakteryzowano jako masywne.



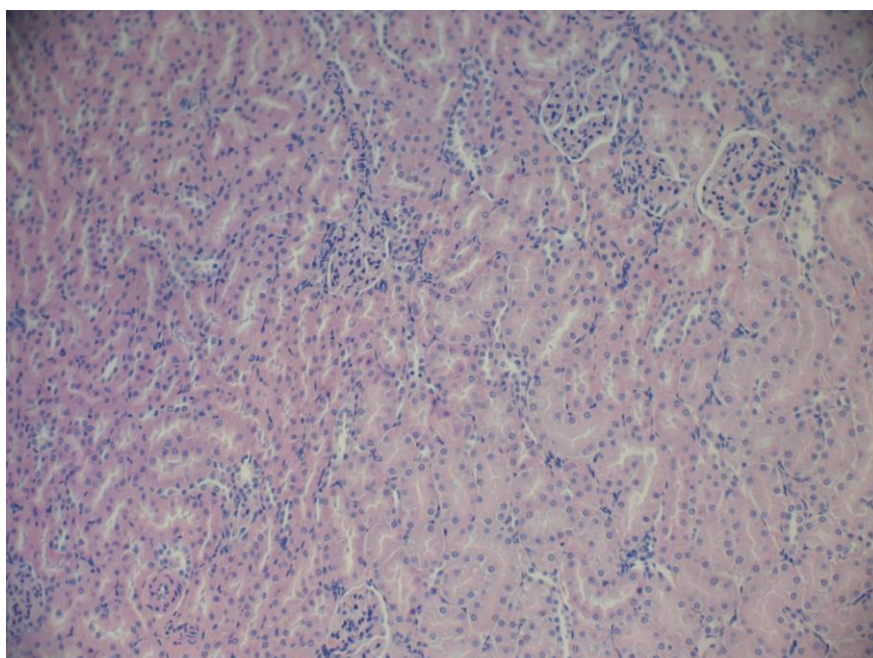
Zdjęcie nr 1. Obraz mikroskopowy ściany pęcherza osobnika zdrowego, barwienie H –E, 10x



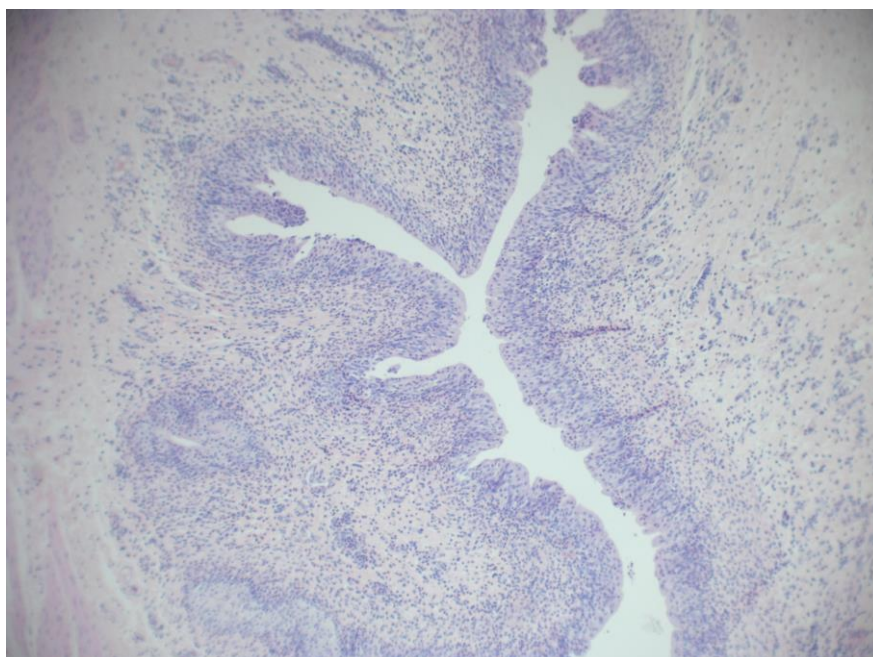
Zdjęcie nr 2. Obraz mikroskopowy nerki osobnika zdrowego, barwienie H – E, 20x



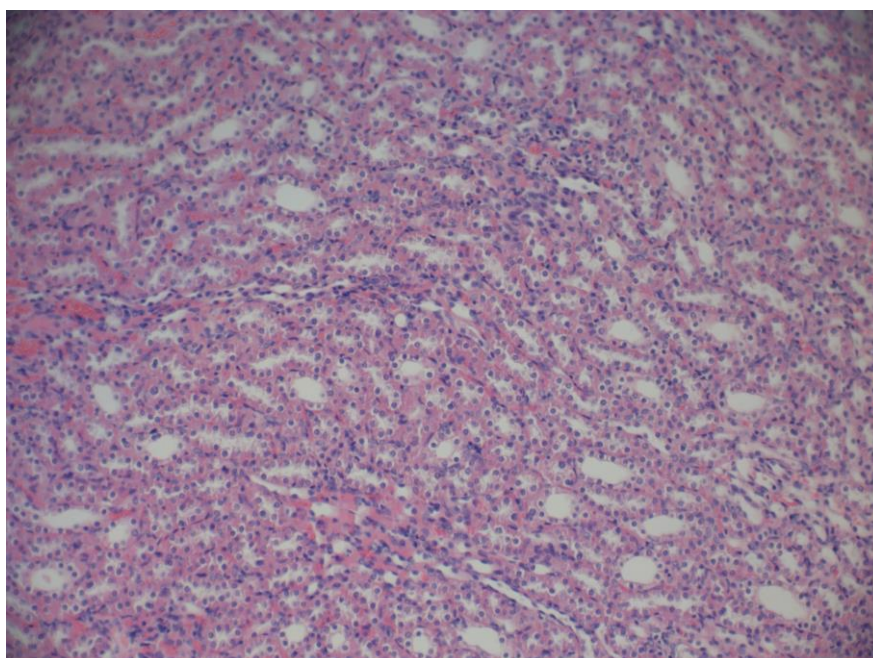
Zdjęcie nr 3. Obraz mikroskopowy ściany pęcherza osobnika z grupy 1 (10^5 j.t.k./ml), barwienie H –E, 10x



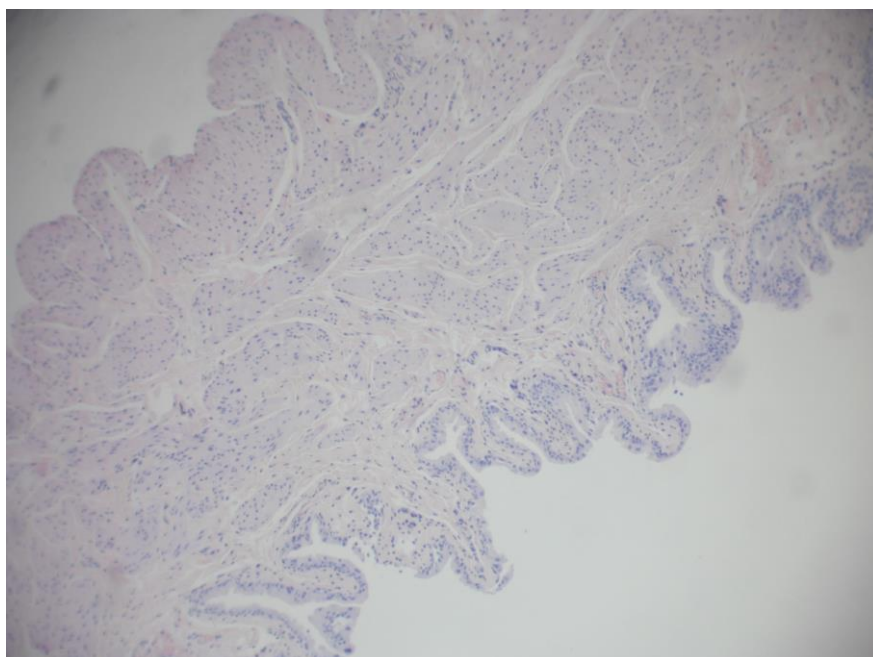
Zdjęcie nr 4. Obraz mikroskopowy nerki osobnika z grupy 1 (10^5 j.t.k./ml), barwienie H – E, 20x



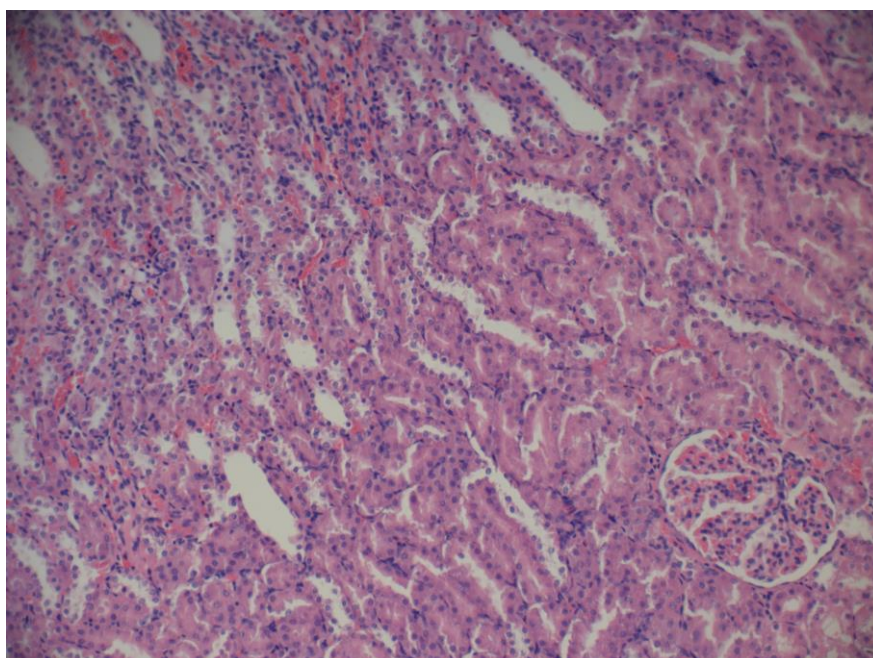
Zdjęcie nr 5. Obraz mikroskopowy ściany pęcherza osobnika z grupy 2 (10^7 j.t.k./ml), barwienie H –E, 10x



Zdjęcie nr 6. Obraz mikroskopowy nerki osobnika z grupy 2 (10^7 j.t.k./ml), barwienie H – E, 20x



Zdjęcie nr 7. Obraz mikroskopowy ściany pęcherza osobnika z grupy 3 (10^9 j.t.k./ml), barwienie H –E, 10x



Zdjęcie nr 8. Obraz mikroskopowy nerki osobnika z grupy 3 (10^9 j.t.k./ml), barwienie H – E, 20x

7. DYSKUSJA

OUN w populacji osób dorosłych, rozwija się w konsekwencji wstępującego powikłanego OZN zaledwie w 2 – 3 % przypadków [88]. W przeprowadzonym eksperymencie, próbujemy odpowiedzieć na pytanie – jaka dawka wysoce wirulentnej pałeczki okrężnicy i czas od momentu jej podania potrzebne są do rozwinięcia się eksperymentalnego OUN będącego konsekwencją ZUM.

Posiewy moczu. Wyniki posiewów moczu, które wykonywano na każdym etapie eksperymentu, miały na celu odpowiedzieć na pytanie, czy w każdej grupie zwierząt w wyniku przezcewkowej iniekcji pałeczki okrężnicy rozwinęło się ZUM. W populacji ludzkiej diagnozę ZUM potwierdza izolacja bakterii z materiału biologicznego jakim jest mocz, pobrany w wystandaryzowany sposób. Rozpoznanie infekcji dróg moczowych wynika z zestawienia ilości wyizolowanych bakterii w badaniu mikrobiologicznym i ściśle określonych reguł rozpoznania ZUM [116, 117]. Ze względu na brak standaryzacji pobierania moczu do celów mikrobiologicznych u zwierząt laboratoryjnych i brak określonych kryteriów rozpoznania stanu zapalnego w drogach moczowych, wykonywane w trakcie doświadczenia posiewy potwierdzały jedynie jakościowo obecność bakterii w drogach moczowych. Brak znamienności statystycznej w ilości izolowanych bakterii między grupą kontrolną, w której mocz był jałowy a grupami eksperymentalnymi, w których izolowano w różnych ilościach użytą w doświadczeniu pałeczkę okrężnicy, wynika z faktu braku standaryzacji metody pozyskiwania moczu do badania mikrobiologicznego. Mocz pobierano w przeciągu pierwszej godziny od momentu rozpoczęcia DZM, po uzyskaniu ilości pozwalającej na wykonanie badania. Inkubacja moczu w zbiorniku, będącym elementem klatki metabolicznej mogła sprzyjać namnażaniu bakterii, zatem liczba izolowanych w badaniu bakterii była sumą bakterii wydalonych z pęcherza moczowego oraz bakterii

namnożonych w trakcie procesu gromadzenia moczu do analizy. Z tego powodu potwierdzenie aktywności i nasilenia stanu zapalnego w drogach moczowych wymagało dodatkowo oznaczenia markerów stanu zapalnego – IL-6, TNF α , oraz markerów uszkodzenia nerek.

Ocena zakażenia i intensywności stanu zapalnego. Ocenie natężenia reakcji organizmu na dopęcherzowe wprowadzenie pałeczki okrężnicy, posłużyło monitorowanie poziomu cytokin prozapalnych: TNF α w surowicy i IL-6 w moczu. W grupie zainfekowanej najwyższą dawką bakterii kałowych (grupa 3 – 10^9 j.t.k./ml), w czasie trwania doświadczenia zaobserwowano znamienne podwyższenie stężenia obu cytokin. Prawidłowość oznaczeń potwierdziła histologiczna ocena układu moczowego, w której wykazano zajęcie pęcherza, rdzenia i kory nerek przez proces zapalny.

TNF α jest cytokiną produkowaną głównie przez monocyty i makrofagi, której podwyższone stężenie wywołane m.in. OZN obserwuje się zarówno w surowicy jak i w moczu. Jej prozapalne właściwości to: aktywacja komórek procesu zapalnego do wydzielania cytokin, działanie pirogenne i chemotaktyczne oraz stymulacja produkcji białka CRP [118]. Prozapalne działanie wykazuje także IL-6, która wraz z TNF α określane są mianem głównych markerów, zarówno fazy ostrej jak i przewlekłej stanu zapalnego [119].

Ponad dwukrotny wzrost stężenia TNF α w grupie 3 (10^9 j.t.k./ml), odnotowany w ostatnim dniu doświadczenia wskazywał na obecność aktywnie toczącego się stanu zapalnego, oraz był pośrednio przyczyną masywnych nacieków komórek zapalnych w obrębie układu moczowego. Przypuszcza się, że wartości stężenia cytokiny były zdecydowanie wyższe na wcześniejszych etapach doświadczenia, gdzie proces zapalny miał charakter ostry. W eksperymencie Tugtepe i wsp., w modelu OZN wywołanym iniekcją pałeczki okrężnicy (10^{10} j.t.k/ml) wykonaną bezpośrednio do

rdzenia nerki, obserwowano 8 – krotny wzrost stężenia TNF α w surowicy już w 24 h doświadczenia i 10 – krotny wzrost w 7 dniu [120]. Natomiast Rugo i wsp., w mysim modelu wstępującego OZN wywołanym dopęcherzowym wlewem pałeczki okrężnicy (10^8 j.t.k/ml), brak detekcji TNF α w surowicy w pierwszych dwóch dobach, tłumaczy lokalną produkcją cytokiny w miejscu namnażania bakterii [121]. Mittal i wsp. z kolei najwyższe stężenie TNF α w surowicy w modelu wstępującego OZN z wykorzystaniem planktonicznego i pozyskanego z biofilmu szczepu *Pseudomonas aeruginosa*, zaobserwowali w 5 dniu doświadczenia [122]. Powyższe eksperymenty pokazują dane tylko dla wymienionych, odmiennych od przedstawionych w naszym eksperymencie punktów czasowych. Ponadto w zdecydowanej większości prac ze względu na łatwość pozyskania materiału do badania, poziom TNF α monitorowany jest w moczu, tym samym pojawia się trudność w odniesieniu wyników naszych badań do innych autorów.

IL-6 oznaczana w moczu to parametr służący ocenie aktywności stanu zapalnego m.in. w drogach moczowych [123]. Wykorzystywana jest także w celach naukowych jako wczesny marker rozwoju OUN oraz prognozowania utrzymywania się uszkodzenia [98, 124]. W badaniach Rugo i wsp. poza analizą stężenia TNF α w przebiegu OZN, skupiono się także na wydalaniu IL-6. Zaobserwowano wówczas, że najwyższe stężenie wydalanego z moczem IL-6 przypadało na 6 – 12 h po aktywacji stanu zapalnego w drogach moczowych, po czym ulegało spadkowi i oscylowało wokół wartości kontrolnych [121]. W naszym badaniu brak jest danych z tak wczesnego etapu ZUM. Zauważono natomiast, że poziom IL-6 w moczu był najwyższy w 14 dniu od aktywacji ZUM zarówno w grupie zainfekowanej pośrednią jak i najwyższą dawką bakterii (grupa 2 – 10^7 j.t.k./ml i 3 – 10^9 j.t.k./ml). Wskazuje to, że w grupach tych zaistniało ryzyko rozwoju OUN w między 7 a 21 dniem po indukcji

ZUM, przy czym zdecydowanie bardziej narażona na wystąpienie uszkodzenia była grupa 3 (10^9 j.t.k./ml).

Ze względu na właściwości pirogenne obu cytokin – IL-6 i TNF α , postanowiono monitorować także temperaturę ciała zwierząt z toczącym się stanem zapalnym w obrębie dróg moczowych. Znamienne odchylenia od normy w ciepłocie zaobserwowano tylko na początkowym etapie doświadczenia u zwierząt zainfekowanych niską i pośrednią dawką pałeczki okrężnicy (grupa 1 – 10^5 j.t.k./ml i 2 – 10^7 j.t.k./ml). W pracy Otto i wsp. stwierdzono, że gorączka u pacjentów z ZUM jest wynikiem zwiększonego uwalniania IL-6 przez komórki stanu zapalnego [125]. Nasze wyniki pokazują, że największa zmiana ciepłoty ciała nastąpiła na etapie eksperymentu, w którym nie odnotowano zmian w stężeniu tej cytokiny. Natomiast, począwszy od 7 dnia eksperymentu – nieprawidłowe, odbiegające od normy wartości temperatury ciała u zwierząt, odnotowano we wszystkich grupach eksperymentalnych. Pomiary te wskazywały, że zarówno w grupie 1 (10^5 j.t.k./ml), 2 (10^7 j.t.k./ml) i 3 (10^9 j.t.k./ml) doszło do rozwinięcia się stanu zapalnego w obrębie dróg moczowych, jednakże zmiany te nie korelowały ze stężeniem cytokin o działaniu pirogennym.

Laboratoryjna ocena funkcji filtracyjnej nerek. Zakażenie nerek, rozwijające się w konsekwencji kolonizacji dolnego odcinka układu moczowego, rozpoczyna się od rdzenia, przechodząc na przyległe części kory. Bakterie w miąższu nerki powodują rozwój stanu zapalnego i aktywację procesów immunologicznych, które przez lokalne działanie cytokin zmieniają hemodynamikę narządu, oraz prowadzą do upośledzenia jego funkcji. Rzadko obserwuje się cechy niewydolności, istnieje jednak ryzyko rozwoju ostrego śródmiąższowego zapalenia, będącego jedną z przyczyn nerkowego OUN [126,46]. IL-6 i TNF α są cytokinami, których podwyższone stężenia świadczą o aktywności stanu zapalnego, ale także ze względu na swoje prozapalne właściwości są

odpowiedzialne za podtrzymanie tego procesu, pogłębiając upośledzenie funkcji narządu [127]. W naszym doświadczeniu to upośledzenie przejawia się zmianą w parametrach charakteryzujących funkcje filtracyjne nerki.

Zajęcie miąższu nerki przez bakterie i proces zapalny, doprowadziło do znacznego ograniczenia i zmniejszenia liczby sprawnych nefronów – rdzeniowych w przypadku grupy 2 (10^7 j.t.k./ml), rdzeniowych i korowych w przypadku grupy 3 (10^9 j.t.k./ml). Konsekwencją tego procesu był zaobserwowany przez nas spadek diurezy, wzrost poziomu Kreat_p i zmniejszenie Cl_{Kr} – parametru odzwierciedlającego GFR. W obrębie grupy 2 (10^7 j.t.k./ml) i 3 (10^9 j.t.k./ml), w których szczególnie zauważalny był wzrost wydalania IL-6 z moczem, objętość DZM w obu grupach w 14 i 21 dniu doświadczenia była odpowiednio ~ 50 % i ~ 40 % mniejsza w porównaniu do objętości moczu z okresu przed indukcją ZUM. Ponieważ, jednym z kryteriów rozpoznania OUN jest ograniczona produkcja moczu, przypuszcza się, że w obrębie grup zainfekowanych dawką pośrednią i najwyższą pałeczki okrężnicy (grupa 2 – 10^7 j.t.k./ml i 3 – 10^9 j.t.k./ml) między 7 a 21 dniem eksperymentu prawdopodobnie doszło do rozwoju OUN.

Świadczące o pogorszeniu sprawności filtracyjnej narządu, podniesienie poziomu Kreat_p, zaobserwowano w 7 dniu doświadczenia w grupie 3 – 10^9 j.t.k./ml (40 %), oraz w 14 dniu w grupie 2 – 10^7 j.t.k./ml (35 %). Podobny – 30 % i 40 % wzrost kreatyninemii odpowiednio w 3 i 14 dniu doświadczenia, odnotowali Malekinejad i wsp. przy śródmiąższowo wprowadzonej do nerki pałeczce okrężnicy w dawce 10^6 – 10^7 j.t.k./ml [128]. Przeciwnie, zdecydowanie wyższy, bo prawie pięciokrotny wzrost poziomu Kreat_p opisano z kolei w pracy Sener'a i wsp., w której OZN uzyskano przez śródmiąższową iniekcję E. coli w dawce 10^{10} j.t.k./ml [129]. Wynikający z zaobserwowanych przez nas zmian w poziomie Kreat_p spadek GFR,

odnotowano natomiast w 14 dniu doświadczenia w grupie 2 – 10^7 j.t.k./ml (48 %), oraz w 7 i 14 dniu w grupie 3 – 10^7 j.t.k./ml (43 %, 52 %). W pracy Heyman'a i wsp., w modelu OUN będącym konsekwencją podania środka cieniującego, spadek GFR był zdecydowanie wyższy, wynosił aż 71 % [130]. Nie ulega więc wątpliwości, że pogorszenie czynności filtracyjnej nerki – wzrost kreatyninemia i obniżenie GFR – zależy od sposobu podania (śródmiażdżowo, przezcewkowo), rodzaju (bakteria, kontrast) i dawki czynnika etiologicznego. W naszym przypadku potwierdza to wzrost kreatyninemia w grupie zainfekowanej niższą dawką pałeczki okrężnicy w późniejszym etapie doświadczenia. Ze względu na fakt, że wzrost poziomu Krea_p jest kolejnym kryterium brany pod uwagę przy diagnozowaniu OUN [80], można zatem wnioskować, że w grupie 2 (10^7 j.t.k./ml) i 3 (10^9 j.t.k./ml) między 7 a 21 dniem doświadczenia prawdopodobnie rozwinęło się OUN, przy czym w grupie 3 (10^9 j.t.k./ml) funkcja filtracyjna nerki była w większym stopniu upośledzona.

Niekorzystnym zmianom w poziomie Krea_p i GFR, towarzyszyły zarówno w grupie 2 (10^7 j.t.k./ml) jak i 3 (10^9 j.t.k./ml) zmniejszone wartości klirensu mocznika, zwiększone stężenia kwasu moczowego w surowicy i obniżone wydalanie kwasu z moczem. Dowiedziono, że wynikające ze spadku przesączania kłębuszkowego zmniejszone wydalanie kwasu moczowego, jest przyczyną krystalizacji kwasu w obrębie kanalika nerkowego i zaostrzenia procesu zapalnego obejmującego nerki [131, 132]. Prozapalne działanie tego metabolitu, poza krystalizacją, wynika również z aktywacji MCP-1, CRP, p38 MAPK, a także działania prooksydacyjnego. Podwyższone stężenie kwasu moczowego przez zahamowanie NOS1, redukcję NO oraz stymulację układu RAA prowadzi do przebudowy naczyń w obrębie nerek i upośledzenia ich funkcji [133,134]. Wysoki poziom tego metabolitu w surowicy zwiększa ryzyko wystąpienia OUN u pacjentów po operacjach kardiochirurgicznych,

w których dochodzi do znacznego obniżenia nerkowego przepływu krwi i spadku GFR [135,136]. Obliczono także, że wzrost stężenia kwasu moczowego u ludzi o 1 mg/dl powyżej wartości prawidłowych (15 – 30 %) zwiększa ryzyko wystąpienia OUN o 74 % [137]. W przebiegu naszego doświadczenia, spadek GFR o 34 % w grupie 2 (10^7 j.t.k./ml) spowodował trzykrotny wzrost poziomu kwasu moczowego w surowicy, natomiast obniżenie poziomu GFR o 43 % w grupie 3 (10^9 j.t.k./ml) wywołało niemalże dwukrotny wzrost poziomu tego metabolitu. Wysokie stężenia w surowicy i zmniejszone wydalanie kwasu z moczem utrzymywało się do końca eksperymentu. Na podstawie tych zmian i faktu, że kwas moczowy jest markerem wykrywania i oceny rozwoju OUN, możemy przypuszczać że w grupie 2 (10^7 j.t.k./ml) i 3 (10^9 j.t.k./ml), w przebiegu wstępującego ZUM doszło do ostrego uszkodzenia narządu w między 7 a 21 dniem eksperymentu.

Ocena wpływu ZUM na gospodarkę elektrolitową. Konsekwencją spadku GFR, uszkadzającego wpływu kwasu moczowego na nerki i zmian w retencji wody były zaobserwowane w doświadczeniu zaburzenia gospodarki elektrolitowej [138,139]. W grupach zainfekowanych pośrednią i wysoką dawką bakterii pałeczki okrężnicy (grupa 2 – 10^7 j.t.k./ml i 3 – 10^9 j.t.k./ml) zaobserwowano hiperkaliemię i hiponatremię, które potwierdzały zajęcie nerek przez proces zapalny, oraz wskazywały na nerkową etiologię zaburzeń [140,141]. Produkowane w miejscu objętym stanem zapalnym mediatory, stały się przyczyną upośledzenia transportu jonowego i zmian w homeostazie elektrolitowej. Zaobserwowana dyselektrolitemia wynikała głównie z redukującego wpływu cytokin – IL-1 i PGE2 – na aktywność Na-K-ATPazy błonowej, oraz wpływu prostaglandyn na hemodynamikę narządu [104-106]. Hiperkaliemia i hiponatremia są zaburzeniami często diagnozowanymi wraz z rozpoznaniem OZN [142,143,144] oraz OUN [145]. Hiponatremia w głównej mierze jest wynikiem

przewodnienia związanego z upośledzeniem diurezy – anurii lub oligurii, natomiast hiperkaliemia rozwija się w konsekwencji zaburzonego wydalania potasu przez uszkodzone cewki [146]. W pracy Hsieh i wsp. wyliczono, że w przebiegu przewlekłej choroby nerek każdy spadek GFR o 10 ml/min generuje przyrost stężenia potasu w surowicy o 0,117 mmol/l [147]. W naszym eksperymencie 32 % spadek GFR w grupie 2 (10^7 j.t.k./ml) i 43 % spadek GFR w grupie 3 (10^9 j.t.k./ml) w 7 dniu doświadczenia był przyczyną podniesienia poziomu potasu o odpowiednio 4,3 mmol/l i 2,55 mmol/l. Natomiast obniżony o połowę GFR w 14 dniu doświadczenia w grupie 3 (10^9 j.t.k./ml) spowodował wzrost stężenia potasu w surowicy o 5,68 mmol/l. Zmianom tym w obrębie obu grup – 2 (10^7 j.t.k./ml) i 3 (10^9 j.t.k./ml) – towarzyszył także potwierdzający wystąpienie hiperkaliemii spadek FEK. Przypuszczamy, że większy przyrost stężenia potasu w surowicy zaobserwowany w naszym doświadczeniu zapewne spowodowany był odmiennym niż w PNN, ostrym przebiegiem procesu zapalnego w obrębie narządu, oraz wynikał także z różnic w zakresie norm dla stężenia potasu w surowicy zwierząt eksperymentalnych. Współistnienie zaburzeń elektrolitowych, wraz ze zmianami wartości stężeń parametrów świadczących o upośledzeniu funkcji filtracyjnej nerki, oraz histologicznym obrazem narządu jest dodatkowym czynnikiem sugerującym możliwość wystąpienia OUN w grupie 2 (10^7 j.t.k./ml) i 3 (10^9 j.t.k./ml) w przebiegu przeprowadzonego przez nas doświadczenia.

Oznaczanie stężenia elektrolitów w przebiegu OUN jest istotne nie tylko z powodu konsekwencji, jakie niosą za sobą dyselektrolitemie, ale także ze względu na fakt, że pewne parametry pozwalają na określenie przyczyny wystąpienia uszkodzenia narządu. Parametrem na podstawie którego w praktyce klinicznej różnicuje się postacie OUN jest m.in. FENa [148]. Według literatury spadek wartości FENa

przemawia za przednerkową etiologią uszkodzenia narządu, natomiast jego wzrost potwierdza że do rozwinięcia OUN doszło z przyczyn nerkowych [149,150]. Wyniki oznaczeń przeprowadzonych w trakcie naszego eksperymentu zasugerowały, że poza nerkową, wywołaną ZUM etiologią uszkodzenia narządu, w obrębie jednej z grup, mogło dojść do rozwinięcia się przednerkowej komponenty OUN czyli uogólnionego zakażenia organizmu. Na każdym etapie doświadczenia obniżenie poziomu FENa odnotowano w obrębie grupy zainfekowanej najwyższą dawką pałeczki okrężnicy (grupa 3 – 10^9 j.t.k./ml). W 7, 14 i 21 dniu FENa zmniejszyło się o odpowiednio 63 %, 32 % i 53 %. Odminną tendencję zauważono natomiast w grupie zainfekowanej pośrednią dawką bakterii (grupa 2 – 10^7 j.t.k./ml). W 14 dniu eksperymentu wzrost FENa wynosił aż 147 %. Wskazuje to zatem na nerkową etiologię uszkodzenia narządu w obrębie grupy 2 (10^7 j.t.k./ml) i przednerkową etiologię uszkodzenia w obrębie grupy 3 (10^9 j.t.k./ml). W badaniach Langenberg’a i wsp. w modelu ostrej niewydolności nerek spowodowanej wprowadzeniem pałeczki okrężnicy (dawka $3,9 \times 10^9$ j.t.k./ml) do krwioobiegu, zaobserwowano zmniejszenie wartości FENa aż o 92 % [151]. Większy spadek wartości tego parametru, w porównaniu do uzyskanych przez nas wyników, wynikał zapewne ze sposobu podania bakterii i ilości bakterii krążących w krwioobiegu, ale także z faktu współistnienia w naszym modelu także nerkowej komponenty uszkodzenia narządu. Przednerkową etiologię uszkodzenia nerek w grupie 3 (10^9 j.t.k./ml) potwierdza również zdecydowanie niższe niż w grupie 2 (10^7 j.t.k./ml) wydalanie sodu, ale także obniżenie wartości FEUrea – czyli parametrów wykorzystywanych w różnicowaniu OUN.

Analiza laboratoryjna białek moczu. Do masywnej utraty białka w przebiegu ostrej postaci CSZN dochodzi jedynie w zapaleniu indukowanym nadwrażliwością na leki (np. NLPZ). W wynikach badania moczu pacjentów z ostrym infekcyjnym OZN –

przeciwnie – nie stwierdza się dużego białkomoczu, zwykle nie przekracza on wartości 1g/24h [152, 153]. Ze względu na etiologię bakteryjną CŚZN, w trakcie prowadzonego przez nas eksperymentu, zaobserwowano umiarkowanie zwiększone wydalenie białka w każdej z grup, przy czym największa proteinuria dotyczyła grupy zainfekowanej najwyższą dawką pałeczki okrężnicy (grupa 3 – 10^9 j.t.k./ml). Wydawało by się, że zwiększone wydalenie białka z moczem wiąże się z obecnością bakteryjnego stanu zapalnego układu moczowego, który głównie powoduje wzmożoną produkcję białka – uromoduliny, wiążącego bakteryjne fimbrie typu I. W celu dokładniejszej analizy białkomoczu, wykonano badanie selektywności białek, które ujawniło że w grupie zainfekowanej niską dawką pałeczki okrężnicy (grupa 1 – 10^5 j.t.k./ml), mocz na każdym etapie badania pozostaje prawidłowy z zauważalnym poszerzeniem strefy albuminowej. Odmierna sytuacja miała miejsce w obrębie grupy 2 (10^7 j.t.k./ml) i 3 (10^9 j.t.k./ml), gdzie charakter białkomoczu zmieniał się w przebiegu doświadczenia. Poza poszerzeniem strefy albuminowej, stwierdzono w moczu grup zainfekowanych pośrednią i najwyższą dawką bakterii pałeczki okrężnicy (grupa 2 – 10^7 j.t.k./ml, grupa 3 – 10^9 j.t.k./ml) obecność transferyny oraz immunoglobulin, a zmiany te utrzymywały się aż do 21 dnia doświadczenia. Obserwowano zarówno mocz selektywny i nieselektywny – co pozwala wnioskować, że w wyniku działania cytokin, enzymów i wolnych rodników uwalnianych przez komórki układu białkrwinkowego, poza zajęciem przez proces zapalny kompartmentu cewkowo – śródmiąższowego, doszło także do uszkodzenia kłębuszków nerkowych. Murakami i wsp. opisuje zmiany w selektywności białek moczu w przebiegu OUN, będącego konsekwencją nefropatii naczyńioruchowej [154]. Zmiany w profilu białek wydalanых z moczem w przebiegu uszkodzenia narządu należy więc tłumaczyć zaistniałą w trakcie uszkodzenia dysfunkcją komórek kłębuszka – podocytów.

W pracy Oudemans-van Straaten, udowodniono że surowica pacjentów z ostrą niewydolnością nerek, rozwijającą się w konsekwencji bakteriemii, w warunkach in-vitro działa proapoptotycznie na komórki cewek nerkowych i podocytów, co skutkuje zmianom selektywności białek wydalanych z moczem [155]. W porównaniu z podocytami, komórki nabłonkowe cewek nerkowych są wrażliwsze na spadek przepływu nerkowego, natomiast podocyty bardziej narażone są na działanie cytokin, oraz w przypadku etiologii bakteryjnej – endotoksyn. Reasumując dysfunkcja nabłonka cewek nerkowych i podocytów wynika z odrębnego patomechanizmu uszkodzenia tych struktur, co w wynikach laboratoryjnych widoczne jest jako zmiana selektywności białek wydalanych z moczem.

Zbiorne zestawienie analizowanych wyników. Analizując zbiorcze zestawienie wyników, widoczna jest zależność pomiędzy dawką czynnika etiologicznego użytego w doświadczeniu a obserwowanymi skutkami. W grupie zainfekowanej niską dawką pałeczki okrężnicy (grupa 1 – 10^5 j.t.k./ml), zmiany w funkcji filtracyjnej nerki są najmniej nasilone, niemniej jednak również w obrębie tej grupy w badaniu histologicznym stwierdza się obecność bakterii w mięszu narządu. Im wyższa dawka pałeczki okrężnicy, tym więcej parametrów analizowanych w doświadczeniu ulegało pogorszeniu, oraz tym większy obszar narządu został objęty przez proces zapalny. Na podstawie uzyskanych w trakcie eksperymentu wyników można ustalić pewną granicę między dawką odpowiedzialną za objawy nerkowego OUN, a dawką w konsekwencji której podania poza komponentą nerkową uszkodzenia rozwija się także zakażenie ogólnoustrojowe. Wykazanie przez nas tej zależności, wydaje się mieć duże znaczenie kliniczne. Pozwala to z dużym prawdopodobieństwem założyć, że nawet u pacjenta z bezobjawowym bakteriomoczem, który zgodnie z wytycznymi postępowania terapeutycznego nie musi

podlegać eradykacji drobnoustrojów z układu moczowego, może rozwinąć się CŚZN, które z kolei zwiększa ryzyko wystąpienia ostrej lub przewlekłej postaci uszkodzenia narządu.

8. WNIOSKI

1. OZN rozwija się w wyniku indukcji ZUM z zastosowaniem każdej, użytej w doświadczeniu dawki bakterii pałeczki okrężnicy z czynnikiem wirulencji odpowiadającym za kolonizację górnego odcinka układu moczowego – fimbrii typu II.
2. Dawka indukująca ZUM ma wpływ na przebieg zakażenia oraz rozległość stanu zapalnego układu moczowego według prostej zależności – im wyższa dawka indukująca tym gwałtowniejszy przebieg zakażenia, oraz większy obszar narządu objęty procesem zapalnym.
3. OUN w przebiegu OZN było konsekwencją przezcewkowej indukcji ZUM z wykorzystaniem wysokowirulentnej bakterii pałeczki okrężnicy w dawce 10^7 i 10^9 j.t.k./ml.
4. Wzrostowi poziomu kreatyniny w surowicy i zaburzeniom diurezy towarzyszyły zwiększone stężenia markerów OUN – IL-6 i kwasu moczowego.
5. Dawka pośrednia pałeczki okrężnicy – 10^7 j.t.k./ml była przyczyną izolowanego, nerkowego OUN, natomiast dawka 10^9 j.t.k. spowodowała OUN będące konsekwencją wstępującego OZN, ale także bakteriemii i urosepsy (komponenta przednerkowa).
6. Precyzyjne określenie czasu wystąpienia OUN w obrębie grup wymaga przeprowadzenia badań w oparciu o mniejsze odstępy czasowe.

9. SUMMARY

Zapalenie układu moczowego jest schorzeniem w 80 % przypadków wywołanym przez bakterie – pałeczkę okrężnicy. Ogranicza się najczęściej do dolnego odcinka układu moczowego, może przebiegać również jako OZN, które z kolei jest czynnikiem ryzyka rozwoju OUN. OUN jest gwałtownym pogorszeniem się funkcji narządu, diagnozowanym na podstawie wzrostu kreatyniny w surowicy i zaburzeń diurezy. Stan ten obarczony jest wysokim ryzykiem zgonu, oraz rozwoju PNN.

Celem doświadczenia było analityczne opracowanie modelu OUN, które rozwija się w wyniku wstępującego ZUM, spowodowanego najczęściej izolowaną z moczu pacjentów bakterią – pałeczką okrężnicy.

Do badania nad OUN będącym konsekwencją ZUM wykorzystano samice szczurów rasy Wistar. Zwierzęta podzielono na grupy. Grupie 1, 2 i 3 ZUM indukowano przez przezcewkowy wlew zawiesiny bakterii w trzech różnych dawkach, odpowiednio – 10^5 , 10^7 , 10^9 j.t.k./ml. W 0, 7, 14 i 21 dniu doświadczenia w celu oceny funkcji filtracyjnej nerek pobierano mocz i krew do analizy. Zanalizowano 30 różnych parametrów, takich jak: objętość DZM, wydalanie białka z moczem, TNF α , FENa, FEK, kwas moczowy w surowicy i w moczu, kreatynina i mocznik w surowicy i w moczu itp.

Z przeprowadzonych badań wynikało, że OZN rozwija się w wyniku indukcji ZUM z zastosowaniem każdej, użytej w doświadczeniu dawki bakterii pałeczki okrężnicy z czynnikiem wirulencji, odpowiadającym za kolonizację górnego odcinka układu moczowego – fimbrii typu II. Dawka indukująca ZUM miała wpływ na przebieg zakażenia oraz rozległość stanu zapalnego układu moczowego według prostej zależności – im wyższa dawka indukująca tym gwałtowniejszy przebieg zakażenia, oraz większy obszar narządu objęty procesem zapalnym. OUN w przebiegu OZN było

konsekwencją przezcewkowej indukcji ZUM z wykorzystaniem wysokowirulentnej bakterii pałeczki okrężnicy w dawce 10^7 i 10^9 j.t.k./ml (grupa 2 i 3). OUN diagnozowano na podstawie wzrostu poziomu kreatyniny w surowicy i zaburzeń diurezy, którym towarzyszyły zwiększone stężenia markerów OUN – IL-6 i kwasu moczowego. Dawka pośrednia pałeczki okrężnicy – 10^7 j.t.k./ml była przyczyną izolowanego, nerkowego OUN, natomiast dawka 10^9 j.t.k./ml spowodowała OUN będące konsekwencją wstępującego OZN, ale także bakteriemii i urosepsy (komponenta przednerkowa).

Na podstawie uzyskanych wyników nie można określić konkretnego czasu wystąpienia uszkodzenia narządu, ponieważ wymaga to przeprowadzenia badań w oparciu o mniejsze odstępy czasowe.

Urinary tract infection – UTI – is a disease in 80 % of cases caused by *Escherichia coli*. It mostly affects the lower urinary tract, and it may also occur as pyelonephritis, which in turn is a risk factor for acute kidney injury – AKI. AKI is rapid deterioration of kidney function, which is diagnosed on the basis of creatinine plasma increase and diuresis disorders. This condition involves high morbidity risk or occurrence of chronic kidney disease.

The aim of the experiment was to develop an analytical model of the AKI that develops as a result of ascending UTI caused most frequently by the isolated from the urine of patients bacteria - *E. coli*.

For studies of AKI which occurs as a consequence of UTI, female Wistar rats were used. The animals were divided into groups. On zero day, group 1, 2 and 3 UTI was induced via urethra infusion of a suspension of bacteria in three different doses of – 10^5 , 10^7 , 10^9 c.f.u./ml. On the days 0, 7, 14 and 21 of the experiment urine and blood

were taken for analysis, in order to assess the renal filtration function. 30 various parameters were analyzed such as: amount of 24-hour-urine collection, protein in urine, TNF α , FENa, FEK, uric acid plasma and urine level, creatinine and urea plasma and urine level etc.

The studies showed that pyelonephritis develops as a result of induction of UTI by using in the course of experiment, any of the doses of the bacteria *E. coli* with virulence factor responsible for the colonization of the upper urinary tract - type II fimbriae. UTI – inducing dose had an impact on the course of infection and the extent of inflammation of the urinary tract by a simple relationship – the higher the induced dose is, the more rapid is the course of the infection, and the larger the area of the organ involved in the process of inflammation. AKI in the course of pyelonephritis was the consequence of transurethral induction of UTI by using highly virulent bacteria *E. coli* in a dose 10^5 and 10^9 c.f.u/ml (group 2 and 3). AKI was diagnosed on the basis of the growth in serum creatinine level and urine disorders, accompanied by increased concentrations of markers of AKI – IL-6 and uric acid. The intermediate dose of *E. coli* – 10^7 c.f.u/ml was the cause of isolated, renal AKI, whereas dose 10^9 c.f.u/ml caused AKI as a consequence of UTI ascend, but also bacteremia and urosepsy (prerenal component).

On the basis of the results obtained in the experiment, the particular time of the occurrence of the organ defect cannot be specified, because it requires testing based on smaller time intervals.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Duława J. Zakażenia układu moczowego w: Choroby dróg moczowych, Nefrologia. Wielka interna. Myśliwiec M. (red.). Medical Tribune Polska, Warszawa 2009.
2. Medina-Bombardó D, Jovers Palmer A. Does clinical examination aid in the diagnosis of urinary tract infections in women? A systematic review and meta-analysis. *BMC Fam Pract.* 2011 Oct 10;12:111.
3. Moura A, Nicolau A, Hooton T, Azeredo J. Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. *J Appl Microbiol.* 2009 Jun;106(6):1779-91.
4. Czekalski S. Zakażenie układu moczowego – ostre, nawracające, przewlekłe, powikłane. *Przew Lek.* 2010; 2: 46-53.
5. Trowsdale J. Antygen presentation In: Immunology Roitt I, Brostoff J, Male D. Mosby, Sixth edition, 2001.
6. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res.* 2001; 7(3):167-202.
7. Rook G. Immunity to bacteria and fungi in: Immunology. Roitt I, Brostoff J, Male D. Mosby, Sixth edition, 2001.
8. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000; 118(2):503-8.
9. Hewitt IK, Montini G. Pediatric febrile urinary tract infections: the current state of play. *Ital J Pediatr.* 2011; 37: 57.
10. Wald E. Urinary tract infections in infants and children: a comprehensive overview. *Curr Opin Pediatr.* 2004; 16:85–88.
11. Saadeh SA, Mattoo TK. Managing urinary tract infections. *Pediatr Nephrol.* 2011; 26(11):1967-76.
12. Mattoo TK. Are prophylactic antibiotics indicated after a urinary tract infection? *Curr Opin Pediatr.* 2009 Apr;21(2):203-6.
13. Brumbaugh AR, Mobley HL. Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2012 Jun;11(6):663-76.
14. Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull.* 2011 Apr;58(4):B4187.
15. McMurdo MET, Gillespie ND. Urinary tract infection in old age: over-diagnosed and over-treated. *Age Ageing.* 2000;29:297–298.

16. Beveridge LA, Davey PG, Phillips G, McMurdo ME. Optimal management of urinary tract infections in older people. *Clin Interv Aging*. 2011;6:173-80.
17. López MJ, Cortés JA. Urinary tract colonization and infection in critically ill patients. *Med Intensiva*. 2012 Mar;36(2):143-51.
18. Prakash J. The kidney in pregnancy: A journey of three decades. *Indian J Nephrol*. 2012 May-Jun; 22(3): 159–167.
19. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon*. 2003; 49:53-70.
20. Sivick KE, Mobley HL. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infect Immun*. 2010 Feb;78(2):568-85.
21. Cohn EB, Schaeffer AJ. Urinary tract infections in adults. *Scientific World Journal*. 2004 Jun 7;4 Suppl 1:76-88.
22. Zorc JJ, Kiddoo DA, Shaw KN. Diagnosis and management of pediatric urinary tract infections. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Apr;18(2):417-22.
23. Duława J, Drabczyk R. Zakażenia układu moczowego w: Choroby wewnętrzne, Szczeklik A.(red), Medycyna Praktyczna, Kraków 2010.
24. Hooton TM. Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection. *N Engl J Med*. 2012 Mar 15;366(11):1028-37.
25. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Mikrobiologia*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2011.
26. Salyers AA, Whit DD. *Mikrobiologia – różnorodność, chorobotwórczość, środowisko*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
27. Herrmann V, Palma P, Géo MS, Lima RS. Urinary tract infections: pathogenesis and related conditions. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2002;13(3):210-3.
28. Mirecka A. Adhezja uropatogennych szczepów *Escherichia coli* do komórek nabłonka moczowego. Patomechanizm zakażeń układu moczowego. *Przegląd urologiczny*. 2011/12/4 (68).
29. Pinkner JS, Remaut H, Buelens F, Miller E, Aberg V, Pemberton N, Hedenström M, Larsson A, Seed P, Waksman G, Hultgren SJ, Almqvist F. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 21;103(47):17897-902.
30. Bouckaert J, Mackenzie J, De Paz JL, Chipwaza B, Choudhury D, Zavialov A, Mannerstedt K, Anderson J, Piérard D, Wyns L, Seeberger PH, Oscarson S, De Greve H, Knight SD. The affinity of the FimH fimbrial adhesin is receptor-driven

- and quasi-independent of *Escherichia coli* pathotypes. *Mol Microbiol.* 2006 September; 61(6): 1556–1568.
31. Andersson M, Uhlin BE, Fällman E, Chassin C, Goujon JM. The biomechanical properties of *E. coli* pili for urinary tract attachment reflect the host environment. *Biophys J.* 2007 Nov 1;93(9):3008-14.
 32. Chassin C, Goujon JM, Darche S, du Merle L, Bens M, Cluzeaud F, Werts C, Ogier-Denis E, Le Bouguénec C, Buzoni-Gatel D, Vandewalle A. Renal collecting duct epithelial cells react to pyelonephritis-associated *Escherichia coli* by activating distinct TLR4-dependent and -independent inflammatory pathways. *J Immunol.* 2006 Oct 1;177(7):4773-84.
 33. Servin AL. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2005 April; 18(2): 264–292.
 34. Ong CL, Ulett GC, Mabbett AN, Beatson SA, Webb RI, Monaghan W, Nimmo GR, Looke DF, McEwan AG, Schembri MA. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2008 Feb;190(3):1054-63.
 35. Ulett GC, Valle J, Beloin C, Sherlock O, Ghigo JM, Schembri MA. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infect Immun.* 2007 Jul;75(7):3233-44.
 36. Rashid RA, Tarr PI, Moseley SL. Expression of the *Escherichia coli* IrgA homolog adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. *Microb Pathog.* 2006 Dec;41(6):207-17
 37. Kupilas A. Zakażenie układu moczowego. *Przegląd urologiczny* 2006/7/4 (38).
 38. Colgan R, Nicolle LE, McGlone A, Hooton TM. Asymptomatic bacteriuria in adults. *Am Fam Physician.* 2006 Sep 15;74(6):985-90.
 39. Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, Rice JC, Schaeffer A, Hooton TM. Infectious Diseases Society of America; American Society of Nephrology; American Geriatric Society. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis.* 2005 Mar 1;40(5):643-54.
 40. Hoberman A, Charron M, Hickey RW, Baskin M, Kearney DH, Wald ER. Imaging studies after a first febrile urinary tract infection in young children. *N Engl J Med.* 2003 Jan 16;348(3):195-202.

41. Schmiemann G, Kniehl E, Gebhardt K, Matejczyk MM, Hummers-Pradier E. The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review. *Dtsch Arztebl Int.* 2010 May;107(21):361-7.
42. Richens J. Main presentations of sexually transmitted infections in men. *BMJ.* 2004 May 22;328(7450):1251-3.
43. Chung A, Arianayagam M, Rashid P. Bacterial cystitis in women. *Aust Fam Physician.* 2010 May;39(5):295-8.
44. DH, Schaeffer AJ. Current concepts in urinary tract infections. *Minerva Urol Nefrol.* 2004 Mar;56(1):15-31.
45. Hooton TM. Uncomplicated Urinary Tract Infection. *N Engl J Med.* 2012; 366:1028-1037.
46. Ramakrishnan K, Scheid DC. Diagnosis and management of acute pyelonephritis in adults. *Am Fam Physician.* 2005 Mar 1;71(5):933-42.
47. Mazzulli T. Diagnosis and management of simple and complicated urinary tract infections (UTIs). *Can J Urol.* 2012 Oct;19 Suppl 1:42-8.
48. Wolski Z. Niepowikłane i powikłane zakażenia układu moczowego – przyczyny, profilaktyka. *Przew Lek.* 2001, 4, 10, 69-73.
49. Colgan R, Williams M. Diagnosis and treatment of acute uncomplicated cystitis. *Am Fam Physician.* 2011 Oct 1;84(7):771-6.
50. Tiffany S, Lenaine W. Nawracające zakażenia układu moczowego u kobiet. *Medycyna po Dyplomie.* 2004; 13:83-91.
51. Wasik-Olejek A. Nawracające zakażenia układu moczowego – profilaktyka i leczenie. *Przew Lek.* 2009; 5: 18-23
52. Kupiła A. Przewlekłe zakażenia układu moczowego. *Przegląd Urologiczny.* 2010/11/5 (63).
53. Czaczyk K, Myska K. Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia.* 2007; 1(76): 40-52
54. Czaczyk K, Wojciechowska K. Tworzenie biofilmów bakteryjnych – istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań. *Biotechnologia.* 2003, nr 3, ss. 180–192.
55. Kołwzan B. Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochrona środowiska.* 2011, 33(4): 3-14.
56. Przybyła J, Sosnowski M. Ostre i przewlekłe zakażenia dróg moczowych – diagnostyka i leczenie. *Przew Lek.* 2008; 4: 71-77.

57. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000;21:510-5.
58. Kalra OP, Raizada A. Approach to a patient with urosepsis. *J Glob Infect Dis.* 2009 Jan;1(1):57-63.
59. Cardoso T, Ribeiro O, Costa-Pereira A, Carneiro A. Community-acquired and healthcare-related urosepsis: A multicenter prospective study. *Crit Care.* 2008;12:8.
60. Colgan R, Williams M, Johnson JR. Diagnosis and treatment of acute pyelonephritis in women. *Am Fam Physician.* 2011 Sep 1;84(5):519-26.
61. Czaja CA, Scholes D, Hooton TM, Stamm WE. Population-based epidemiologic analysis of acute pyelonephritis. *Clin Infect Dis.* 2007;45(3):273-280.
62. Nicolle LE. Complicated pyelonephritis: unresolved issues. *Curr Infect Dis Rep.* 2007;9(6):501-507.
63. Kodner CM, Kudrimoti A. Diagnosis and management of acute interstitial nephritis. *Am Fam Physician.* 2003 Jun 15;67(12):2527-34.
64. Sawicki W. *Histologia.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa 2009.
65. Michel DM, Kelly CJ. Acute interstitial nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:506-15.
66. Nishitarumizu K, Tokuda Y, Uehara H, Taira M, Taira K. Tubulointerstitial nephritis associated with Legionnaires' disease. *Intern Med.* 2000;39:150-3.
67. Rastegar A, Kashgarian M. The clinical spectrum of tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int.* 1998 Aug;54(2):313-27.
68. Dharnidharka V.R, Araya C.E, Henry D.D. *Acute Interstitial Nephritis in Pediatric Nephrology in the ICU.* S.G. Kiessling et al. (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009.
69. Lee DG, Cho JJ, Park HK, Kim DK, Kim JI, Chang SG, Lee SJ. Preventive effects of hyaluronic acid on Escherichia coli-induced urinary tract infection in rat. *Urology.* 2010 Apr;75(4):949-54.
70. Görür S, Celik S, Hakverdi S, Aslantaş O, Erdoğan S, Aydın M, Ocak S, Namik Kiper A. Preventive effect of rolipram, a phosphodiesterase 4 enzyme inhibitor, on oxidative renal injury in acute ascending pyelonephritis model in rats. *Urology.* 2008 Oct;72(4):743-8.

71. Hopkins WJ, Gendron-Fitzpatrick A, Balish E, Uehling DT. Time course and host responses to *Escherichia coli* urinary tract infection in genetically distinct mouse strains. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2798-802.
72. Casaz P, Garrity-Ryan LK, McKenney D, Jackson C, Levy SB, Tanaka SK, Alekshun MN. MarA, SoxS and Rob function as virulence factors in an *Escherichia coli* murine model of ascending pyelonephritis. *Microbiology*. 2006 Dec;152(Pt 12):3643-50.
73. Caliskan B, Guven A, Ozler M, Cayci T, Ozcan A, Bedir O, Surer I, Korkmaz A. Ozone therapy prevents renal inflammation and fibrosis in a rat model of acute pyelonephritis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2011 Oct;71(6):473-80.
74. Yagmurlu A, Boleken ME, Ertoy D, Ozsan M, Gokcora IH, Dindar H. Preventive effect of pentoxifylline on renal scarring in rat model of pyelonephritis. *Urology*. 2003 May;61(5):1037-41.
75. Emamghorashi F, Owji SM, Motamedifar M. Evaluation of Effectiveness of Vitamins C and E on Prevention of Renal Scar due to Pyelonephritis in Rat. *Adv Urol*. 2011; 2011: 489496
76. Wilding EI, Kim DY, Bryant AP, Gwynn MN, Lunsford RD, McDevitt D, Myers JE Jr, Rosenberg M, Sylvester D, Stauffacher CV, Rodwell VW. Essentiality, expression, and characterization of the class II 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2000 Sep;182(18):5147-52.
77. Tancheva S, Valcheva-Kuzmanova SV, Radev RZ, Marinov MD, Boychev B, Stoeva T, Boyadjieva SK, Nenov KS. A model of experimental acute hematogenous pyelonephritis in the rat. *Folia Med (Plovdiv)*. 2011 Apr-Jun;53(2):63-8.
78. Hsu CY. Where is the epidemic in kidney disease? *J Am Soc Nephrol*. 2010 Oct;21(10):1607-11.
79. Kokot M, Duława J. AKI - ostre uszkodzenie nerek - współczesne spojrzenie na zagadnienie ostrej niezapalnej niewydolności nerek. *Nefrol Dial Pol*. 2009, 13, 164-170).
80. The ad-hoc working group of ERBP:, Fliser D, Laville M, Covic A, Fouque D, Vanholder R, Juillard L, Van Biesen W. A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practice Guidelines on Acute Kidney Injury: Part 1: definitions,

- conservative management and contrast-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 December; 27(12): 4263–4272.
81. Wang HE, Muntner P, Chertow GM, Warnock DG. Acute Kidney Injury and Mortality in Hospitalized Patients. *Am J Nephrol*. 2012 May; 35(4): 349–355.
82. Duława J. Ostre uszkodzenie i ostra niewydolność nerek – problem interdyscyplinarny. *Postępy Nauk Medycznych*. 10/2009: 771-775.
83. Jander S, Ledakowicz-Polak A, Jaszewski R, Zielińska M. Ostre uszkodzenie nerek związane z zabiegami kardiochirurgicznymi – współczesne spojrzenie na problem. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska*. 2011; 4: 457–461.
84. Palevsky PM. Akute kidney failure. *NephSAP*. 2003; 2(2):41-76.
85. Hryszko T, Myśliwiec M. Ostre uszkodzenie nerek w: Ostra niewydolność nerek, *Nefrologia. Wielka interna*. Myśliwiec M. (red.). Medical Tribune Polska, Warszawa 2009.
86. Turner ME, Weinstein J, Kher K. Acute renal failure secondary to pyelonephritis. *Pediatrics*. 1996, 97:742–743.
87. Nahar A, Akom M, Hanes D, Briglia A, Drachenberg CB, Weinman EJ. Pyelonephritis and acute renal failure. *Am J Med Sci*. 2004, 328(2):121–123.
88. Husain S, Alroumoh M, Mohan P, El-Kass G, Seshan SV, Galler M. Acute kidney injury from pyelonephritis in an elderly man: case report. *Int Urol Nephrol*. 2011 Sep;43(3):925-8.
89. Palevsky MP, Murray PT. Acute kidney injury and critical care nephrology. *NephSAP*. 2006, 5, 72.
90. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 2002 Nov;62(5):1539-49.
91. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int*. 2004 Aug;66(2):496-9.
92. Al Awqati Q, Olivier JA. Stem cells in the kidney. *Kidney International*. (2002) 61, 387–395.
93. Tomasik P, Sztefko K. Zasady wykonywania badania ogólnego moczu za pomocą testów paskowych. *Medycyna Praktyczna Pediatria*. 2004/01: 112-125.
94. European Urinalysis Guidelines. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 2000; 60: 1-96
95. Bielarczyk H, Ronowska A, Gul-Hinc S. Mocz jako materiał diagnostyczny. *Badania przyłóżkowe (Point Of Care Testing) w: Diagnostyka Laboratoryjna, tom*

- II. Szutowicz A. (red), Raszeja-Specht A.(red.). Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk 2011.
96. Anyszek T, Dembińska – Kieć A. Biochemia kliniczna i diagnostyka laboratoryjna chorób nerek w: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Dembińska – Kieć A. (red.), Naskalski JW. (red.). Urban&Partner, Wrocław 2010.
 97. Johnson DW. Global proteinuria guidelines: are we nearly there yet? Clin Biochem Rev. 2011 May;32(2):89-95.
 98. Lisowska – Myjak B. Laboratory markers of acute kidney injury detected in serum and urine. Forum Nefrologiczne. 2010, vol. 3, no 2, 71–81.
 99. Jarad G, Miner JH. Update on the glomerular filtration barrier. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2009 May;18(3):226-32.
 100. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Diagnostyka laboratoryjna chorób bakteryjnych w: Mikrobiologia. Przondo-Mordarska A. (red.), Martirosian G. (red), Szkaradkiewicz A. (red.). Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2011.
 101. Ciechanowski K. Ocena czynności nerek w: Nefrologia. Wielka interna. Myśliwiec M. (red.). Medical Tribune Polska, Warszawa 2009.
 102. Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. How to measure renal function in clinical practice. BMJ. 2006 Oct 7;333(7571):733-7.
 103. Kang D.H., Nakagawa T., Feng L. i wsp. A role for uric acid in the progression of renal disease. J. Am. Soc. Nephrol. 2002; 13: 2888–2897.
 104. Kreydiyyeh SI, Al-Sadi R. Interleukin-1beta increases urine flow rate and inhibits protein expression of Na ⁺/K⁺-ATPase in the rat jejunum and kidney. J Interferon Cytokine Res. 2002, 22:1041-1048.
 105. Eisenhut M. Changes in ion transport in inflammatory disease. J Inflamm (Lond). 2006 Mar 29;3:5.
 106. Eisenhut M, Wallace H. Ion channels in inflammation. Pflugers Arch - Eur J Physiol. (2011) 461:401–421
 107. Szutowicz A, Bielarczyk H. Laboratoryjne wskaźniki zaburzeń metabolizmu białek w: Diagnostyka Laboratoryjna, tom II. Szutowicz A. (red), Raszeja-Specht A.(red.). Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk 2011.
 108. Schrier R.W., Wang W., Poole B., Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. J. Clin. Invest. 2004; 114: 5–14.
 109. Bonventre J.V. Diagnosis of acute kidney injury: from classic parameters to new biomarkers. Contrib. Nephrol. 2007; 156: 213–219.

110. Wheeler D.S., Devarajan P., Ma Q. i wsp. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. *Crit. Care Med.* 2008; 36: 1297–1303.
111. Royakkers A.A., vanSuijlen J.D., Hofstra L.S. i wsp. Serum cystatin C — a useful endogenous marker of renal function in intensive care unit patients at risk for or with acute renal failure? *Curr Med Chem.* 2007; 14: 2314–2317.
112. Herget-Rosenthal S, Poppen D, Hüsing J. i wsp. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem.* 2004; 50: 552–558.
113. Principles of Proper Laboratory Use in Research and Teaching. Wake Forest univ., Bowman Gray School of Medicine, 1992.
114. Katkiewicz M. Zwierzęta laboratoryjne: choroby i użytkowanie. Wydawnictwo SGGW-AR, Warszawa 1989.
115. Brylińska J. Zwierzęta laboratoryjne : hodowla i użytkowanie. Krzanowska H. (red.), Preibisch J. (red.), Korda P. (red.). Państw. Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1974.
116. Hummers-Pradier E, Kochen MM. Urinary tract infections in adult general practice patients. *Br J Gen Pract.* 2002 Sep;52(482):752-61.
117. Westwood ME, Whiting PF, Cooper J, Watt IS, Kleijnen J. Further investigation of confirmed urinary tract infection (UTI) in children under five years: a systematic review. *BMC Pediatr.* 2005 Mar 15;5(1):2.
118. Kassir K, Vargas-Shiraishi O, Zaldivar F, Berman M, Singh J, Arrieta A. Cytokine profiles of pediatric patients treated with antibiotics for pyelonephritis: Potential therapeutic impact. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8:1060–3.
119. Carol A. Feghali, TM. Wright. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2, d12-26, Jan 1, 1997.
120. Tuğtepe H, Sener G, Cetinel S, Velioğlu-Oğünç A, Yeğen BC. Oxidative renal damage in pyelonephritic rats is ameliorated by montelukast, a selective leukotriene CysLT1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 2007 Feb 14;557(1):69-75.
121. Rugo HS, O'Hanley P, Bishop AG, Pearce MK, Abrams JS, Howard M, O'Garra A. Local cytokine production in a murine model of *Escherichia coli* pyelonephritis. *J Clin Invest.* 1992 Mar;89(3):1032-9.
122. Mittal R, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Evaluation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in an experimental pyelonephritis model induced

- with planktonic and biofilms cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2009 Fall;20(3):e35-42.
123. Nanda N, Juthani-Mehta M. Novel biomarkers for the diagnosis of urinary tract infection-a systematic review. *Biomark Insights*. 2009 Aug 5;4:111-21.
 124. Dennen P, Altmann C, Kaufman J, Klein CL, Andres-Hernando A, Ahuja NH, Edelstein CL, Cadnapaphornchai MA, Keniston A, Faubel S. Urine interleukin-6 is an early biomarker of acute kidney injury in children undergoing cardiac surgery. *Critical Care*. 2010, 14:R181.
 125. Otto G, Braconier J, Andreasson A, Svanborg C. Interleukin-6 and disease severity in patients with bacteremic and nonbacteremic febrile urinary tract infection. *J Infect Dis*. 1999 Jan;179(1):172-9.
 126. Wielgosz A. Zakażenia układu moczowego. W: Choroby nerek. Orłowski T (red.). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997.
 127. Jutley RS, Youngson GG, Eremin O. Serum cytokine profile in reflux nephropathy. *Pediatr Surg Int*. 16 (2000), pp. 64–68.
 128. Malekinejad H, Nikibakhsh A, Gholizadeh-Soltani S, Farshid A. Interaction between gentamicin and mycophenolate mofetil in experimentally induced pyelonephritis. *Indian J Nephrol*. 2012 Jan-Feb; 22(1): 26–32.
 129. Sener G, Tuğtepe H, Velioğlu-Oğünç A, Cetinel S, Gedik N, Yeğen BC. Melatonin prevents neutrophil-mediated oxidative injury in *Escherichia coli*-induced pyelonephritis in rats. *J Pineal Res*. 2006 Oct;41(3):220-7.
 130. Heyman SN, Brezis M, Reubinoff CA, Greenfeld Z, Lechene C, Epstein FH, Rosen S. J. Acute Renal Failure with Selective Medullary Injury in the Rat. *J Clin Invest*. 82, t 1988, 401-412.
 131. Kim YG, Huang XR, Suga S, Mazzali M, Tang D, Metz C, Bucala R, Kivlighn S, Johnson R, Lan HY. Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Experimental Uric Acid Nephropathy. *Mol Med*. 6(10): 837–848, 2000.
 132. Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, Sánchez-Lozada LG, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Uric acid – a uremic toxin? *Blood Purif*. 2006;24(1):67-70.
 133. Ejaz A, Mu W, Kang DH, Roncal C, Sautin YY, Henderson G, Tabah-Fisch I, Keller B, Beaver TM, Nakagawa T, Johnson RJ. Could Uric Acid Have a Role in Acute Renal Failure? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2: 16–21, 2007.

134. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, Krotova K, Block ER, Prabhakar S, Johnson RJ. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int.* 2005 May;67(5):1739-42.
135. Lapsia V, Johnson RJ, Dass B, Shimada M, Kambhampati G, Ejaz NI, Arif AA, Ejaz AA. Elevated uric acid increases the risk for acute kidney injury. *Am J Med.* 2012 Mar;125(3):302.e9-17.
136. Ejaz AA, Kambhampati G, Ejaz NI, Dass B, Lapsia V, Arif AA, Asmar A, Shimada M, Alsabbagh MM, Aiyer R, Johnson RJ. Post-operative serum uric acid and acute kidney injury. *J Nephrol.* 2012 Jul-Aug;25(4):497-505.
137. Ejaz AA, Mu W, Kang DH, Roncal C, Sautin YY, Henderson G, Tabah-Fisch I, Keller B, Beaver TM, Nakagawa T, Johnson RJ. Could uric acid have a role in acute renal failure? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007; 2: 16–21.
138. Hoste EAJ, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, Kellum JA. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care.* 2006;10(3):R73.
139. Lehnhardt A, Kemper M. Pathogenesis, diagnosis and management of hyperkalemia. *Pediatr Nephrol.* (2011) 26:377–384.
140. Kokot F. Stany zagrożenia życia spowodowane zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej i kwasowo zasadowej. W: Ostre stany zagrożenia życia w chorobach wewnętrznych. Kokot F (red.). PZWL, Warszawa 2003.
141. Vaidya C, Ho W, Freda BJ. Management of hyponatremia: providing treatment and avoiding harm. *Cleve Clin J Med.* 2010 Oct;77(10):715-26.
142. Gerigk M, Glanzmann R, Rascher W, Gnehm HE. Hyponatraemia and hyperkalaemia in acute pyelonephritis without urinary tract anomalies. *Eur J Pediatr.* 1995 Jul;154(7):582-4.
143. Gil-Ruiz MA, Alcaraz AJ, Marañoń RJ, Navarro N, Huidobro B, Luque A. Electrolyte disturbances in acute pyelonephritis. *Pediatr Nephrol.* 2012 Mar;27(3):429-33.
144. Watanabe T. Hyponatremia and hyperkalemia in infants with acute pyelonephritis. *Pediatr Nephrol.* 2004 Mar;19(3):361-2.
145. Samimagham HR, Kheirkhah S, Haghighi A, Najmi Z. Acute kidney injury in intensive care unit: incidence, risk factors and mortality rate. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2011 May;22(3):464-70.

146. Ziółkowska H. Ostra niewydolność nerek u dzieci. *Borgis – Nowa Pediatria*. 1/2009, s. 3-18
147. Hsieh MF, Wu IW, Lee CC, Wang SY, Wu MS. Higher serum potassium level associated with late stage chronic kidney disease. *Chang Gung Med J*. 2011 Jul-Aug;34(4):418-25.
148. Gotfried J, Wiesen J, Raina R, Nally JV Jr. Finding the cause of acute kidney injury: which index of fractional excretion is better? *Cleve Clin J Med*. 2012 Feb;79(2):121-6.
149. Fahimi D, Mohajeri S, Hajizadeh N, Madani A, Esfahani ST, Ataei N, Mohsseni P, Honarmand M. Comparison between fractional excretions of urea and sodium in children with acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2009 Dec;24(12):2409-12.
150. Labib M, Khalid R, Khan A, Khan S. Volume management in the critically ill patient with acute kidney injury. *Crit Care Res Pract*. 2013;2013:792830.
151. Langenberg C, Wan L, Bagshaw SM, Egi M, May CN, Bellomo R. Urinary biochemistry in experimental septic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Dec;21(12):3389-97.
152. Rastegar A, Kashgarian M. The clinical spectrum of tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int*. 1998 Aug;54(2):313-27.
153. Braden GL, O'Shea MH, Mulhern JG. Tubulointerstitial diseases. *Am J Kidney Dis*. 2005 Sep;46(3):560-72.
154. Murakami T, Itagaki A, Takahashi H. A change of urinary proteins from a glomerular pattern to a tubular pattern during a late diuretic phase of acute renal failure. *Child Nephrol Urol*. 1988-1989;9(3):160-2.
155. Oudemans-van Straaten HM. Circulating pro-apoptotic mediators in burn septic acute renal failure. *Crit Care*. 2008;12(2):126.

11. SPIS RYCIN I TABEL

Ryciny:

Rycina	Opis
1	Stężenie IL-6 w DZM (pg/24h)
2	Stężenie TNF α w surowicy (pg/ml)
3	Pomiar temperatury (C°)
4	Objętość DZM (ml/24h)
5	Krea _P (μ mol/l)
6	Krea _U (μ mol/24h)
7	Cl _{Kr} (ml/min)
8	Urea _P (mmol/l)
9	Urea _U (mmol/24h)
10	Cl _{Urea} (ml/min)
11	FEUrea (%)
12	Stężenie kwasu moczowego w surowicy (μ mol/l)
13	Stężenie kwasu moczowego w moczu (μ mol/24h)
14	Współczynnik Urea _P /Krea _P
15	Współczynnik Urea _U /Urea _P
16	Współczynnik Krea _U /Krea _P
17	Na _P (mmol/l)
18	Na _U (mmol/24h)
19	FENa (%)
20	K _P (mmol/l)
21	K _U (mmol/24h)
22	FEK (%)
23	RFI (mmol/l)
24	Dobowe wydalanie białka (mg/24h)
25	Selektywność białek moczu/ dzień 0
26	Selektywność białek moczu/ dzień 7
27	Selektywność białek moczu/ dzień 14
28	Selektywność białek moczu/ dzień 21
29	Densytometria frakcji albuminowej
30	Przyrost masy ciała (g)
31	Waga spożywanego jedzenia (g)

Tabele:

Tabela	Opis
1	Posiewy moczu (j.t.k./ml)
2	Stężenie IL-6 w DZM (pg/24h)
3	Stężenie TNF α w surowicy (pg/ml)
4	Pomiar temperatury (C ⁰)
5	Objętość DZM (ml/24h)
6	Krea _P (μ mol/l)
7	Krea _U (μ mol/24h)
8	Cl _{Kr} (ml/min)
9	Urea _P (mmol/l)
10	Urea _U (mmol/24h)
11	Cl _{Urea} (ml/min)
12	FEUrea (%)
13	Stężenie kwasu moczowego w surowicy (μ mol/l)
14	Stężenie kwasu moczowego w moczu (μ mol/24h)
15	Współczynnik Urea _U /Krea _P
16	Współczynnik Urea _U /Urea _P
17	Współczynnik Krea _U /Krea _P
18	Na _P (mmol/l)
19	Na _U (mmol/24h)
20	FENa (%)
21	K _P (mmol/l)
22	K _U (mmol/24h)
23	FEK (%)
24	RFI (mmol/l)
25	Dobowe wydalanie białka (mg/24h)
29	Selektywność białek moczu
27	Densytometria frakcji albuminowej
28	Przyrost masy ciała (g)
29	Waga spożywanego jedzenia (g)
30	Zbiorne zestawienie analizowanych parametrów

Zdjęcia:

Zdjęcie	Opis
1	Obraz mikroskopowy ściany pęcherza osobnika zdrowego, barwienie H – E, 10x
2	Obraz mikroskopowy nerki osobnika zdrowego, barwienie H – E, 20x
3	Obraz mikroskopowy ściany pęcherza osobnika z grupy 1 (10^5 j.t.k./ml), barwienie H – E, 10x
4	Obraz mikroskopowy nerki osobnika z grupy 1 (10^5 j.t.k./ml), barwienie H – E, 20x
5	Obraz mikroskopowy ściany pęcherza osobnika z grupy 2 (10^7 j.t.k./ml), barwienie H – E, 10x
6	Obraz mikroskopowy nerki osobnika z grupy 2 (10^7 j.t.k./ml), barwienie H – E, 20x
7	Obraz mikroskopowy ściany pęcherza osobnika z grupy 3 (10^9 j.t.k./ml), barwienie H – E, 10x
8	Obraz mikroskopowy nerki osobnika z grupy 3 (10^9 j.t.k./ml), barwienie H – E, 20x

